

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ВЫДЕЛЕНИЯ  
L-ПРОЛИНА ИЗ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ

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

Научно-исследовательский институт "Биотехнология", Ереван

Поступило 17 XI 1997

Оптимизированы отдельные стадии выделения L-пролина из смеси аминокислот, основанного на способности первичных аминокислот образовывать стабильные основания Шиффа с альдегидами в динамическом режиме. Исследованы смолы ЭДЭ-10п, АВ-17, АВ-18-8 и АВ-17-12п в салициальдегидной и 5-сульфосалициальдегидной формах. Показано, что эффективность отделения возрастает с увеличением процентного содержания четвертичных аммониевых групп на поверхности смолы; наилучший результат очистки наблюдается в случае смолы АВ-17-2п. Показано, что в случае смол в салициальдегидной форме эффективность метода находится в прямой зависимости от степени насыщения смолы альдегидом, а в случае смол в 5-сульфосалициальдегидной форме она возрастает до 50% насыщения смолы альдегидом. Показано, что оптимальные диапазоны pH и температуры исходного раствора пролина составляют 5,5-8,5 и 15-50°C, соответственно. Исследованы сорбция и десорбция сопутствующих аминокислот и разработан метод утилизации сопутствующих аминокислот и салицилового альдегида, вытесненного с поверхности смол в процессах выделения L-пролина и сопутствующих аминокислот.

Рис. 7, табл. 1, библ. ссылок 3.

В мире успешно развивается микробиологическое производство важной белковой аминокислоты-L-пролина, одной из ключевых стадий которого является отделение и очистка L-пролина от сопутствующих ему аминокислот. Ранее нами сообщалось

лось о малоотходном методе выделения L-пролина из смеси аминокислот, основанном на способности первичных сопутствующих аминокислот, в отличие от аминокислоты пролина, образовывать стабильные основания Шиффа с альдегидами в динамическом режиме с использованием анионообменных смол в альдегидной форме [1]. В качестве реакционноспособных молекул альдегида были использованы анионообменные смолы АВ-17, ЭДЭ-10п, IRA-400, а также ковалентно связанные смолы на основе полистирола и фенолформальдегида, а в качестве противоиона — ионизированные салициловый, 5-бром- и 5-сульфосалициловые альдегиды.

В настоящей работе сообщается о технологической оптимизации отдельных стадий этого процесса-стадии получения носителей реакционноспособных молекул альдегида, отделения L-пролина от сопутствующих аминокислот (сорбция сопутствующих аминокислот), элюции сопутствующих аминокислот (десорбция), а также утилизации ряда основных отходов производства.

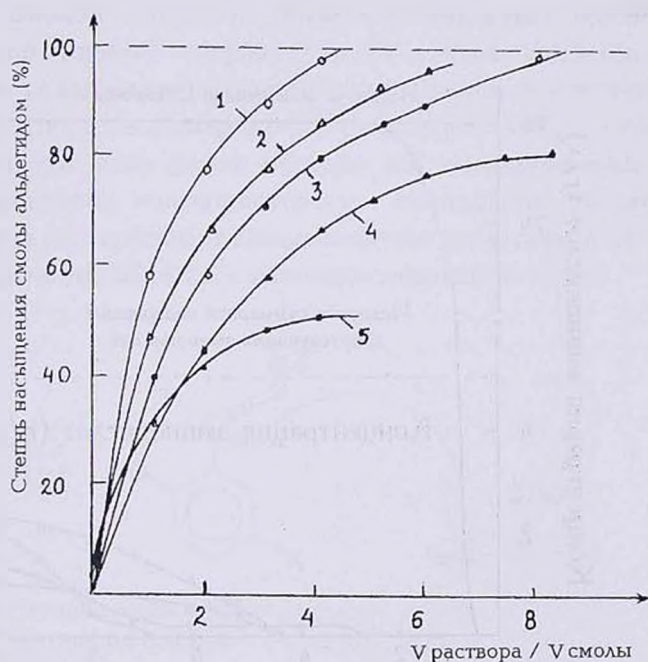


Рис. 1. Динамика насыщения смол альдегидом.

