

ВЫДЕЛЕНИЕ L-ПРОЛИНА ИЗ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ

А. С. САГИЯН, С. Р. КАГРАМАНЯН, Г. Ц. ОВСЕПЯН, С. М. ДЖАМГАРЯН,
К. Е. БАССЕНЦЯН, Э. М. АКОПЯН, С. К. ГРИГОРЯН, В. Ф. СЕЛЕМЕНЬЕВ,
Э. Е. КАПАНЦЯН и Э. М. ОГАНЕСЯН

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, Ереван
Ереванский государственный университет

Поступило 15 XI 1990

Разработан малоотходный способ выделения L-пролина из смеси аминокислот, основанный на способности сопутствующих L-пролину первичных аминокислот образовывать комплексы оснований Шиффа с салициловым- или 5-сульфосалициловым альдегидом и ионами двухвалентной меди из поверхности ионнообменных смол «ЭДЭ-10п» и «АВ-17». Способ позволяет в одну стадию без использования каких-либо токсичных и канцерогенных веществ с количественным химическим выходом очистить L-пролин от всех сопутствующих аминокислот.

Рис. 1, табл. 1, библиограф. ссылок 4.

В последние годы в связи с созданием высокоактивных штаммов-продуцентов L-пролина микробиологический способ его получения находит все более широкое применение, вытесняя из практики такие промышленные методы, как химический синтез и выделение из белковых гидролизатов. Развитие микробиологического синтеза L-пролина в свою очередь ставит задачу разработки технологии выделения L-пролина из культуральной жидкости (ферментационных растворов), содержащей наряду с целевым продуктом и другие аминокислоты.

Особое место среди описанных в литературе способов занимают те, которые основаны на диазотировании сопутствующих L-пролину первичных аминокислот с последующим ионообменным отделением L-пролина от полученных оксикислот [1, 2].

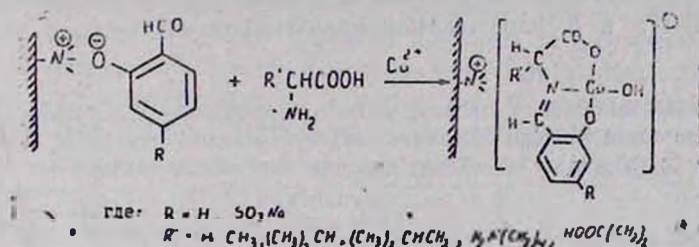
Однако указанные методы не обеспечивают полной очистки L-пролина, технологически сложны и связаны с использованием токсичных и канцерогенных нитрозосоединений и агрессивных кислот. Недостатками способов являются также невысокий выход целевого продукта (~50%) и полная потеря сопутствующих аминокислот, которые удаляются в составе сорбционных стоков в виде оксикислот.

Нами разработан лабораторный способ выделения L-пролина из смеси аминокислот, основанный на способности первичных аминокислот образовывать медные комплексы оснований Шиффа с альдегидами в динамическом режиме с использованием aminoобменных смол, четвертичные аммониевые группы которых нейтрализованы салициловым альдегидом или его производными.

Обсуждение результатов

При пропускании раствора смеси аминокислот, содержащей эквивалентное количество ионов меди по отношению к суммарному

количеству сопутствующих L-пролину аминокислот, через колонку со смолами «АВ-17» или «ЭДЭ-10п» в салицил- или 5-сульфосалицил-альдегидной форме аминокислоты с первичной аминогруппой образуют медные комплексы оснований Шиффа с фрагментом альдегида и задерживаются на поверхности смолы согласно схеме:



L-Пролин как иминокислота с вторичной аминогруппой не образует медные комплексы основания Шиффа с фрагментом альдегида смолы и не задерживается на поверхности смолы.

По мере расходования реакционноспособных альдегидных групп смол в выходящем из колонки растворе появляются сопутствующие L-пролину аминокислоты, суммарное количество которых увеличивается с увеличением объема пропускаемого раствора. Динамические кривые выхода отдельных аминокислот из колонки, заполненной смолой «АВ-17» в 5-сульфосалицилальдегидной форме, приведены на рисунке.

