

УДК 577.112.388.2.66.081

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

ИССЛЕДОВАНИЕ ПО ВЫДЕЛЕНИЮ ПРОЛИНА ИЗ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ

Исследован процесс отделения пролина от сопутствующих аминокислот культуральной жидкости на ионитах и показано, что оно эффективно происходит на сильноосновных анионитах. Изучен процесс обесцвечивания и обессоливания элюата смеси аминокислот катионообменной смолы и определены оптимальные параметры.

Из обесцвеченного и обессоленного элюата в статических условиях на анионите АВ-17 в ОН-форме определены коэффициенты распределения аминокислот и показано, что наименьшую избирательность к аниониту проявляет пролин, а наибольшую – изолейцин.

На основании данных, полученных при сорбции на анионите АВ-17, сняты выходные кривые сорбции аминокислоты и определены оптимальные технологические параметры процесса отделения пролина от сопутствующих аминокислот.

L-Пролин находит широкое применение в пищевой и химической промышленности, медицине, сельском хозяйстве и получают его в основном микробиологическим способом. В культуральной жидкости (КЖ) пролина содержатся также сопутствующие аминокислоты в суммарном количестве 10–15% от общего их содержания.

Из фугата КЖ с помощью ионного обмена пролин выделяют в виде смеси аминокислот. Полученный аммиачный элюат обесцвечивают и обессоливают, затем пролин очищают от сопутствующих аминокислот.

Известные в литературе способы отделения пролина от сопутствующих аминокислот можно разделить на две группы.

– Методы, основанные на способности различных соединений (пикриновая кислота, хлорэндиковая кислота, пентахлорфенол) избирательно связывать пролин или отдельные сопутствующие аминокислоты [1, 2];

– Методы, основанные на структурном различии пролина и сопутствующих первичных аминокислот, например, с использованием реакции дезаминирования [3] или способности первичных аминокислот образовывать свободные основания Шиффа [4].

Целью работы являлось изучение возможности отделения пролина от сопутствующих аминокислот с учетом отличия значения второй константы ионизации пролина от соответствующих констант сопутствующих первичных аминокислот.

Условия эксперимента. Опыты по обесцвечиванию элюата смеси аминокислот проводили путем контакта раствора с определенной навеской обработанного угля при соответствующих величинах рН и температуры раствора. Далее после истечения времени контакта пульпу отфильтровывали и определяли оптическую плотность раствора по отношению к дистиллированной воде на фотоколориметре ФЭК-56М при длине волны $\lambda = 440 \text{ нм}$.

Процесс обесцвечивания элюата осуществляли методом ионообменной хроматографии путем пропускания обесцвеченного элюата через три последовательно соединенные ионообменные колонки. Скорость потока жидкости при этом по направлению снизу вверх составляла 0.08 м/ч. Опыты по отделению пролина от сопутствующих аминокислот проводили на колонке сечением 7 см^2 и высотой слоя анионита 40 см.

Коэффициенты распределения аминокислоты на анионите АВ-17 в ОН-форме в статических условиях определяли методом переменной концентрации аминокислот при соотношении раствор : анионит = 100 : 1. Время установления равновесия определяли по изменению содержания пролина в жидкой фазе.

Подготовку ионитов к работе проводили в соответствии с ГОСТ 10896-78 [5].

Растворы аминокислот готовили из соответствующих препаратов фирмы "Reanal" квалификации ч.д.а. Использовались химикаты NaOH, HCl, NaCl, KCl и амиачная вода марки х.ч. или ч.д.а.

Концентрацию пролина в растворе определяли с использованием реакции флерескамина с пролином и измерением поглощения образовавшегося соединения в диоксане на спектрофотометре Specord M-40 при длине волны $\lambda_{\text{max}} = 313 \text{ нм}$ [6].

Содержание пролина и сопутствующих аминокислот в растворе определяли также на автоматическом анализаторе аминокислот ААА-339.