- 1) АВ-17-2п в  $\text{Sal}^-$  форме; 2) АВ-17-8 в  $\text{Sal}^-$  форме; 3) АВ-17 в  $\text{Sal}^-$  форме; 4) ЭДЭ-10п в  $\text{Sal}^-$  форме; 5) АВ-17 в  $5\text{-SO}_3\text{Sal}^2$  форме.

Ранее было показано, что процесс отделения L-пролина от сопутствующих аминокислот эффективно происходит в случае смол АВ-17 и ЭДЭ-10п [1], в связи с чем в настоящей работе исследования проводились в основном на смолах АВ-17, АВ-17-8, АВ-17-2п и ЭДЭ-10п. На рис.1 представлена динамика насыщения этих смол салициловым альдегидом при пропускании 10% раствора салицилового альдегида в смеси этанол-вода (1:1). Как видно из рисунка, эффективность сорбции салицилового альдегида увеличивается, по-видимому, с увеличением содержания четвертичных аммониевых групп на поверхности смолы. Смола ЭДЭ-10п содержит четвертичные аммониевые группы всего 30%, а в ряду смол АВ-17 наибольшая плотность четвертичных аммониевых групп наблюдается в случае АВ-17-2п [2].

Полученные смолы в салицилальдегидной форме были испытаны в процессе отделения L-пролина от сопутствующих аминокислот (аланин, валин, изолейцин, глицин, глутаминовая кислота) при соотношении пролина и сопутствующих аминокислот в сумме 80:20(%). Результаты представлены в таблице и на рис.2.



Рис.2. Динамика разделения L-пролина от сопутствующих аминокислот при разных носителях. 1) ЭДЭ-10п; 2) АВ-17; 3) АВ-17-8; 4) АВ-17-2п.

Соотношение L-пролина и всех сопутствующих аминокислот в сумме в исходном растворе составляет 80:20(%).

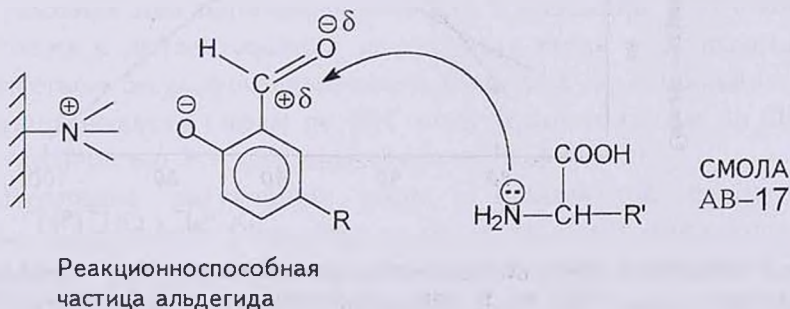
Таблица

Работоспособность различных анионообменных смол в процессе выделения L-пролина из смеси аминокислот,  $V_{\text{смолы}}=1000\text{ мл}$

| Параметры опыта<br>Тип смолы | Емкость смолы по Sal*,<br>г-экв/л, $P_0$ | Расход Sal альдегида,<br>кг | Количество сорбированных сопутствующих АК**, г/кг/л, $P_1$ | Работоспособность<br>$P_1/P_0 \times 100$ | Количество очищенного L-пролина<br>кг |
|------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|
| ЭДЭ-10п                      | 2,2                                      | 0,6                         | 0,2                                                        | 10                                        | 0,275                                 |
| AB-17                        | 0,86                                     | 0,4                         | 0,3                                                        | 35                                        | 0,275                                 |
| AB-17-8                      | 0,99                                     | 0,45                        | 0,25                                                       | 25(-80)                                   | 0,340                                 |
| AB-17-2п                     | 0,54                                     | 0,3                         | 0,44                                                       | 82                                        | 0,604                                 |

Примечание: Sal\* — салициловый альдегид, АК\*\* — аминокислота.

