

УДК 577.112.388.2.66.081

А.Е. АГАДЖАНЯН, К.И. ЕГИЯН, Г.Ж. ОГАНЕСЯН, А.С. САГИЯН

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ВЫДЕЛЕНИЯ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ L-ПРОЛИНА

Исследован процесс отделения взвесей из культуральной жидкости (КЖ) L-пролина и определены оптимальные технологические параметры процесса.

Сняты выходные кривые сорбции пролина при различных величинах рН фугата и определена величина рН, при которой происходит его максимальная сорбция до проскока на катионите. Получены кривые изотермы сорбции пролина с использованием искусственного раствора и фугата на катионите КУ-2×8 и рассчитаны коэффициенты распределения аминокислот.

Исследована зависимость ширины фронта сорбции пролина от скорости потока фугата и определен оптимальный параметр процесса.

На основании полученных данных в производственных условиях проводили сорбцию пролина из фугата КЖ на 4м³ ионообменной колонке и сняты выходные кривые сорбции пролина и сопутствующих примесей на катионите КУ-2×8. Эти данные служили основой для разработки технологии получения смеси аминокислот из КЖ пролина.

L-пролин находит широкое применение в пищевой и химической промышленности, медицине, фармакологии, сельском хозяйстве и т.д. [1]. В связи с созданием высокоактивных штаммов-продуцентов L-пролина микробиологический способ его получения становится основным промышленным методом.

Культуральная жидкость (КЖ) пролина, полученная путем выращивания продуцента в питательной среде, имеющей источники углерода, азота, органические и минеральные добавки, содержит до 60г/л L-пролина и сопутствующих аминокислот (L-валин, D, L-аланин, L-изолейцин, L-глутаминовая кислота, L-лизин и глицин) в суммарном количестве не более 10–15% от общего содержания аминокислоты, а также биомассу, остаточный мел и сахар, пигменты, минеральные соли и др. балластные вещества.

Согласно оценкам экономистов, стоимость биологически активных веществ на ≈90% определяется затратами на выделение и очистку [2]. В патентной литературе стадии выделения пролина из КЖ в отличие от очистки изложены поверхностно [3–6].

Целью нашей работы является исследование некоторых стадий выделения смеси аминокислот из КЖ пролина и их оптимизация.

Условия эксперимента. Изотермы сорбции пролина на катионите КУ-2×8 в Н⁺-форме фракцией –0.4+0.325мм в статических условиях сняты методом переменной концентрации аминокислот при отношении объема раствора к весу смолы, равном 100 : 1.

Качество очистки КЖ от биомассы и взвесей оценивали по оптической плотности разбавленного фугата (фотоколориметр ФЭК-56 М на длине волны $\lambda = 440 \text{ нм}$).

Выходные кривые сорбции пролина сняли на колонке сечением 7 см^2 и высотой слоя катионита 40 см . Скорость подачи жидкости регулировали перистальтическим насосом типа "Masterflex".

Подготовку катионита к работе проводили в соответствии с ГОСТ 10896-78 [7]. Растворы аминокислоты готовили из соответствующих препаратов фирмы "Reanal" квалификации ч.д.а. Использовались химикаты NaOH , HCl , NaCl , KCl и аммиачная вода марки х.ч. или ч.д.а.

Концентрацию пролина в растворе определяли спектрофотометрическим методом при использовании реакции флюорескамина с пролином и измеряли поглощение образовавшегося соединения в диоксане на спектрофотометре Specord M-40 при длине волны $\lambda_{\text{max}} = 313 \text{ нм}$ [8].

Содержание пролина и сопутствующих аминокислот в растворе определяли так же на автоматическом анализаторе аминокислот ААА-339, а неорганических ионов – атомно-абсорбционным методом на приборе ААС-1.

Солевой состав фугата составлял 0.48 г-экв/л , а концентрация пролина – 42.0 г/л .