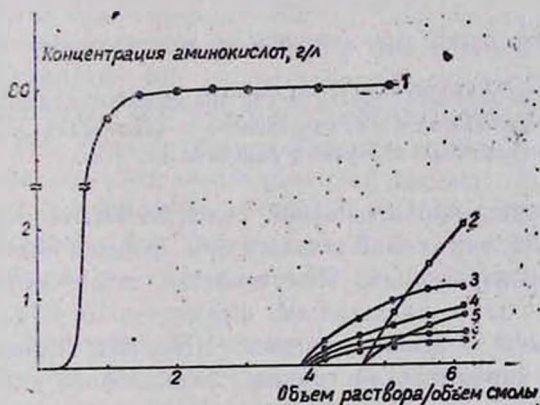


Рисунок. Кривые выхода аминокислот из колонки, заполненной смолой «АВ-17» в 5-сульфосалицилальдегидной форме: 1 — L-пролин, 2 — L-валин, 3 — L,D-аланин, 4 — L-глутаминовая кислота, 5 — L-лейцин, 6 — глицин, 7 — L-лизин

Как видно из рисунка, через один объем смолы «АВ-17» в 5-сульфосалицилальдегидной форме можно пропускать 3,5-4 объема раствора смеси аминокислот и получать полностью очищенный от сопутствующих аминокислот раствор L-пролина.

Результаты аналогичных экспериментов выделения L-пролина из смеси аминокислот в случае смол «АВ-17» и «ЭДЭ-10п» в салицил- и 5-сульфосалицилальдегидной формах представлены в таблице.

Сопоставление полученных результатов и теоретических расчетов показывает, что анионообменная смола «ЭДЭ-10п» в салицилальдегидной форме в процессе связывания первичных аминокислот в виде Cu (II) комплексов оснований Шиффа использует свою обменную емкость всего на 18—20% (табл.). Эффективно использует свою обменную емкость для связывания сопутствующих аминокислот только смола «АВ-17» в 5-сульфосалицилальдегидной форме.

Таблица

Результаты выделения L-пролина из смеси аминокислот при пропуске капли раствора смеси аминокислот через колонку в направлении снизу вверх и со скоростью 0,5 объема раствора на 1 объем смолы в час

№	Тип смолы, носитель	V смолы, мл	Расчетная обменная емкость 100 мл смолы, г-экв	V раствора Л-Пролина до проскока, мл	Суммарное количество задержанных сопутствующих аминокислот, г-экв	Эффективная обменная емкость, %
1	«ЭДЭ-10п» в салицилальдегидной форме	100	0,22	20—20	0,044	20
2	«ЭДЭ-10п» в 5-сульфосалицилальдегидной форме	100	0,11	80—100	0,01	10
3	«АВ-17» в салицилальдегидной форме	100	0,03	150—180	0,024	30
4	«АВ-17» в 5-сульфосалицилальдегидной форме	100	0,04	350—400	0,04	100

* Учитывается количество задержанных сопутствующих аминокислот до и после «проскока».

** Эффективная обменная емкость рассчитана по соотношению $E_{\text{эфф}}/E_{\text{расч}} \cdot 100\%$, где $E_{\text{расч}}$ — расчетная обменная емкость данного объема смолы, г-экв, $E_{\text{эфф}}$ — суммарное количество связанных первичных аминокислот, г-экв.

Для выявления причин низкой селективности смолы «ЭДЭ-10п» ее образцы в ОН- и салицилальдегидной формах были исследованы методом ИК спектроскопии. Полученные данные показали, что на поверхности смолы в альдегидной форме около 80% салицилового альдегида связаны с аминогруппами (NH_2 , NH) смолы ковалентной связью за счет карбонильной группы салицилового альдегида в виде основания Шиффа, что приводит к полной инактивации этих фрагментов альдегида в реакциях образования медных комплексов. Лишь 20% альдегида связано ионной связью за счет ОН-группы салицилового альдегида с четвертичными аммониевыми группами смолы.

По этой причине в процессе связывания сопутствующих аминокислот участвует только часть ($\sim 20\%$) нанесенного салицилового альдегида, которая связана с четвертичными аммониевыми группами смолы (доля последних в «ЭДЭ-10п», согласно данным [3], составляет 18—20%).