Как видно из данных таблицы и рис.2, наилучший результат наблюдается в случае смолы АВ-17-2п. Смола ЭДЭ-10п, обменная емкость по альдегиду (содержание альдегида на поверхности смолы) которой составляет 2,2 г-экв/л, участвует в процессе связывания сопутствующих аминокислот одинаково эффективно со смолой АВ-17 с обменной емкостью 0,6-0,7 г-экв/л. Причиной низкой эффективности смолы ЭДЭ-10п является большое содержание первичных, вторичных и третичных аммониевых групп на поверхности смолы (~70%) [2], которые, как это было показано ранее методом ИК спектроскопии [1], нецеленаправленно связываются с молекулами альдегида по карбонильной группе и инактивируют их в реакциях образования оснований Шиффа с аминокислотами по схеме.



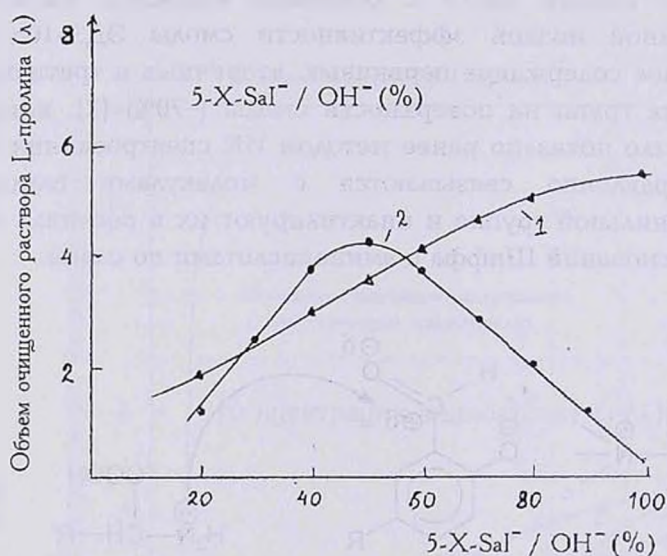
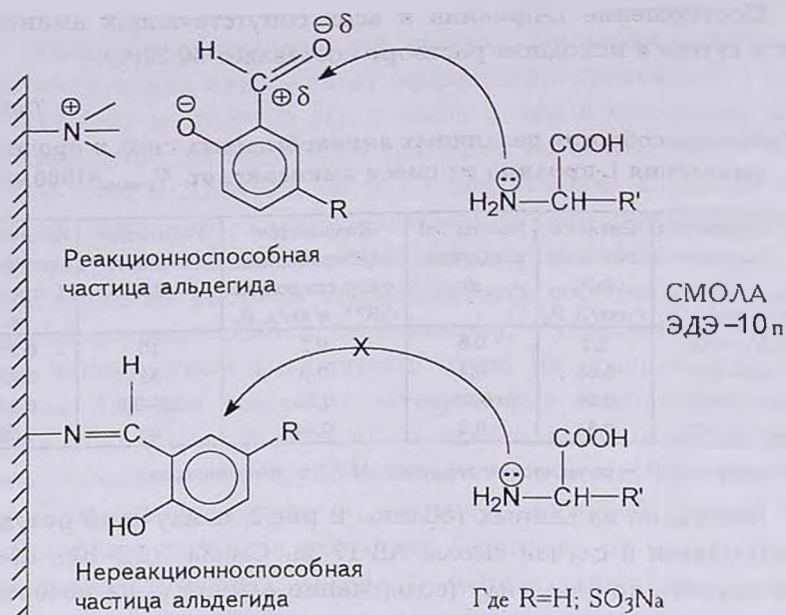


Рис.3. Зависимость эффективности очистки пролина от степени насыщения смолы альдегидом,  $V_{\text{смолы}}=1000$  мл. 1)  $\text{X}=\text{H}$ , салициловый альдегид; 2)  $\text{X}=\text{SO}_3$ , 5-сульфосалициловый альдегид.

