

**ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ
АРМЕНИЯ**

Հայաստանի քիմիական հանդես 51, №2, 1998 Химический журнал Армении

УДК 661 + 664 + 668,394 + 668,395 + 668,7

**НОВЫЙ МАЛООТХОДНЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ
L-ПРОЛИНА ИЗ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ**

**А. С. САГИЯН, К. И. АТАЯН, Г. Ц. ОВСЕПЯН,
А. А. ВАРДАНЯН и А. С. ЗУРАБЯН**

Научно-исследовательский институт "Биотехнология", Ереван

Поступило 25 IX 1997

Разработан малоотходный метод выделения L-пролина из смеси аминокислот, основанный на способности сопутствующих первичных аминокислот образовывать основания Шиффа с салициловым, 5-бром- и 5-сульфосалициловыми альдегидами на поверхности анионообменных смол "ЭДЭ-10п", "IRA-400" и "AB-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 7

В последнее время в связи с созданием высокоактивных штаммов-продуцентов L-пролина микробиологический метод его получения вытесняет из практики применение в производстве таких методов, как химический синтез, выделение из белковых гидролизатов и т.д.

Особенности микробиологического синтеза L-пролина обусловлены также успешным решением вопроса его выделения из ферментационных растворов, содержащих наряду с целевым продуктом и другие сопутствующие аминокислоты.

Известные в литературе методы очистки пролина можно разделить на две группы:

1) способы, основанные на способности различных соединений (пикриновая кислота, хлорендиловая кислота, пентахлорфенол и другие) избирательно связывать пролин или отдельные сопутствующие аминокислоты [1-3]; 2) способы, основанные на структурном различии иминокислоты L-пролина и первичных сопутствующих аминокислот, например, с использованием реакции дезаминирования [4,5].

Все описанные способы выделения L-пролина из смеси аминокислот не обеспечивают полной очистки пролина, технологически сложны, связаны с использованием дорогостоящих и токсичных соединений и не обеспечивают высокие выходы (5-50%) и качество целевого продукта.

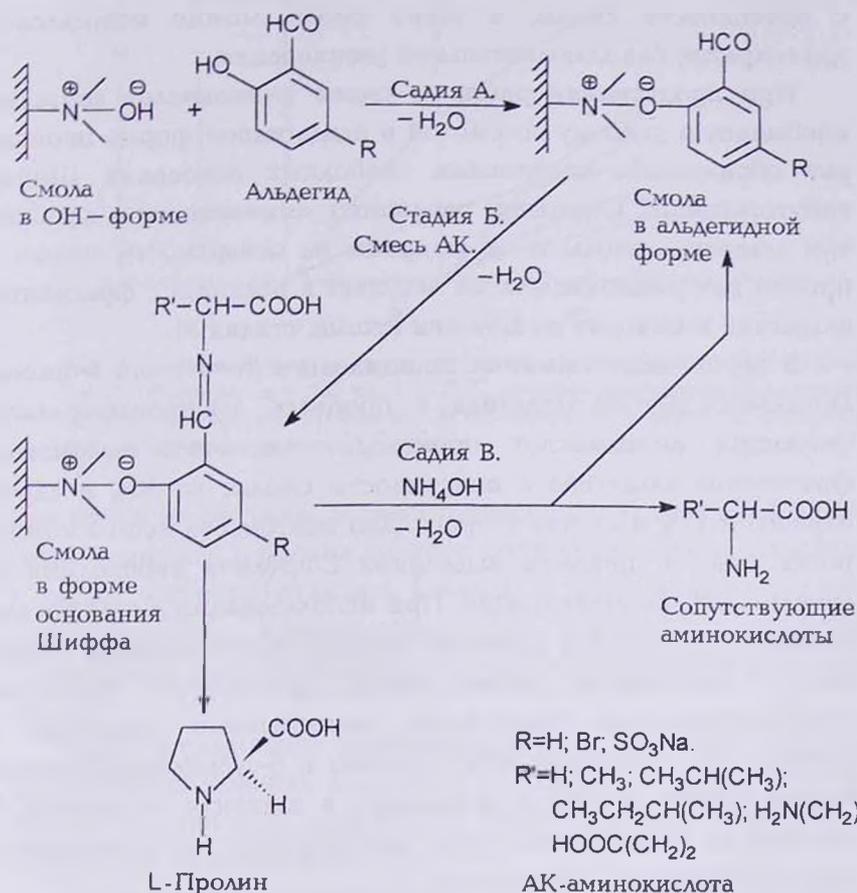
Ко второй группе методов относится также ранее разработанный метод выделения пролина из смеси аминокислот, основанный на способности первичных аминокислот, в отличие от пролина, образовывать медные комплексы оснований Шиффа с альдегидами в динамическом режиме с использованием анионообменных смол [6]. Данному способу также присущ ряд существенных недостатков: 1) использование солей меди резко уменьшает эффективную емкость смолы по альдегиду (~40%);