Результаты и обсуждения. Суть предлагаемого метода заключается в следующем. Т. к. аминокислоты, имеющие малые значения величин Pk_2 , в фазе смолы раньше пролина переходят из цвиттерийной формы в анионную и сорбируются смолой, то исследования проводятся на анионитах различной основности.

В табл. 1 приводятся значения второй константы ионизации (Pk_2) пролина и сопутствующих аминокислот КЖ.

Таблица 1

Аминокислоты	пролин	валин	аланин	глицин	изолейцин	глутам. кислота	лизин
Pk_2	10.60	9.60	9.87	9.78	9.60	4.25	8.95
Pk_1							10.53

Из приведенных в табл.1 данных следует, что на анионообменных смолах возможно провести отделение пролина от вышеуказанных сопутствующих аминокислот, за исключением лизина.

Опыты показали, что из всех апробированных анионитов (сильноосновные АВ-17, АВ-29, Дауэкс-1, среднеосновные ЭДЭ-10П, слабоосновные АН-31, АН-18-10П ИА-1р) процесс отделения пролина от сопутствующих

аминокислот наиболее эффективно проходит на АВ-17, АВ-29 и Даукс-1 (табл. 2).

В опытах использовался раствор смеси чистых аминокислот следующего состава: пролин – 76г/л, валин, аланин, глицин, изолейцин в сумме – 8.2г/л.

Как видно из табл. 2, с уменьшением основности анионитов разделяющая способность ионитов уменьшается. В солевых формах плохо протекает отделение пролина от сопутствующих аминокислот. Во избежание этого технологические растворы перед стадией разделения аминокислот необходимо подвергнуть обесцвечиванию и обессоливанию.

Таблица 2

Эффективность использования некоторых анионитов различной основности и формы для отделения пролина от сопутствующих аминокислот

Марки анионита	Противоионы	V _{раст.} /V _{см}	Количество пролина в выходящем растворе, г	Суммарное кол-во сопутствующих аминокислот в выходящем растворе, г
АВ-17	ОН ⁻	1.5	14.2	0.02
	ОН ⁻	2.0	18.1	0.034
	ОН ⁻	2.5	22.4	0.045
	ОН ⁻	3.0	27.2	1.36
	Cl	2.0	19.2	2.08
АВ-29	ОН ⁻	2.5	20.9	0.08
Даукс-1	ОН ⁻	2.5	21.8	0.075
ЭДЭ-10П	ОН ⁻	1.5	14.6	1.30
АН-18-10П	ОН ⁻	1.5	13.8	1.40
АН-31	ОН ⁻	1.5	15.4	1.46
ИА-1р	ОН ⁻	1.5	14.7	1.52

В качестве технологического раствора использовали элюаты смеси аминокислот, полученные аммиачным элюированием катионита КУ-2×8, насыщенного аминокислотами фугата КЖ пролина.

При микробиологическом способе получения аминокислот из элюата ионообменных смол очистку пигментов, пирогенов, запаха и т.д. в основном проводят с помощью адсорбции на активированных углях. Исходя из этого были испытаны следующие их типы: осветляющий порошкообразный, марки ОУ-В основного характера и ОУ-А – кислотного вида, осветляющий уголь гранулированный, марки АГС-4, газовые угли – АГ-3 и КАД, а также уголь марки БАУ [7].

Исследования показали, что из апробированных наиболее хорошие результаты получены на угле ОУ-В, поэтому определение оптимальных технологических параметров обесцвечивания элюата осуществляли на нем.

Выявлены следующие технологически приемлемые параметры процесса обесцвечивания элюата: содержание сухих веществ (СВ) 13.5%; рН 5–6; расход угля 4.5–5.0% от массы элюата, температура пульпы 55–60°С и время перемешивания 1.5–2.0ч.

Процесс обессоливания элюата пролина был осуществлен методом ионообменной хроматографии путем пропускания обесцвеченного элюата через три последовательно соединенные ионообменные колонки, заполненные соответственно катионитом КУ-2×8 в Н⁺-форме, среднеосновным

анионитом ЭДЭ-10П в OH^- -форме и снова через КУ-2×8 в H^+ -форме. На первой колонке происходила сорбция катионов элюата, на второй – анионов, а третья служила для регулирования рН раствора.