Зависимость эффективности очистки пролина от степени насыщения смолы альдегидом представлена на рис.3. В случае салицилового альдегида увеличение процентного содержания альдегида на поверхности смолы приводит к увеличению количества очищенного раствора пролина. При использовании смол в 5-сульфосалицилальдегидной форме эффективность отделения пролина от сопутствующих аминокислот возрастает до 50% насыщения смолы альдегидом ( $5\text{-SO}_3\text{Sal}^-/\text{OH}^- = 1/1$ ). Дальнейшее увеличение содержания альдегида на поверхности смолы приводит к уменьшению эффективности отделения; при 100% насыщении смолы полностью теряют способность взаимодействовать с аминокислотами. Причина заключается в том, что до 50% насыщения смолы 5-сульфосалицилальдегидом молекула альдегида фиксируется на поверхности смолы за счет ионизированных сульфо- и гидроксигрупп. Такая фиксация приводит к увеличению реакционной способности фрагментов альдегида по отношению к реакции образования основания Шиффа, т.к.  $\alpha$ -гидроксильная группа находится в ионизированном состоянии. При увеличении количества 5-сульфосалицилового альдегида на поверхности смолы ( $5\text{-SO}_3\text{Sal}^-/\text{OH}^- > 50\%$ ) сильнокислотная сульфогруппа постепенно вытесняет ионизированную гидроксильную группу и молекула альдегида фиксируется на поверхности смолы только за счет  $\text{SO}_3$ -группы. Нейтрализация ионизированной  $\alpha$ -гидроксильной группы в этом случае приводит к инактивации карбонильной группы альдегида в реакциях образования оснований Шиффа (рис.3). Исходя из вышеизложенного на стадии получения смол в 5-сульфосалицилальдегидной форме сорбцию альдегида необходимо осуществлять в статических условиях при перемешивании или в динамике, в условиях барботажа с использованием растворов с четко рассчитанным количеством 5-сульфосалицилового альдегида по отношению к обменной емкости смолы по  $\text{OH}^-$  иону (емкость смолы по  $\text{OH}^-$  иону/количество  $5\text{-SO}_3\text{Sal}$  в растворе  $= 1/0,5$ ) (рис.1).

Испытание полученных смол в альдегидной форме в процессе отделения L-пролина от сопутствующих аминокислот показало, что после насыщения смолы аминокислотами, в первую очередь, с колонки начинает выходить смесь аланина, лизина и глутаминовой кислоты, а затем после пропускания примерно 4 объемов раствора по отношению к объему смолы

начинают выходить валин и изо-лейцин (рис.4). Причиной этого, по-видимому, является сравнительно большая стабильность оснований Шиффа валина и изо-лейцина, которые постепенно вытесняют с поверхности смолы другие аминокислоты. Эта разница, несомненно, может облегчить дальнейшую идентификацию отдельных сопутствующих аминокислот.

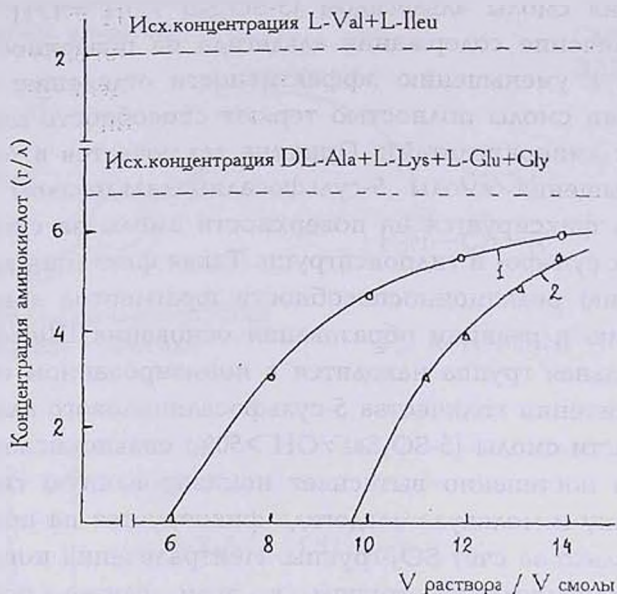


Рис.4. Кривые выхода отдельных сопутствующих аминокислот с колонки со смолой ЭДЭ-10п в  $\text{Sal}^-$  форме в процессе выделения L-пролина из смеси аминокислот (соотношение L-пролин/Σ сопутствующих аминокислот (%) = 80/20). 1) L,D-Ala + L-Lys + L-Glu + Gly; 2) L-Val + L-Ileu.