2) смола приобретает темно-зеленый цвет, для избавления от которого требуется длительное промывание водно-спиртовым раствором аммиака или соляной кислоты; 3) возможна нежелательная рацемизация сопутствующих аминокислот из-за высокой подвижности α -H аминокислотных фрагментов комплексов.

В настоящей работе разработан оригинальный, простой и малоотходный метод выделения L-пролина из смеси аминокислот, обеспечивающий высокие выход (94-96%) и качество (>99%) целевого продукта. Способ основан на способности первичных аминокислот образовывать стабильные свободные основания Шиффа с альдегидами в динамическом режиме с использованием анионообменных смол, четвертичные аммониевые группы которых нейтрализованы ионизированным салициловым альдегидом или его производными — 5-бром- или 5-сульфосалициловыми альдегидами.

Полный перевод ионообменной смолы в альдегидную форму достигается пропусканием через колонку с анионообменной смолой в ОН форме 1,5-2 объемов (по отношению к

объему смолы) 3-6% водно-спиртового раствора салицилового или 5-бромсалицилового альдегида, или 0,6-1,2 объемов 3-6% водного раствора 5-сульфосалицилового альдегида в направлении снизу вверх и со скоростью 0,4-0,6 объема раствора (по отношению к объему смолы) за 1 ч (схема, стадия А).



Обменную емкость смолы по альдегиду (количество альдегида на поверхности смолы) определяли исходя из количества альдегида в растворе до и после пропускания. Количественный анализ альдегидов осуществляли спектрофотометрическим методом при длине волны 250 нм (коэффициент молярной экстинкции составляет 11900 л/мол·см). В случае 5-сульфосалицилового альдегида его молекула дополнительно жестко связы-

вается с матрицей смолы за счет сильнокислотной SO_3^- группы, вследствие чего обменная емкость смолы по альдегиду уменьшается в два раза по сравнению с салициловым альдегидом. Как показали последующие эксперименты, фрагмент сульфосалицилового альдегида в процессе эксперимента не вымывается с поверхности смолы, и такие смолы можно использовать многократно без дополнительной регенерации.

При пропуске раствора смеси аминокислот через ионообменную колонку со смолой в альдегидной форме происходит образование стабильных свободных оснований Шиффа сопутствующих L-пролину первичных аминокислот с фрагментом альдегида смолы и их задержка на поверхности смолы. L-пролин как иминокислота не вступает в реакцию с фрагментом альдегида и выходит из колонки (схема, стадия Б).

В случае использования салицилового ($\text{R}=\text{H}$) или 5-бромсалицилового ($\text{R}=\text{Br}$) альдегида в процессе элюирования сопутствующих аминокислот происходит частичное вымывание фрагментов альдегида с поверхности смолы: до 30% в случае первого и 12% в случае второго. Для повторного использования таких смол в процессе выделения L-пролина необходима их дополнительная регенерация. При использовании 5-сульфосалицилового альдегида в процессе элюции сопутствующих аминокислот альдегидная форма смолы практически полностью восстанавливается; количество вытесненного альдегида в растворе не превышает 0,01%. Смолы в 5-сульфосалицилальдегидной форме можно использовать в процессе выделения L-пролина из смеси аминокислот многократно, без дополнительной регенерации (~100 циклов).