Результаты и обсуждение. При микробиологическом способе получения биологически активных веществ первым этапом является выделение биомассы и других взвесей из КЖ. Исследования проводились в двух направлениях: в первом случае – с использованием коагулянтов органического (полиакриламид) и неорганического (соли трехвалентного железа и алюминия, а также окись кальция) характера с дальнейшей термической обработкой и центрифугированием, а во втором – без использования коагулянтов.

Ввиду того, что опыты с использованием коагулянтов не дали хороших результатов, было исследовано влияние величины рН КЖ, температуры обработки подкисленной массы и скорости центрифугирования на показатели отделения взвесей без использования коагулянтов. Установлено, что технологически приемлемыми являются подкисление КЖ серной кислотой до рН 3.0–3.3, дальнейшая термическая обработка при $55\text{--}60^\circ\text{C}$ в течение 40 мин и центрифугирование массы при скорости вращения 4500 об/мин – 25 мин . Для уменьшения потери пролина полученный осадок привели в контакт с водой при отношении твердой фазы к жидкой, равной 1:2, и образовавшуюся массу вновь подвергли центрифугированию. Жидкую фазу объединили с основным фугатом.

При микробиологическом способе получения пролина наиболее технологичным способом его отделения от сопутствующих примесей органического и неорганического характера является сорбция на сульфокатионите [3–6]. Исходя из этого расчетным путем [9] определяли формы нахождения пролина в растворе в зависимости от величины рН.

Расчеты показали, что для эффективного проведения ионообменного процесса сорбцию пролина на катионитах необходимо осуществлять при $\text{pH} < 1.5$.

Для эффективного проведения поглощения сняты выходные кривые сорбции пролина на катионите КУ-2×8 в H^+ -форме при различных величинах рН исходного фугата (рис.1).

Как видно из рис. 1, с увеличением рН фугата уменьшается емкость смолы по пролину до проскока. Если при малом значении рН фугата (1.1) фронт сорбций заостряется, то при ее повышении (3.5–6.0) он растянут. Из полученных данных следует, что сорбцию пролина из фугата КЖ на катионите необходимо проводить при величине рН фугата, равной 1.1

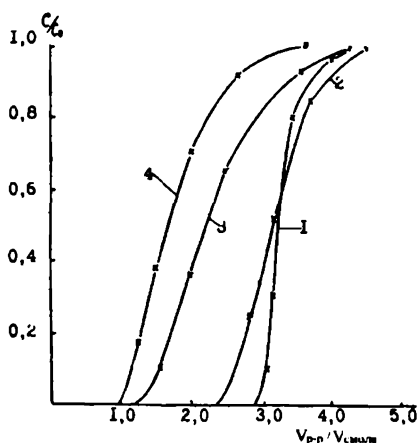


Рис. 1. Выходные кривые сорбции пролина на катионите КУ-2x8 в H⁺ форме при различных рН фугата: 1 – 1.1; 2 – 1.75; 3 – 2.8; 4 – 6.2.

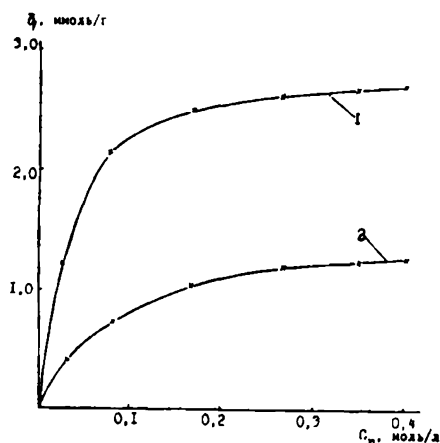


Рис. 2. Изотермы сорбции пролина: 1 – чистый раствор, 2 – фугат.

Равновесная обменная емкость катионита КУ-2x8 в H⁺ форме по пролину из его чистого раствора и из фугата КЖ при рН 1.1 в статических условиях определена по изотерме сорбции. На основании полученных данных были построены изотермы сорбции при температуре раствора, равной 20°C (рис. 2).

