

Л.К.Асланянц,З.Е.Савоян,П.Е.Татевосян

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЛИЗИНА НА КАТИОНИТЕ КУ-2-20

Ионообменная хроматография за последнее десятилетие приобрела большое значение как метод препаративного разделения и определения самых различных смесей неорганических и органических соединений (Салладзе К.М.,1960;Трембийон,1967;Александрова и др.,1955,и др.).Широкое применение в различных отраслях народного хозяйства и,в частности,в промышленности микробиологического получения аминокислот нашел катионит КУ-2-20,благодаря кислото- и щелочустойчивости,термостойкости,механической прочности и объемной ёмкости,мало зависящей от изменения рН-среды.В последнее время уделяется большое внимание развитию микробиологического производства незаменимых аминокислот,в частности,лизина (L-ε-диаминокапроновой кислоты),в производственный цикл которого входит также выделение и химическая очистка его на ионообменных смолах.

Целью настоящей работы являлась отработка процесса выделения и химической очистки лизина на полупроизводственной установке лаборатории биосинтеза лизина Института микробиологии АН Арм. ССР.

Методы работы

В процессе работы,руководствуясь регламентом ИАЭ им.И.В.Курчатова (Алиханян и др.,1967),проверялись и уточнялись расходные коэффициенты - показатели ионообменного процесса выделения лизина.

В полупроизводственную установку кроме батареи ферментеров входит опытный химический станд с колоннами для ионообменной очистки со смолой КУ-2-20,и депигментации элюата смолой АИ-15,концентрирования и выделения аминокислот из культуральной жидкости,полученных методом микробиологического синтеза.Химический станд позволяет производить следующие операции.

1. Предварительную обработку исходной культуральной жидкости путем подкисления или добавки коагулянтов с последующим нагревом,охлаждением и перемешиванием в реакторе или смесителе.

2. Разделение суспензии культуральной жидкости путем фильт-

рации через фильтр-пресс.

3. Сорбцию аминокислот на ионообменных смолах.

4. Элюцию аминокислот со смолы.

5. Регенерацию ионообменных смол кислотами и щелочами, а также промывку водопроводной водой.

6. Концентрирование полученных элюатов путем нагревания в выпарных аппаратах под вакуумом и без вакуума.

7. Осветление элюатов за счет удаления пигментных примесей на ионосорбенте.

Для осуществления технологических операций в установке предусмотрено:

1. Автоматическое регулирование и поддержание заданного температурного режима в реакторе, смесителе и выпаривателях.

2. Автоматический контроль с записью режимов ионообменных колонн: электропроводности, pH и мутности.

3. Механическое регулирование подаваемых на ионообменные колонны растворов насосами-дозаторами.

4. Индивидуальный контроль расхода растворов на каждую колонну по показывающему ротаметру.

5. Механическое перекачивание агрессивных жидкостей (кислот, щелочей) в емкости установки из фабричной упаковки.

6. Установка для получения деионизированной воды ионообменным способом.

7. Система гибких шлангов, которая позволяет мыть аппараты и сливать растворы из аппаратов на месте без разбора.

8. Запорная аппаратура.

9. Емкости разного объема из некоррозионного материала для временного и длительного хранения растворов.

10. Пульты управления электросхемой установки.

Результаты и их обсуждение

Культуральная жидкость, полученная в результате ферментации *M. glutamicus* шт. 95 в 20-ти литровых ферментерах имела следующие показатели: содержание лизина — 14–20 г/л, титр клеток — 8×10^9 мл, количество остаточных сахаров к концу ферментации — 0,2–2%, pH — 7.

Путем нагревания до 100° с окисью кальция (15 г/л) и последующей выдержкой при этой температуре в течение 3-х часов куль-

туральная жидкость предварительно очищалась от биомассы и выпавших в осадок белковых веществ и солей. Осадок фильтровался через фильтр-пресс под давлением; а фильтрат с pH 1-2 нейтрализовался ортофосфорной кислотой (5-8 мл/л), нагревался до 70-90° и вновь подвергался фильтрации через бельтинг-ткань. При оптимальной производительности фильтра толщина осадка была 2-6 мм. Затем фильтрат подавался на ионообменные колонны объемом 9,6л с объемом смолы - 7,35л. Ионообменные колонны с сульфокатионитом КУ-2-20 предварительно подвергались доработке, в результате чего pH смолы устанавливался на уровне 5,5-6,0.

Режимы всех операций на ионообменных колоннах приведены в табл. I. Скорость подачи растворов составляла 13 л/час, скорость подачи воды для промывки - 25 л/час. Растворы подавались в колонны сверху вниз, промывные воды имели обратное направление тока. Культуральная жидкость при температуре 20° с содержанием лизина 14-20 г/л подавалась на смолу из сборника, вытесняя при этом находящуюся в колонне воду. По мере прохождения культуральной жидкости через колонну происходит ионообменный процесс, в результате которого лизин сорбируется на смоле. Адсорбция лизина сопровождается снижением pH выходящих стоков от 5 до 1-0,7, повышением электропроводности от 0,15 до 20×10^3 ом⁻¹см⁻¹, изменением мутности от 14 до 20.

После вытеснения остатков культуральной жидкости производится промывка смолы с сорбированным на ней лизином 3-4 объемами воды к объему смолы. К концу промывки выходящий из колонны раствор представляет собой бесцветную прозрачную жидкость с pH 5,5. Для элюции лизина использовался 7-9% раствор аммиака в количестве 2-2,5 объема от объема смолы. Начало выхода фракции, содержащей лизин, сопровождается повышением pH 8-9, а в дальнейшем до 10 и выше, повышением электропроводности выходящего раствора, изменением мутности, содержание сухих веществ при этом составляло около 5%.