Определены также оптимальные значения pH и температуры растворов, обеспечивающих эффективное отделение пролина от сопутствующих аминокислот. Эффективное отделение L-пролина от сопутствующих аминокислот происходит при исходном значении pH раствора 5,5-8,5 и температуре 15-50°C. При значении pH раствора выше 8,5 или ниже 5,5 происходит частичное разложение свободных оснований Шиффа сопутствующих аминокислот с фрагментом салицилового альдегида смолы и наблюдается "проскок" сопутствующих аминокислот в раствор L-пролина. Неполная очистка L-пролина при температуре выше 50°C, по-видимому, связана с осмолением смолы, а при

температуре ниже  $15^{\circ}\text{C}$  — с замедлением реакции образования оснований Шиффа с первичными аминокислотами.

После вытеснения L-пролина из межгранульного пространства смолы, сопутствующие L-пролину аминокислоты элюируют (десорбируют) с поверхности смолы пропусканием 3-4 объема 4-8% водного раствора аммиака. При этом непосредственно на поверхности смолы происходит разложение оснований Шиффа и выделение сопутствующих аминокислот с одновременным восстановлением исходной салицилальдегидной формы смолы. Динамика десорбции отдельных сопутствующих аминокислот с поверхности смолы ЭДЭ-10п в салицилальдегидной форме представлена на рис.5. Аналогичные кривые десорбции сопутствующих аминокислот наблюдается в случае использования смолы АВ-17 в форме. Как видно из рис.5, наиболее эффективно десорбируются валин и изолейцин, что приводит к обогащению первых партий элюатов этими аминокислотами, и тем самым облегчает проблему их дальнейшей идентификации.

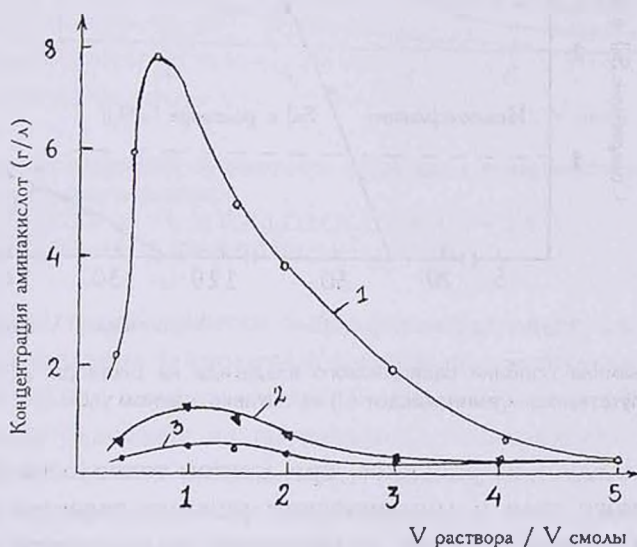


Рис.5. Динамика десорбции отдельных сопутствующих аминокислот с поверхности смолы ЭДЭ-10п в Sal форме. 1) L-Val; 2) L-Ileu; 3) L,D-Ala+L-Lys+L-Glu+Gly.