Динамические кривые выхода отдельных аминокислот с колонки в процессе выделения L-пролина из смеси аминокислот (схема, стадия Б), полученной из культуральной жидкости (ферментационный раствор микробиологического синтеза) с содержанием L-пролина — 55 г/л; L-валина — 5,1 г/л; D,L-аланина — 1,4 г/л; L-лизина — 0,9 г/л; L-изолейцина — 0,6 г/л; L-глутаминовой кислоты — 0,45 г/л представлены на рисунке.

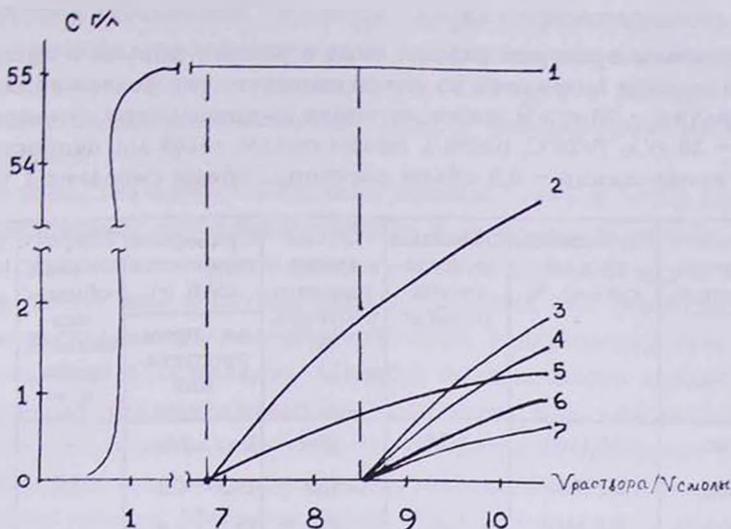


Рис. Динамические кривые выхода отдельных аминокислот с колонки со смолой АВ-17, объем смолы = 100 мл, $T = 25^{\circ}\text{C}$, скорость пропускания 50 мл раствора за 1 ч; 1) L-пролин; 2) L-валин; 3) DL-аланин; 4) L-лизин; 5) L-изолейцин; 6) L-глутаминовая кислота; 7) Глицин.

Как видно из рисунка, разработанный способ позволяет эффективно очистить L-пролин от всех сопутствующих аминокислот, а также частично отделить L-валин и L-изолейцин от других сопутствующих аминокислот, что значительно облегчает дальнейшую идентификацию отдельных сопутствующих аминокислот.

Были исследованы различные смолы (носители реакционноспособных молекул альдегида) и альдегиды (противоионы) в процессе отделения пролина от сопутствующих аминокислот. Результаты представлены в таблице.

Из полученных результатов следует, что наиболее эффективное отделение пролина от сопутствующих аминокислот с полным использованием сорбированного количества альдегида происходит в случае смолы АВ-17 в 5-сульфосалициальдегидной форме с 50% насыщением альдегидом. При полном насыщении смолы сульфосалициловым альдегидом четвертичные аммониевые группы смолы связываются только за счет сильнокислотной SO_3^{-1} группы альдегида, в результате чего нейтрализуется ионизированная α -гидроксильная группа альдегида, что

Таблица

Результаты проверки разных смол в разных формах в процессе выделения L-пролина из смеси аминокислот, содержащей L-пролин – 70 г/л и сопутствующие аминокислоты суммарно – 30 г/л, T=25°C, pH=6,3, объем смолы – 100 мл, скорость пропускания – 0,6 объем раствора/ объем смолы за 1 ч.