Во время обессоливания объем смолы в первой и второй колонках выбирали исходя из обменной емкости смолы и минерализованности обесцвеченного элюата, что в среднем составляло 0.1г-экв/л. Объем катионита в третьей колонке составлял 5–7% от объема смолы в первой.

Исследования показали, что полное обессоливание раствора смеси аминокислот и минимальные потери пролина на этой стадии наблюдаются в случае избытка смолы в первой и второй колонках на 8–10% от теоретически необходимого количества. Выявлено, что при обессоливании в случае установления стационарного фронта сорбции катионов и анионов величины СВ и рН выходящего из третьей колонки раствора приблизительно постоянны (рис. 1).

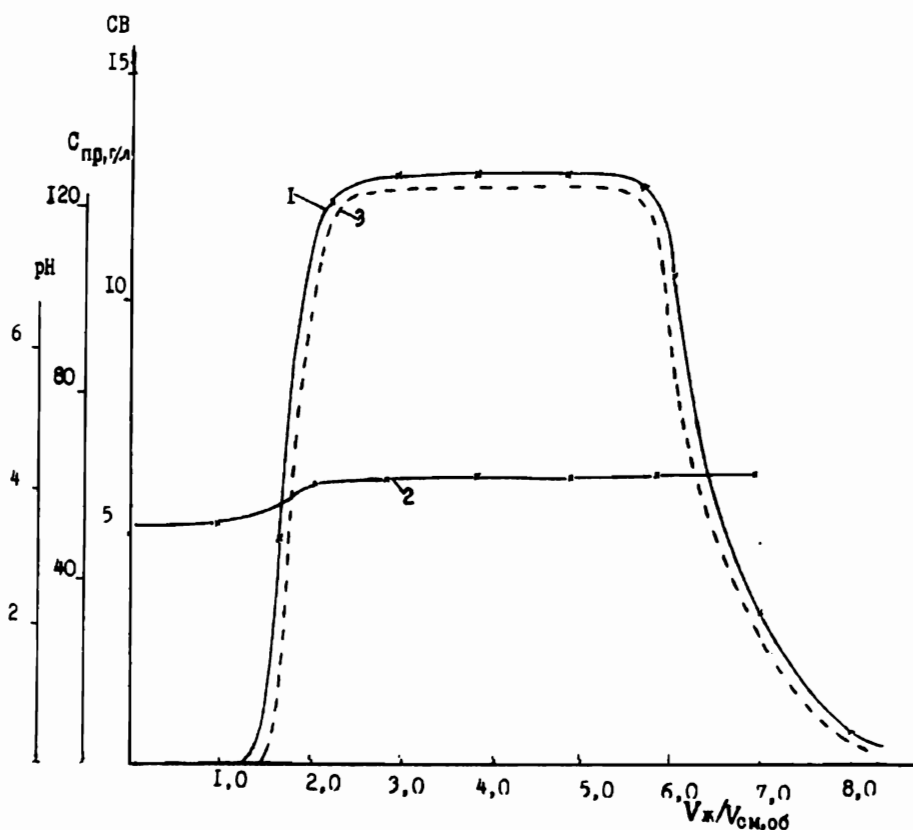


Рис. 1. Показатели обессоливания обесцвеченного элюата смеси аминокислот: 1 – СВ; 2 – рН; 3 – концентрация пролина.

Так как лизин в растворе находится в катионной форме, а глутаминовая кислота – анионной, то первый вместе с катионами сорбируется на катионите, а вторая – на анионите.

Для уменьшения потерь пролина на стадии обессоливания после завершения процесса водной отмывки смолы сорбированные аминокислоты из первой и третьей колонок элюируются 3.5–4.0% раствором аммиака, а из второй – 3.0% раствором соляной кислоты. Далее упаренный раствор смеси

аминокислот возвращается к началу технологического процесса химической очистки.