Следует отметить, что в случае использования смол в салицилальдегидной форме в процессах связывания сопутствующих аминокислот и их элюции происходит частичное вымывание

салицилового альдегида с поверхности смолы (приблизительно 10 и 35%, соответственно). С целью извлечения остатков салицилового альдегида из раствора L-пролина и сопутствующих аминокислот, что необходимо для обеспечения апиrogenности и нетоксичности продуктов, растворы L-пролина и сопутствующих аминокислот были обработаны активированным углем в динамическом режиме. Извлеченный таким образом салициловый альдегид был использован для регенерации исходной альдегидной формы смолы. Динамические кривые сорбции и десорбции остатков салицилового альдегида из растворов L-пролина и сопутствующих аминокислот представлены на рис.6 и 7.

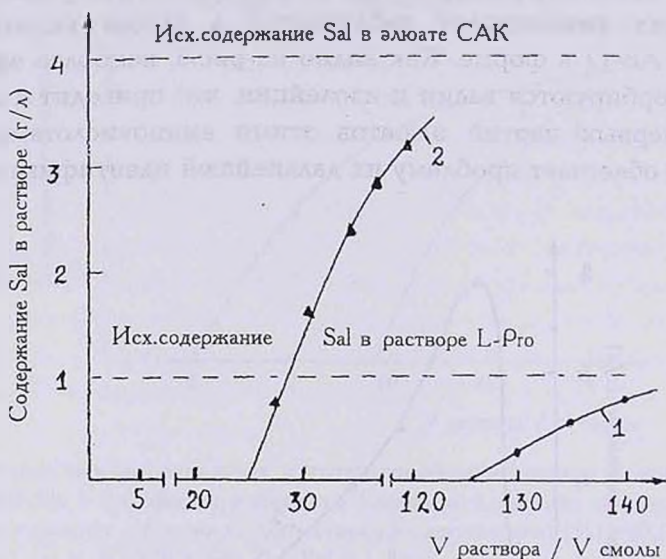


Рис.6. Динамика сорбции салицилового альдегида из раствора L-Pro. (1) и из элюата сопутствующих аминокислот (2) на активированном угле.

Как следует из рисунков, при данной технологии 1 кг активированного угля в динамическом режиме является достаточным для полной очистки от примесей салицилового альдегида растворов, содержащих 30-32 кг L-пролина и 3-3,5 кг сопутствующих аминокислот. Десорбция салицилового альдегида с поверхности угля наиболее эффективно происходит при использовании в качестве элюента смеси  $\text{CH}_3\text{COSCH}_3:\text{CH}_3\text{COOH}$  (1:1). Потери L-пролина и сопутствующих аминокислот на стадиях извлечения салицилового альдегида механические (1-

2%]. Салициловый альдегид при этом регенерируется с 98% химическим выходом и его можно использовать повторно для восстановления исходной обменной емкости смолы по альдегиду.

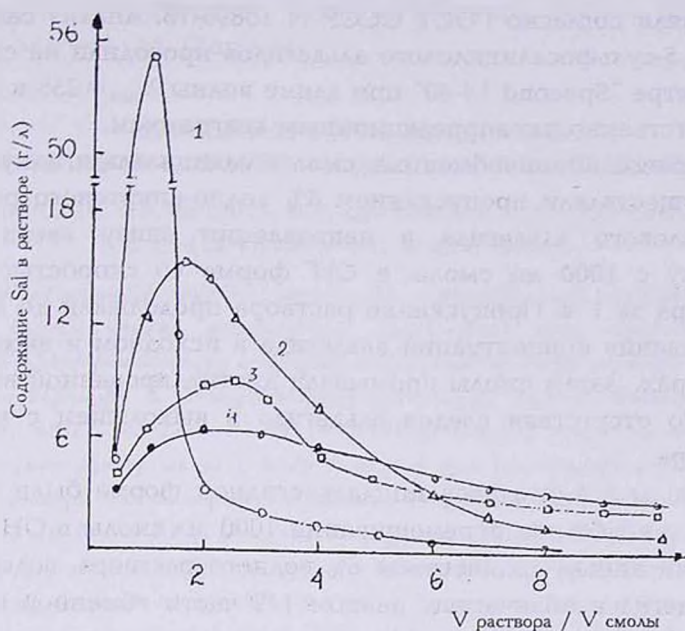


Рис.7. Динамика десорбции салицилового альдегида с поверхности активированного угля при разных элюентах.