Смола (носитель альдегида)	Противоион (форма смолы), %	Обменная емкость смолы г-экв/л*	Объем пропу- щенного раствора, мл	Суммарное количество САК (г)		Эффек- тивная обмен- ная емкость смолы, % **	Степень очистки пролина, %
				до	после пропуска- ния		
ЭДЭ-10п	ОН ⁻ (100)	2,25	100	3	2,8	–	–
ЭДЭ-10п	Sal ⁻ (100)	2,15	450	13,5	<0,1	25	>99
ЭДЭ-10п	Sal ⁻ /ОН ⁻ (50/50)	–	450	13,5	6,8	–	49,7
ЭДЭ-10п	Sal ⁻ /ОН ⁻ (75/25)	–	450	13,5	4,5	–	67,0
ЭДЭ-10п	5-BrSal ⁻ (100)	2,1	420	12,6	<0,1	20	>99
ЭДЭ-10п	5-SO ₃ Sal ⁻ (100)	2,1	400	12	10,5	–	7
ЭДЭ-10п	5-SO ₃ Sal ²⁻ (50)	1,05	400	12	<0,1	12	>99
AB-17	Sal ⁻ (100)	0,8	450	13,5	<0,1	70	>99
AB-17	5-SO ₃ Sal ²⁻ (50)	0,4	400	12	<0,1	100	>99
IRA-400	Sal ⁻ (100)	0,9	300	9	0,5	45	94,5
Фенолфор- мальдегид- ная	Sal, ковалентно связанный по ОН группе	–	100	3	2,6	–	13,4

* – количество г-экв противоиона на поверхности смолы;

** – эффективная обменная емкость рассчитана по соотношению $E_{\text{экс.}}/E_{\text{расч.}} \times 100\%$, где $E_{\text{расч.}}$ – расчетная обменная емкость данного объема смолы, г-экв.; $E_{\text{экс.}}$ – суммарное количество связанных сопутствующих аминокислот, г-экв. САК – сопутствующие аминокислоты, Sal – салициловый альдегид.

приводит к дезактивации его карбонильной группы в реакциях образования основания Шиффа. Сильным аргументом в пользу

такого пред положения является низкая эффективность отделения пролина от сопутствующих аминокислот в случае использования ковалентно связанных по ОН-группе салицилового альдегида полимерных смол на основе фенолформальдегида и полистирола.

Из представленных в таблице данных следует, что в процессе образования оснований Шиффа с α -аминокислотами более эффективно используется емкость смолы по альдегиду в случае смолы АВ-17, чем в случае смолы ЭДЭ-10п. ИК спектроскопическое исследование поверхности смол, содержащих салициловый альдегид и основания Шиффа салицилового альдегида с первичными α -аминокислотами, показало, что эффективность смолы АВ-17 обусловлена тем, что ее матрица содержит только четвертичные аммониевые группы в качестве положительно заряженных частиц. Матрица смолы ЭДЭ-10п содержит всего 25% четвертичных аммониевых групп и примерно 75% первичных и вторичных аммониевых групп. По данным ИК спектроскопии, на поверхности смолы ЭДЭ-10п в альдегидной форме около 70% фрагментов альдегида связаны с матрицей не ионной связью за счет ионизированной гидроксильной группы альдегида, а ковалентной — за счет карбонильной группы альдегида, например, в виде основания Шиффа с первичными аминогруппами смолы, вследствие чего эти фрагменты альдегида теряют способность образовывать основания Шиффа с первичными аминокислотами.

Выходящий с колонки раствор, кроме L-пролина, содержит также минеральные соли и примеси окрашенных пигментов. Для доочистки пролина от этих примесей раствор пропускается через последовательно соединенные ионообменные колонки с анионо- и катионообменными смолами в H^+ и OH^- формах, соответственно. Полученный таким образом раствор L-пролина, имеющий значение рН 6,3, что соответствует его изоэлектрической точке, направляется на стадию водно-спиртовой кристаллизации и сушки.

Выход L-пролина на стадии отделения от сопутствующих аминокислот составляет 96-98%, а общий выход кристаллического L-пролина в расчете на его исходное содержание в культуральной жидкости микробиологического производства 83%.