Так как лучшие показатели отделения пролина от сопутствующих аминокислот наблюдались на сильноосновных анионитах (табл. 2), то для выявления избирательности сорбции аминокислот из обесцвеченного и обессоленного элюата на анионите АВ-17 в ОН-форме определяли их коэффициенты распределения (K_d) в статических условиях (табл. 3):

$$K_d = \bar{q} / c\bar{v},$$

где \bar{q} – количество аминокислоты в фазе смолы (ммоль/г), c – концентрация в равновесном растворе (ммоль/мл), \bar{v} – удельный объем смолы (мл/г).

Таблица 3

Величины коэффициентов распределения аминокислот на анионите АВ-17

Аминокислоты	пролин	валин	аланин	изолейцин	глицин
K_d	1.1	4.8	3.7	10.1	4.5

Как видно из данных табл. 3, наименьшую избирательность к аниониту проявляет пролин, а из сопутствующих аминокислот – аланин, поэтому из фазы смолы первым вместе с пролином будет выходить аланин, последним – изолейцин.

Для определения распределения аминокислоты в процессе сорбции через слой анионита АВ-17 в ОН-форме по направлению сверху вниз со скоростью 0.15 м/ч пропускали 2.5 объема на объем смолы обесцвеченного и обессоленного элюата смеси аминокислот (СВ – 9.5%, рН 6.3; концентрация пролина – 73.5 г/л). После завершения подачи раствора смола промывалась деминерализованной водой до снижения СВ в выходящей со смолы жидкости до 0.2–0.3% (рис. 2).

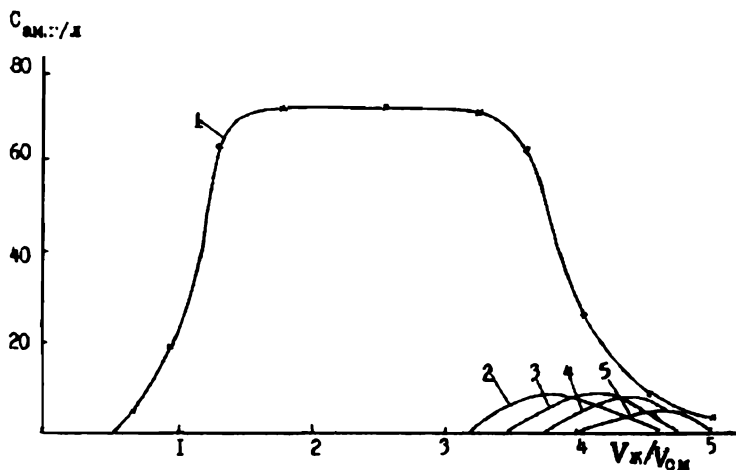


Рис. 2. Показатели отделения пролина от сопутствующих аминокислот: 1 – пролин; 2 – аланин; 3 – глицин; 4 – валин; 5 – изолейцин.

Как видно из рис. 2, вначале из смолы выходит раствор чистого пролина и после сбора 3.2 объема жидкости от объема смолы начинается появление сопутствующих аминокислот. Первым вместе с пролином выходит аланин, а последним – изолейцин.

Опыт показал, что 78% пролина от пропущенного количества из смолы выходит в чистом виде.

После завершения процесса промывки сорбированные аминокислоты из смолы элюировали 5% раствором соляной кислоты. В собранных фракциях определяли концентрации аминокислот, СВ и рН (табл. 4).

Таблица 4

Результаты элюирования аминокислот с анионита АВ-17

№ фракции	СВ	рН	Концентрация аминокислот, г/л			
			пролин	аланин	валин	изолейцин
I	2.5	8.1	20	0.9	4.0	-
II	8.0	2.9	50	5.0	14.5	0.3
III	8.7	1.1	6.2	1.4	10.1	0.6
IV	3.2	0.85	2.5	0.6	3.9	0.25

Как видно из данных табл. 4, первую фракцию смеси аминокислот можно вернуть на стадию сорбции на сульфокатионите, а из второй и третьей – получить технические кристаллы смеси аминокислот.