В случае 5-сульфосалицилового альдегида эффективная обменная емкость смолы «ЭДЭ-10п» уменьшается еще в 2 раза и составляет 9—10% (табл.). Это объясняется тем, что одна молекула

5-сульфосалицилового альдегида связывается с двумя четвертичными аммониевыми группами смолы за счет OH^- и SO_3^- групп, и в результате в 2 раза уменьшается количество реакционноспособных карбонильных фрагментов на матрице смолы.

Иная картина наблюдается в случае смолы «АВ-17», которая в отличие от «ЭДЭ-10п» на поверхности содержит только четвертичные аммониевые группы [3]. Как видно из таблицы, в 5-сульфосалицилальдегидной форме она полностью использует фрагменты альдегида для связывания сопутствующих аминокислот, а в салицилальдегидной форме—лишь 30%. Причиной низкой эффективности смолы «АВ-17» в салицилальдегидной форме является связывание салицилового альдегида со смолой поинной связью за счет только OH^- группы альдегида. Поэтому в процессе образования медных комплексов салициловый альдегид вымывается с поверхности смолы под действием SO_4^{2-} (CuSO_4) или CH_3COO^- [$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$], не успевая вступить в реакцию с аминокислотами. Спектрофотометрическим методом показано, что при этом 60—70% салицилового альдегида вытесняется с поверхности смолы в раствор L-пролина.

В случае смолы «АВ-17» в 5-сульфосалицилальдегидной форме фрагмент альдегида дополнительно связывается со смолой за счет сильноокислотной 5-сульфогруппы и не вымывается с поверхности смолы под действием минеральных анионов, что и приводит к эффективному использованию фрагментов альдегида для связывания сопутствующих аминокислот. 5-Сульфосалициловый альдегид не вымывается с поверхности смолы даже в процессе элюирования сопутствующих аминокислот под действием NH_4OH , что позволяет эту смолу использовать многократно без дополнительной регенерации. Для установления оптимальных режимных параметров процесса нами было изучено влияние pH, температуры, скорости и направления подачи исходного раствора, а также соотношения L-пролин: Σ сопутствующих аминокислот на эффективность отделения L-пролина от сопутствующих аминокислот. Для этих целей были использованы смолы «ЭДЭ-10п» в салицилальдегидной и «АВ-17» в 5-сульфосалицилальдегидной формах.

Найдено, что эффективное отделение L-пролина происходит при значениях pH 5,5 ÷ 8,5. Видимо, уменьшение или увеличение pH исходного раствора от указанного интервала приводит к частичному разложению комплексов и в выходящем растворе наблюдается «проскок» сопутствующих аминокислот раньше ожидаемого. Аналогичная ситуация наблюдается при повышении и понижении температуры; оптимальный температурный режим процесса находится в интервале 15—50°. Неполное отделение L-пролина при температуре выше 50°, по-видимому, связано с осмолением смолы, а при понижении температуры ниже 15°, очевидно, падает скорость образования комплексов.

Исследования показали, что эффективность отделения L-пролина от сопутствующих аминокислот существенно зависит от суммарной концентрации сопутствующих аминокислот в исходном растворе. Эффективное разделение L-пролина от сопутствующих аминокислот про-

исходит при содержании сопутствующих аминокислот по отношению к общему количеству аминокислот не более 12—15%. Увеличение концентрации сопутствующих аминокислот в растворе в 2 раза приводит к уменьшению эффективной обменной емкости «АВ-17» в 5-сульфосалицилальдегидной форме примерно на 1,5—1,8 раз.

Установлено, что оптимальная скорость пропускания раствора смеси аминокислот составляет 0,4—0,8 объема раствора на 1 объем смолы на 1 ч; направление—снизу—вверх.

Таким образом, разработан приемлемый для технологии способ выделения L-пролина из смеси аминокислот, который позволяет в одну стадию без использования токсичных и канцерогенных веществ полностью очистить L-пролин от сопутствующих аминокислот практически без потерь целевого продукта.

Экспериментальная часть

Анализ аминокислот проводили методом ТСХ на пластинке «Silufol» и на автоматическом анализаторе аминокислот «ААА-339».