Как видно из рис. 2, полученные для обоих растворов изотермы имеют выпуклую форму, что свидетельствует об избирательности процесса сорбции [10]. Из зависимости сорбционной способности катионита от равновесной концентрации пролина следует, что во всех исследуемых равновесных концентрациях пролина наблюдается возрастание сорбции.

При равновесной концентрации пролина в растворе 0.4 ммоль/л емкость смолы по пролину из чистого раствора составляет 2.7 ммоль/г, а из фугата – 1.23 ммоль/г. Уменьшение емкости смолы по пролину обусловлено конкурирующим влиянием водородных ионов и присутствующих в фугате сопутствующих примесей различного рода.

На основании данных равновесных опытов были рассчитаны коэффициенты распределения (K_d) находящихся в фугате аминокислот на катионите по формуле

$$K_d = q/cV, \quad (1)$$

где q – количество аминокислоты в фазе смолы (ммоль/г), c – ее концентрация в равновесном растворе (ммоль/мл), V – удельный объем смолы (мл/г).

Концентрации аминокислоты в исходном и равновесном растворе определяли с помощью аминокислотного анализатора, а по их разности – кон-

центрацию аминокислоты в фазе смолы. Результаты расчета приведены в таблице.

Как видно из таблицы, наименьшей избирательностью к катиониту обладает L-пролин. Из приведенных величин K_d аминокислот следует, что насколько длиннее углеродный радикал в молекуле аминокислоты, настолько селективнее происходит их сорбция на катионите.

Величины коэффициентов распределения (K_d) аминокислот на катионите КУ-2×8 в H⁺-форме

Аминокислоты	K_d
пролин	1.45
лизин	11.4
глутаминовая кислота	1.77
глицин	4.03
аланин	4.26
валин	4.45
изолейцин	5.50

Так как с помощью сорбции на сульфокатионите невозможно очистить пролин от сопутствующих аминокислот, то вначале выделяют его в виде смеси аминокислот, а затем осуществляют очистку от остаточных сопутствующих примесей.

Ввиду того что процесс сорбции пролина из фугата проводится в динамических условиях, изучено влияние скорости потока раствора на показатели сорбции.

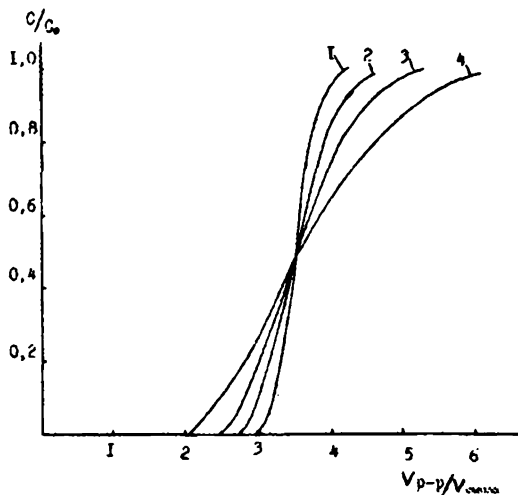


Рис. 3. Выходные кривые сорбции пролина на катионите КУ-2×8 при различных линейных скоростях потока фугата (м/ч): 1 - 0.17; 2 - 0.34; 3 - 0.68; 4 - 2.04.

Как видно из рис.3, в исследованном интервале с уменьшением скорости пропускания фугата заостряется фронт поглощения и увеличивается емкость смолы по пролину до проскока.

Технологически приемлемой скоростью потока фугата при сорбции является 0.17 м/ч, так как при скорости меньше этой он может привести к нарушению стационарности фронта сорбции, а также, к плохой отмывке зерен смолы от остаточных взвесей фугата.

На основании полученных данных в производственных условиях проводили сорбцию

пролина из фугата на 4 м³ ионообменной колонке, заполненной 3 м³ катионитом КУ-2×8 в H⁺-форме.