Исследование показало, что существенных отличий в эффективности разделения не наблюдается в интервале рН 3.5–10.5, а также в интервале температур 15–60°C. Оптимальная концентрация СВ в исходном растворе смеси аминокислот при разделении составляет 7–10%.

Когда содержание пролина в общей сумме аминокислот 80% и выше, процесс разделения идет с удовлетворительным выходом. Если же отношение пролина к остальным аминокислотам ниже указанного предела, то необходимо избыток сопутствующих аминокислот удалить дополнительным процессом дробной кристаллизации [8].

НИИ "Биотехнология", ЕГУ

Поступила 20.03.2001

ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. США. № 3598838, 1971.
2. Пат. Великобритании. № 1177125, 1970.
3. Сагян А.С., Арзуманов Е.Н., Аветисян А.Х., Акопян Э.М., Агаджанян А.Е., Мурадян А.Г. АС СССР. № 1300941. 1985.
4. Сагян А.С., Джамгарян С.М., Акопян Э.М. АС СССР, № 1464436, 1988.
5. ГОСТ 10896–78. Иониты. Подготовка к испытанию, 1978.
6. Тооме V., Manhart K. – Analytical Letters, 1975, v. 8(7), p. 441.
7. Кельцев Н.В. Основы адсорбционной техники. М.: Изд-во Химия, 1984, с.590.
8. Мурадян А.Г., Агаджанян А.Е., Акопян Э.М., Хачатурян К.И., Оганесян Г.Ж. АС СССР, № 1504978, 1989.

ԱՄԻՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ԽԱՌՆՈՒՐԴԻՑ ՊՐՈԼԻՆԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ
ՊՐՈՑԵՍԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է իոնիտներով կուլտուրալ հեղուկի ուղեկցող ամինաթթուներից պրոլինի անջատման պրոցեսը և ցույց է տրվել, որ բաժանումը էֆեկտիվ է ընթանում ուժեղ հիմնային անիոնիտների օգտագործումով:

Որոշվել են կատիոնիտի ամինաթթվային խառնուրդի էլյուատի գունազրկման և աղազրկման պրոցեսների օպտիմալ տեխնոլոգիական պարամետրերը:

Ստատիկ պայմաններում գունազրկված և աղազրկված էլյուատից AB-17 OH-ձևի անիոնիտի վրա որոշվել են ամինաթթուների բաշխման գործակիցները և ցույց է տրվել, որ ամենափոքր ընտրողականությունը ցուցաբերում է պրոլինը, իսկ ամենաբարձրը՝ իզոլեյցինը:

AB-17 անիոնիտի վրա կատարված սորբցիայի տվյալների հիման վրա հանվել են ամինաթթուների սորբցիայի ելային կորերը և որոշվել են ուղեկցող ամինաթթուներից պրոլինի անջատման պրոցեսի օպտիմալ տեխնոլոգիական պարամետրերը:

A. Y. AGHAJANIAN, K. I. YEGHIAN, G. I. HOVHANISIAN, A. S. SAGHIAN

THE INVESTIGATION OF THE PROCESS OF ISOLATION OF PROLINE
FROM AMINO-ACID MIXTURES

Summary

The process of separation of proline from accompanying amino – acids of the proline cultural liquid on anion exchange resin has been investigated and it was shown that the division takes place effectively on strong base anionite.

The process of decoloration and desalting of eluat of amino – acids mixture on cation exchange resin has been studied and the optimal parameters have been defined.

The coefficients of amino – acids distribution from decoloured and desalted eluat on AV-17 anionite at the OH-form in static conditions has been defined and it was shown that proline has the smallest selectivity to anionite, while isoleucine has the greatest one.

In the dynamic conditions amino – acids sorption curves on AV-17 anionite have been obtained and the optimal technological parameters of the process of separation of proline from amino – acid have been defined.