В работе были использованы: аминокислоты фирмы «Reanal» и производства НИТИА (СССР); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; салициловый альдегид, смолы «АВ-17», «ЭДЭ-10п» и «КУ-2Х8»—Реахим (СССР). 5-Сульфосалициловый альдегид был получен по методике [4]. Регенерацию смол «АВ17», «ЭДЭ-10п» в OH^- -форму и «КУ-2Х8» в H^+ -форму осуществляли согласно ГОСТ СССР № 10896-78, их обменная емкость составляла соответственно 0,8; 2,2; 1,9 г-экв/л. Анализ салицилового и 5-сульфосалицилового альдегидов проводили на спектрофотометре «Spesord М-40» при $\lambda_{\text{max}} = 255$ и 254 нм соответственно по корреляционным диаграммам.

ИК спектры образцов смолы «ЭДЭ-10п» в OH^- и салицилальдегидной формах получены на приборе «Spesord JR-75» в таблетках с КВг. В спектре «ЭДЭ10п» в OH^- -форме имеются следующие полосы поглощения, ν , см^{-1} : 3427—3294 с, 2880 ср, 2774 ср, 1641 ср, 1454 с, 1054 ср (колебания внутренней структуры смолы). В спектре «ЭДЭ-10п» в салицилальдегидной форме, кроме этих полос поглощения, имеются: 2280 с, 1687 с, 1643 ($\nu_{\text{C-N}^+}$ основания Шиффа салицилового альдегида и аминогруппы смолы); 1627 ср, 1454 с и 1267 ср ($\nu_{\text{C=O}}$ и ν_{CNO} групп салицилового альдегида, связанного ионной связью со смолой).

Перевод анионообменных смол «ЭДЭ-10п» и «АВ-17» в салицилальдегидную или 5-сульфосалицилальдегидную форму осуществляли пропусканием 8% водно-спиртового раствора салицилового альдегида или 5% водного раствора 5-сульфосалицилового альдегида в направлении снизу-вверх через 10 мл смолы в OH^- -форме со скоростью 50 мл раствора за 1 ч. Пропускание раствора продолжали до полного сравнения концентраций альдегида в исходном и выходящем растворах. Расход салицилового альдегида при этом составлял 68 г для «ЭДЭ-10п» и 44 г для «АВ-17», а 5-сульфосалицилового альдегида—25 г для «ЭДЭ-10п» и 9 г для «АВ-17». Затем смолы промывали

дистиллированной водой до полного отсутствия следов альдегида в выходящем из колонки растворе.

Для изучения процесса отделения L-пролина от других аминокислот был использован стандартный раствор смеси аминокислот состава, г/л: L-пролин 80; L-валин 5; L-лейцин 0,8; L,D-аланин 1,4; глицин 0,5; L-лизин 0,4 и L-глутаминовая кислота 0,7 и соотношении L-пролин: Σ сопутствующих аминокислот, 9:1. Использованы также растворы смеси аминокислот с общим содержанием сопутствующих аминокислот, %: 5, 15, 20, 25 и 30.

В раствор смеси аминокислот добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ или $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ в эквимольном количестве по отношению сопутствующих аминокислот и полученный раствор ($\text{pH}=6,3-6,6$) пропускали через колонку со 100 мл смолы. В отдельных случаях изготовленный раствор подкисляли или подщелачивали с помощью H_2SO_4 или NaOH для изучения влияния pH исходного раствора на эффективность процесса.

Для изучения влияния температуры на эффективность отделения L-пролина проводили процессы при температурах 5, 10, 15, 25, 30, 50, 60, 70° с использованием термостатированных колонок с рубашкой.

Для определения оптимальной скорости подачу раствора на колонку варьировали в диапазоне 0,2—1,5 объема раствора на один объем смолы в час.

Для расчетов эффективной емкости смол пропускание раствора продолжали до сравнения суммарного количества сопутствующих аминокислот в исходном и выходящем из колонки растворе, при этом раствор чистого L-пролина собирали отдельно. Очищенный от сопутствующих аминокислот раствор L-пролина обессоливали пропусканием через 10—15 мл смолы «КУ—2Х8» в H^+ -форме и 20—25 мл «АВ-17» в OH^- -форме. Полученный раствор упаривали досуха и кристаллизовали L-пролин из этилового спирта.