Технологические параметры были следующие: КЖ подкисляли серной кислотой до pH 3.0-3.3 и после термической обработки при 55-60°C сепарированием твердую фазу отделяли от жидкой. Величины pH полученного фугата доводили до 1.1 и подкисленную жидкость со скоростью 0.17 м/ч по

направлению снизу вверх пропускали через заполненную катионитом колонку. При прохождении 2.8 объема фугата на объем смолы начался проскок пролина. Для эффективного проведения сорбционного процесса выходящий из смолы пролинсодержащий раствор пропускали через последовательно соединенную вторую колонку (колонна-накопитель). После пропускания через первую колонку 4.0 объема фугата (для насыщения смолы пролином) подача жидкости прекращалась и начиналась водная промывка первой колонки до снижения величины сухих веществ (СВ) выходящей из смолы жидкости до нуля и рН 3.8–4.0. В следующем опыте последовательность подключения колонки меняется. Фугат пропускается через вторую колонку, а проскоки сорбируются на регенерированной первой колонке. Результаты приведены на рис.4.

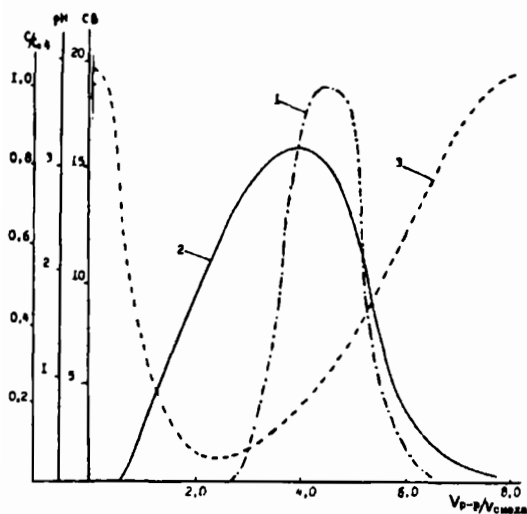


Рис. 4. Выходные кривые сорбции пролина и сопутствующих примесей на катионите КУ-2x8: 1 — концентрация пролина; 2 — СВ; 3 — рН.

Как видно из рис.4., фронт выхода (кр.2.) сопутствующих примесей значительно опережает фронт выхода пролина, что и дает возможность с помощью сорбции очистить его от значительного количества примесей.

В начале процесса одновременно происходит сорбция пролина и неорганических ионов, поэтому величина рН выходящей из смолы жидкости начинает резко уменьшаться (кр.3), а затем, когда смола переходит в солевую форму, начинает постепенно увеличиваться. Из катионита, промытого водой, элюция пролина проводилась 3.5–4.0%ным раствором аммиака, при этом скорость потока аммиачного

раствора по направлению сверху вниз составляла 0.1 м/ч.

Исследования показали, что основное количество (85%) сорбированного пролина накапливается в 1.8 м³ аммиачном элюате. Количество сопутствующих примесей органического и неорганического характера в собранном элюате по сравнению с исходным фугатом уменьшилось в 4.5–5.0 раз.

Для освобождения от избытка аммиака собранный аммиачный элюат смеси аминокислот подвергается вакуумному упариванию до содержания СВ 25–30%. Из элюата распылительной сушкой можно получить технические кристаллы смеси аминокислот.

Чистые кристаллы L-пролина из упаренного элюата смеси аминокислот получают обесцвечиванием и обессоливанием, а его окончательную очистку от остаточных сопутствующих аминокислот можно осуществлять одним из способов, указанных в работах [3–6].