Согласно регламенту количество аммиака, требуемого для элюции лизина составляет 2-2,5 объема от объема смолы, однако, в наших опытах процент сухих веществ в последних фракциях элюата продолжал оставаться достаточно высоким (2,2%), поэтому либо надо было увеличить объем аммиачного раствора для полной элюции, либо, как было сделано нами, собирать воду, подаваемую для вытес-

Режимы операций на катионите КУ-2-20

Операции	Раствор, подаваемый на колонну	Количество раствора			продолжительность операции, часы	pH
		в л	к объему смолы	расход л/час		
Вытеснение к.ж.водой	к.ж.	5,0	0,7	13	0,3	5,0
Сорбция лизина	к.ж.	17,5	2,5	13	1,5	0,7
Вытеснение остатков к.ж.водой	вода	5,0	0,7	13	0,3	0,7
Промывка после к.ж.	вода	24	3,4	25	0,9	5,5-6
Вытеснение воды раствором аммиака	9% аммиак	5,0	0,7	13	0,3	5,5-6
Сбор элюата	—	17,5	2,5	13	1,3	10-12
Вытеснение остатков аммиака	вода	10,5	1,4	13	0,7	10-12
Промывка от аммиака	вода	23	3,3	25	0,9	8-9
Вытеснение воды раствором кислоты	1,4 HNO_3	5,0	0,7	13	0,3	8-9
Регенерация азотной кислотой	1,4 HNO_3	16,1	2,3	13	1,23	1,0
Вытеснение остатков водой	вода	5,0	0,7	13	0,3	1,0
Промывка после регенерации	вода	24,5	3,5	25	1,0	4,5-5

нения со смолы остатков аммиака до содержания в ней 0,2% сухих веществ. При этом расходовалось около 10,5 л воды, что составляет 3,3 объема от объема смолы вместо 5 объемов по регламенту. Уровень pH смолы к концу ее промывки составлял 8-9.

Регенерация смолы с восстановлением ее в H^+ форму проводилась 1,4 HNO_3 в количестве 2,25 объема от объема смолы, по окончании процесса pH смолы становится равным 0,5-1,0, после чего смола отмывалась 35 объемами водопроводной воды до pH 4,5-5,0.

Собранный с колонны элюат направляется в выпариватель для первичного упаривания. Аммиак отгоняется при 85-100° и поглощается в специальном смесителе. Раствор упаривается до 5% сухих веществ и нейтрализуется 33% соляной кислотой до pH 4,2-4,5. Для перевода лизина из основания в монохлоргидрат расходуется 1,7% концентрированной соляной кислоты.

Затем производится осветление элюата на смоле ИА-1, режимы операций на которой приведены в табл. № 2. Предварительно смола подвергается обработке, в результате чего ее pH становится равным 4,0. Пропущенный элюат через смолу ИА-1 со скоростью 13 л/час собирается в специальный сборник. При вытеснении воды элюатом и при вытеснении остатков элюата водой раствор из колонны также собирается в сборник для элюата. Осветляющая смола с сорбированными на ней пигментными веществами регенерируется после пропускания каждые 4-х объемов элюата к объему смолы. Регенерация производится сначала 2N раствором едкого натра (2 объема к объему смолы), промывается до pH 8,5-9,0, на что уходит 12 объемов воды, затем пропускается через смолу 1% раствор HCl и снова промывается до pH 5,5 пропусканием 15 объемов воды. Раствор осветленного элюата подается из сборника в вакуумный выпарной аппарат, где производится упаривание при температуре 60-65°. Скорость выпаривания 1 л - 20 мин. Раствор упаривается до содержания 65% сухих веществ. Затем раствор постепенно охлаждается до 40-50° и переносится в холодильник для выделения кристаллов L-лизина в виде монохлоргидрата. Кристаллы досушиваются в вакуум-сушилке. Выход лизина на установке составляет 75% с чистотой препарата 96-99%.

В заключение можно сказать, что данные, полученные нами при ионообменном выделении лизина на опытной установке института в целом согласуются с данными, приведенными в регламенте ИАЭ, за ис-

Таблица 2

Режимы операций на осветляющих колоннах

Операции	Раствор на колонну	Количество раствора			Продолж. операции (часы)	pH
		в л	об/об смолы	расход л/час		
Вытеснение воды осветляемым элюатом	элюат	1,4	0,7	13	0,1	4,5
Освещение нейтрализованного элюата	элюат	6,0	3,0	13	0,4	4,5
Вытеснение остатков элюата	вода	1,4	0,7	13	0,3	4,5
Регенерация щелочью	NaOH	4,0	2	13	0,3	10-12
Вытеснение остатков щелочью	вода	1,4	0,7	13	0,1	10-12
Промывка от щелочи	вода	25	12,5	25	1,0	8-9
Обработка кислотой	1% HCl	3,0	1,5	13	0,23	1,0
Вытеснение остатков кислоты	вода	1,4	0,7	13	0,1	1,0
Промывка от кислоты	вода	30	15	25	1,2	4,0

ключением некоторых расхождений. К ним мы относим прежде всего расход воды для промывки катионита от аммиака, который по нашим данным составлял 3,3 объема вместо 3-х по регламенту. Для промывки смолы после регенерации вместо 4-х объемов по регламенту расходовалось 3,5 объема, выпаривание аммиака по регламенту происхо-

L.K.Aslaniantz, Z.E.Savcian, P.E.Tatevosian

THE ISOLATION AND THE PURIFICATION OF LYSINE BY
CATIONITE KU-2-20

S u m m a r y

Ion exchange process concerning the sorbtion, elution and purification of lysine from cultural fluid of bacteria have been studied.

Cationite KU-2-20 and IA-1 resins have been used.