Раствор смеси аминокислот, собранный после «проскока» сопутствующих аминокислот, использовали для последующих опытов. Выход L-пролина с учетом количества, возвращенного обратно в цикл, составляет 96—98% от теоретического.

Далее смолы промывали дистиллированной водой до $\text{CB} < 1\%$ выходящего раствора и элюировали сопутствующие аминокислоты пропусканием 4—5 объемов 5% водного раствора аммиака. Из элюата смесь сопутствующих аминокислот выделяли ионообменным методом. Полученный раствор упаривали досуха и сушили при 50°. Выход сопутствующих аминокислот с учетом количества возвращенного в цикл составляет 85—90%.

С целью повторного использования смол в салицилальдегидной форме после элюции сопутствующих аминокислот смолы промывали 4—5 объемами дистиллированной воды, пропускали 2—2,5 объема 8—10% водно-спиртового раствора салицилового альдегида и промывали, как описано выше.

Смолы в 5-сульфосалицилальдегидной форме после элюции сопутствующих аминокислот промывали только дистиллированной водой (400—500 мл) до 7,5—8 и использовали повторно. Ощутимое уменьшение эффективной обменной емкости указанных смол в процессе 5—6-кратного использования не наблюдается.

Լ-ՊՐՈԼԻՆԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԱՄԻՆՈԹԹՈՒՆՆԵՐԻ ԽԱՌՆՈՒՐԴՆԵՐԻՑ

Ա. Ս. ՍԱԳԻԱՆ, Ս. Ռ. ՂԱԶՐԱՄՅԱՆ, Գ. Մ. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ, Ս. Մ. ԺԱՄՀԱՐՅԱՆ,
Կ. Ե. ԲԱՍԵՆՏՅԱՆ, Է. Մ. ՀԱԿՈՐՅԱՆ, Ս. Կ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ, Վ. Ֆ. ՍԵԼԵՄՅԵՆՎ,
Է. Ե. ՂԱՓԱՆՅԱՆ և Է. Մ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

Մշակված է ամինոթթուների խառնուրդից Լ-պրոլինի անջատման փոքրածավալ թափոնային եղանակ, որը հիմնված է Լ-պրոլինին ուղեկցող առաջնային ամինոթթուների Շիֆի հիմքով կոմպլեքս առաջացնելու ունակության վրա՝ սալիցիլային և 5-սուլֆոսալիցիլային ալդեհիդների հետ, երկարժեք պղնձի իոնների հետ ЭДЭ—10П և АВ—17 անիոնափոխանակային խեցերի մակերեսների վրա:

Եղանակը թույլ է տալիս մի փուլով, առանց որևէ թունավոր և կանցքորոգեն նյութ օգտագործելու, քիմիական քանակական ելքով Լ-պրոլինը անջատելու նրան ուղեկցող բոլոր ամինոթթուներին:

L-PROLINE ISOLATION FROM THE MIXTURE OF AMINO ACIDS

A. S. SAGHIYAN, S. R. GHANRAMANIAN, G. Ts. HOVSEPIAN,
S. M. JAMHARIAN, K. Ye. BASSENTSIAN, E. M. HAKOPIAN, S. K. GRIGORIAN,
V. F. SELEMEN'YEV, E. Ye. GHAPANTSIAN and E. M. HOVHANISSIAN

An almost waste-free method of L-proline isolation from the mixture of amino acids has been developed. The method is based on the ability of amino acids with primary amino group (which accompany L-proline in the reaction mixture) to form stable complexes with Cu (II)-ion and salicylic or 5-sulfosalicylic aldehydes which are immobilized on EDE-10 or AV-17 anion exchange resins.

This method given an opportunity to isolate L-proline from the mixture of accompanying amino acids almost completely in one step without using toxic or cancerogeneous substances.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Sander V. J., Hoppe Seyler's Z. — Physiol. Chem., 1967, Pd. 348, p. 852.
2. A. C. СССР № 639862, 1977.
3. Смирнов Н. Н., Волжский А. И., Константинов В. А. — Л., «Химия», 1984, с. 177.
4. Belokon' Yu. N., Tatarov V. I., Savel'eva T. F., Saparovskaja M. B., Belikov V. M. — Makromol. chem., 1986, N 167, p. 1065.