1. Садовникова М.С., Беликов В.И. – Успехи химии, 1978, т. 47, №2, с. 357.
2. Sing S.P., Verma I.N. – Biotechnol. Bull, 1987, v. 6, № 2, p.5.
3. Пат. США, № 3598838, 1971.
4. Сагиян А.С., Арзуманов Е.Н., Аветисян А.Х., Акопян Э.М., Агаджанян А.Е., Мурадян А.Г. АС СССР, № 1300941, 1985.
5. Сагиян А.С., Джамгарян С.М., Акопян Э.М. АС СССР, № 1464436, 1988.
6. Мурадян А.Г., Агаджанян А.Е., Акопян Э.М., Карабеков Б.П. АС СССР, № 1504978, 1989.
7. ГОСТ 10896–78. Иониты. Подготовка к испытанию, 1978.
8. Тооме V., Manhart K. – Analytical Letters, 1975, № 8(7), p. 441.
9. Либибсон Г.С. Сорбция органических веществ ионитами. М.: Медицина, 1979, с. 145.
10. Гельферих Ф. Иониты. Основы ионного обмена. М.: ИЛ, 1962, с. 490.

Ա.Ե. ԱՂԱԶԱՆՅԱՆ, Կ.Ի. ԵՂՅԱՆ, Գ.Ժ. ՀՈՎՀԼՈՆՆԻՍՅԱՆ, Ա.Ս. ՍԱԳՅԱՆ

Լ-ՊՐՈՒԼԻՆԻ ԿՈՒՆՏՈՒՐԱԼ ՀԵՂՈՒԿԻՑ ԱՍԻՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ԽԱՌՆՈՒՐԴԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍԻ ՕՊՏԻՍԱԼԱՑՈՒՄԸ

Ամփոփում

Ուսումնասիրվել է պրոլինի կուլտուրալ հեղուկից (ԿՀ) կախությունների անջատման պրոցեսը, որոշվել են օպտիմալ տեխնոլոգիական պարամետրերը:

Ֆուգատի pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում KY-2×8 կատիոնիտի վրա հանվել են պրոլինի սորբցիայի ելային կորերը ու որոշվել է pH-ի այն օպտիմալ արժեքը, որի դեպքում կատիոնիտի վրա տեղի է ունենում պրոլինի մաքսիմալ սորբցիան:

Կատիոնիտի վրա պրոլինի սորբցիան կատարվել է սինթետիկ լուծույթից ու ֆուգատից: Ստացված տվյալներով կառուցվել են սորբցիայի իզոթերմ կորերը և հաշվվել են ամինաթթուների բաշխման գործակիցները:

Ուսումնասիրվել է պրոլինի սորբցիայի ստացիոնար ճակատի լայնքի կախվածությունը ֆուգատի խեժով անցնելու արագությունից և որոշվել է պրոցեսի օպտիմալ պարամետրերը:

Ստացված տվյալների հիման վրա 4^մ իոնափոխանակային աշտարակում KY-2×8 կատիոնիտի վրա հանվել են պրոլինի և ուղեկցող խառնուրդների սորբցիայի ելային կորերը:

Այս արդյունքները հիմք են հանդիսացել պրոլինի ԿՀ ամինաթթվային խառնուրդի ստացման տեխնոլոգիայի մշակման համար:

OPTIMIZATION OF THE PROCESS OF ISOLATION OF AMINOACID MIXTURES FROM L-PROLINE CULTURAL LIQUID

Summary

The process of separation of biomass from L-proline cultural liquid has been investigated and the optimal technological parameters of the process has been defined.

Proline sorption curves at various pH-values of supernatant have been obtained and pH-value, at which the maximum sorption of proline takes place on cationite as defined.

The proline sorption isotherm from synthetic solution and supernatant of cultural liquid on the KU-2×8 Cation- exchange resin has been obtained and the coefficients of proline and accompanying amino-acids distribution has been calculated.

The stationary front width of proline - ion sorption in dependence of supernatant flow rate has been studied and the optimal parameter of the process has been defined.

On the basis of the data obtained, the proline sorption from cultural liquid supernatant in the industrial conditions on $4m^3$ column has been carried out and proline sorption and accompanying admixture curves on KU-2×8 cation - exchange resin have been obtained.

The data obtained have been used as basis technology for working out of the amino acid mixtures from the cultural liquid of proline.