Экспериментальная часть

Анализ аминокислот проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинке "Silufol" и на автоматическом анализаторе аминокислот "AAA-339". В работе были использованы аминокислоты фирмы "Reanal" (Будапешт) и производства НИИБиотехнология (РА); ионообменная смола "IRA-400" — Merck (США); салициловый альдегид, 5-бромсалициловый альдегид, смолы "AB - 17", "ЭДЭ-10п" и "Ку-2х8" — Реахим (СССР). 5-Сульфосалициловый альдегид был синтезирован по методике [7]. Регенерацию смол АВ-17, ЭДЭ-10п, IRA-400 в OH^- форме и Ку-2х8 в H^+ форме осуществляли согласно ГОСТ СССР № 10896-78, их обменная емкость составляла соответственно 0,8; 2,2; 0,9 и 1,9 г-экв/л. Анализ салицилового, 5-бром- и 5-сульфосалициловых альдегидов проводили на спектрофотометре "Specord M-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 "Specord JR-75" в таблетках с КВг. В спектре ЭДЭ-10п в OH^- форме имеются следующие полосы поглощения, ν , см^{-1} : 3427-3294 с; 2880 ср; 1641 ср; 1454 с; 1054 ср (колебания внутренней структуры смолы). В спектре ЭДЭ-10п в салицилальдегидной форме, кроме этих полос поглощения, имеются также 2280 с; 1687 с; 1643 ($\nu_{\text{C}=\text{N}}$ основания Шиффа салицилового альдегида и аминогруппы смолы); 1627 ср;

1454 с и 1267 ср ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$ и ν_{CHO} групп салицилового альдегида, связанного ионной связью со смолой).

Перевод анионообменных смол ЭДЭ-10п, АВ-17 и IRA-400 в салицил-, 5-бромсалицил- и 5-сульфосалицилальдегидные формы осуществляли пропусканием 8% водно-спиртового раствора салицилового и 5-бромсалицилового альдегидов и 5% водного раствора 5-сульфосалицилового альдегида через 100 мл смолы в OH^- форме в направлении снизу вверх со скоростью 50 мл раствора за 1 ч. Пропускание раствора продолжали до полного выравнивания концентрации альдегида в исходном и выходящем растворах. Расход салицилового и 5-бромсалицилового альдегидов при этом составлял 68 г для ЭДЭ-10п, 48 г для IRA-400 и 44 г для АВ-17, а 5-сульфосалицилового альдегида — 25 г

для ЭДЭ-10п, 10 г для IRA-400 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 — 70; L-валин — 15; L-изолейцин — 3,4; L,D-аланин — 5,8; L-лизин — 1,5; L-глутаминового кислота — 2,1 и глицин — 2,8. Используются также растворы смеси аминокислот с общим содержанием сопутствующих аминокислот, %: 5, 15, 20, 25 и 30.

Растворы аминокислот с рН 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 рН исходного раствора на эффективность процесса.

В выходящем из колонки растворе определяли количество L-пролина и сопутствующих аминокислот.

Для расчетов эффективной емкости смол пропускание раствора продолжали до сравнения суммарного количества сопутствующих аминокислот в исходном и выходящем из колонки растворах; при этом раствор чистого L-пролина собирали отдельно. Очищенный от сопутствующих аминокислот раствор L-пролина обессоливали пропусканием через 10-15 мл катионообменной смолы Ку-2х8 в H^+ форме и 20-25 мл анионообменной смолы АВ-17 в OH^- форме. Полученный раствор упаривали досуха и L-пролин кристаллизовали 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 69-98% от теоретического.

Далее смолы промывали дистиллированной водой до содержания СВ (сухие вещества) выходящего раствора <1% 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°C. Выход сопутствующих аминокислот с учетом количества возвращенного в цикл составляет 85-90%.

С целью повторного использования смол в салицил- и 5-бромсалицилальдегидных формах после элюции сопутствующих аминокислот промывали дистиллированной водой (4-5 объемов), пропускали 2-2,5 объема 8-10% водно-спиртового раствора салицилового или 5-бромсалицилового альдегида и промывали, как описано выше.

Смолы в 5-сульфосалицилальдегидной форме после элюции сопутствующих аминокислот промывали только дистиллированной водой (400-500 мл) и использовали повторно. Ощутимого уменьшения эффективной обменной емкости этих смол в процессе 5-6-кратного использования не наблюдается.

ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԽԱՌՆՈՒՐԳԻՅ Լ-ՊՐՈԼԻՆԻ ԱՆՋԱՏԱՆ ՆՈՐ ՓՈՔՐԱԾԱՎԱԼ ԹԱՓՈՆԱՅԻՆ ԵՂԱՆԱԿ

Ա. Ս. ՍԱԳՅԱՆ, Կ. Ի. ԱԹԱՅԱՆ, Գ. Ց. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ,
Ա. Ա. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ և Ա. Ս. ՋՈՒՐԱՅԱՆ

Մշակված է ամինաթթուների խառնուրդից Լ-պրոլինի անջատման փոքրածավալ թափոնային եղանակ, որը հիմնված է Լ-պրոլինին ուղեկցող առաջնային ամինաթթուների Շիֆֆի հիմք առաջացնելու ունակության վրա՝ սպիցիլային, 5-բրոմսպիցիլային և 5-սուլֆոսպիցիլային պղնձհիդրների հետ "ՅԸՅ-10Ս", "ԱԲ-17" և "ԻՐԱ-400" անիոնափոխանակման խեժերի մակերեսների վրա: Եղանակը թույլ է տալիս, առանց որևէ թունավոր և կանցբրոզեն նյութ օգտագործելու, քիմիական քանակական ելքով Լ-պրոլինը անջատելու նրան ուղեկցող բոլոր ամինաթթուներից:

L-PROLINE SEPARATION FROM THE MIXTURE OF AMINO ACIDS

A. S. SAGHIYAN, K. I. ATAYAN, G. C. HOVSEPYAN,
A. A. VARDANYAN and A. S. ZURABYAN

An almost waste-free method of L-proline separation from the mixture of amino acids has been worked out. 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 Schiff's base with salicylic, 5-bromosalicylic or 5-sulfosalicylic aldehydes, immobilized on EDE-10p, AB-17 or IRA-400 ion-exchange resins.

While the mixture of amino acids was passed through the ion exchange resins other amino acids accompanied L-proline were immobilizing on the resin surface as Schiff's bases and L-proline was separated from the column. The dynamics of the Schiff's bases formation from the primary amino acids with the aldehyde fragments have been investigated. It has been shown that the most effective separation of proline from the amino acids mixture was in case of AB-17 resin and 5-sulfosalicylic aldehyde.

IR-spectroscopy revealed that the most reactive aldehyde fragments are those, which contain the quarternary ammonium groups on the resin matrix. This accounts for low efficiency of EDE-10p resin, the surface of which contains only 25% of quarternary ammonium groups and 75% of primary and secondary ammonium groups on.

Resins with 5-sulfosalicylic aldehyde are of multiple use since 5-sulfosalicylic aldehyde is fixed on the resin by SO_3 group and can't be washed out from the resin surface.

The method developed allows to separate L-proline from the mixture of accompanying amino acids almost completely in one step without using the toxic or cancerous substances.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Пат. No359888 38 (1971), США // С.А. 1971, v.74, 6223.
- [2] Пат. No1177125 (1970), Великобритания // С.А. 1970, v.72, 794781.
- [3] *Selim A.S., Ramandan M.E.* // J. Biol. Chem., 1957, v.227, p.871.
- [4] *Levint M.S.* // J. Biol. Chem., 1959, v.234, p.1731.
- [5] Пат. No35-3371 (1955), Япония // С.А. 1959, v.352, 443с.
- [6] *Сагиян А.С., Каграманян С.Р., Овсепян Г.Ц., Джамгарян С.М., Басенян К.Е., Акопян Э.М., Григорян С.К., Селеменъев Ф.В., Капанцян Э.Е., Оганесян З.М.* // Арм. хим. ж., 1992, т.45, №3-4, с.270.
- [7] *Belokon' Yu.N., Tararov V.I., Savel'eva T.F., Saporovskaja M.B., Belikov V.M.* // Makromol, chem., 1986,