- 1)  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}:\text{CH}_3\text{COOH} = 1:1$ ; 2)  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O} = 1:1:1$ ;  
 3)  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}:\text{NH}_4\text{OH}=1:1$ ; 4)  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}:\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=1:1:1$ .

В случае использования 5-сульфосалицилового альдегида в процессе отделения L-пролина и элюции сопутствующих аминокислот исходная емкость смолы по альдегиду не меняется, т.к. альдегидный фрагмент не вымывается с поверхности смолы и такие смолы можно использовать многократно без дополнительной регенерации.

## Экспериментальная часть

Анализ аминокислот проводили методом ТСХ на  $\text{SiO}_2$  и на автоматическом аминокислотном анализаторе "ААА-339". В работе использовались аминокислоты фирмы "Reanal" (Будапешт) и производства НИИ "Биотехнология" (РА); анионообмен-

ные смолы ЭДЭ-10п, АВ-17, АВ-17-8 и АВ-17-2п-"Реахим" (СССР),  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , активированный уголь — "Реахим" (СССР). 5-Сульфосалициловый альдегид был получен по методике [3]. Регенерацию смол в  $\text{OH}^-$  форме осуществляли согласно ГОСТ СССР N 10896-78. Анализ салицилового и 5-сульфосалицилового альдегидов проводили на спектрофотометре "Speccond M-40" при длине волны  $\lambda_{\text{max}} = 255$  и 354 нм, соответственно, по корреляционным диаграммам.

Перевод анионообменных смол в салицилальдегидную форму осуществляли пропусканием 8% водно-спиртового раствора салицилового альдегида в направлении снизу вверх через колонку с 1000 мл смолы в  $\text{OH}^-$  форме со скоростью 50 мл раствора за 1 ч. Пропускание раствора продолжали до полного уравнивания концентраций альдегида в исходном и выходящем растворах. Затем смолы промывали дистиллированной водой до полного отсутствия следов альдегида в выходящем с колонки растворе.

Смолы в 5-сульфосалицилальдегидной форме были получены в 2 л колбе при перемешивании 1000 мл смолы в  $\text{OH}^-$  форме с рассчитанным количеством 5% водного раствора, содержащего альдегид в количестве, равном  $1/2$  части обменной емкости смолы по  $\text{OH}^-$  иону.

Для изучения процесса отделения L-пролина от других аминокислот был использован стандартный раствор смеси аминокислот состава, г/л: L-пролин-76, L-валин-10, L-изо-лейцин-2,2, D,L-аланин-3,2, глицин-1,2, лизин-1 и глутаминовая кислота -1,4. Для изучения влияния pH исходного раствора на эффективность процесса исходные растворы с pH 6,3-6,6 подкисляли или подщелачивали с помощью  $\text{H}_2\text{SO}_4$  или  $\text{NaOH}$ . Эксперименты по определению оптимального диапазона температуры проводили в термостатированной колонке с рубашкой. Элюцию сопутствующих аминокислот проводили пропусканием 3-8% водного раствора аммиака через колонку в направлении сверху вниз. Извлечение примесей салицилового альдегида из раствора L-пролина и элюата сопутствующих аминокислот проводили пропусканием растворов через колонку с диаметром 100×40 см, заполненную активированным углем марки ОК-В, в направлении сверху вниз под давлением лабораторного перестатического насоса марки 501-S-50 Watson-Marlow Ltd. (England). Десорб-

цию салицилового альдегида с поверхности угля проводили пропусканьем через колонку смеси  $\text{CH}_3\text{COCH}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$  (1:1) (или смесей  $(\text{CH}_3)_2\text{CO:CH}_3\text{COOH:H}_2\text{O}=1:1:1$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO:NH}_4\text{OH}=1:1$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO:NH}_4\text{OH:H}_2\text{O}=1:1:1$ ) в направлении сверху вниз под давлением лабораторного перистатического насоса SO1-S-SO Watson-Marlow Ltd. (England).

## ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԽԱՆՈՒՐԴԻՑ Լ-ՊՐՈԼԻՆԻ ԱՆՋԱՏԱՆ ՊՐՈՑԵՍՆԵՐԻ ՕՊՏԻՄԱՅՈՒՄԸ

Ա. Ս. ՍԱՂՅԱՆ, Կ. Ի. ԱԹԱՅԱՆ, Գ. Յ. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ, Ս. Ռ. ՂԱՀՐԱՄՅԱՆՅԱՆ,  
Ա. Ա. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ և Ա. Ս. ՋՈՒՐԱՔՅԱՆ

Հիմնվելով դինամիկ ռեժիմում առաջնային ամինաթթուների ալդեհիզիդների հետ Շիֆֆի կայուն հիմքեր առաջացնելու հատկության վրա օպտիմացվել են ամինաթթուների խառնուրդից Լ-պրոլինի անջատման եղանակի առանձին փուլերը: Սալիցիլալդեհիդային և 5-սուլֆոսալիցիլալդեհիդային ձևերով հետազոտվել են EDE-10n, AB-17, AB-17-8, AB-17-2n խեժերը: Ցույց է տրվել, որ անջատման արդյունավետությունը աճում է խեժի մակերեսի վրա չորրորդային ամոնիումային խմբի տոկոսային պարունակության աճմանը զուգընթաց: Հավաքույն արդյունքը դիտվում է AB-17-2n խեժի դեպքում: Սալիցիլալդեհիդային ձևով խեժի դեպքում հյուսնակի արդյունավետությունը ուղիղ համեմատական է խեժի մակերեսի ալդեհիդով հագեցվածության աստիճանի հետ, իսկ և 5-սուլֆոսալիցիլալդեհիդային ձևով խեժի դեպքում այն աճում է մինչև 50% խեժը ալդեհիդով հագեցումը: Ցույց է տրվել, որ պրոլինի ելային լուծույթի PH-ի և ջերմաստիճանի արժեքների օպտիմալ տիրույթը 5,5-8,5 և 15-50°C է, համապատասխանաբար: Հետազոտվել է ուղեկցվող ամինաթթուների սորբցիայի և դեսորբցիայի պրոցեսների դինամիկան և մշակվել է ուսումնասիրված պրոցեսներում խեժի մակերեսից դուրս մղված սալիցիլալդեհիդի վերականգնման եղանակով:

## OPTIMIZATION OF THE PROCESS OF EXTRACTION OF L-PROLINE FROM THE MIXTURE OF AMINO ACIDES

A. S. SAGHIYAN, K. I. ATAYAN, G. C. HOVSEPYAN,  
S. R. KAHRAMANYAN, A. A. VARDANYAN and A. S. SURABYAN

Separate stages of the method of L-proline extraction from mixture of amino acids based on the properties of primary amino acids to form stable Schiff's bases with aldehyde in dynamic regime have been optimized.

The EDE-10n, AB-17, AB-17-8, AB-17-2n resins were investigated. It has been shown that the effectively of extraction increases with the increase of the content of quaternary ammonium groups on resine surface. The best results of purification were reached in case of AB-17-2n resine.

It has been shown, that in all cases when resine is in salicylaldehyde form the effectively (productivity) of the method is in direct dependence on the degree of surface saturation with aldehyde. In case of 5-sulfosalicylaldehyde the effectivity of the method rises up to 50% with the aldehyde saturation.

It has been that for L-proline initial solution pH and temperature values the optimal ranges of these parameters are 5,5-8,5 and 15-50°C, respectively.

Dynamics of by products amino sorption and desorbtion processes are investigated and a method was developed for processing salicylaldehyde that releases from the resine surface during L-proline and other amino acids extraction.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Сагиян А.С., Атаян К.И., Овсепян Г.Ц., Варданян А.А., Зурабян А.С. // Хим.ж.Армения, 1998, т.51, №2, с.87.
- [2] Лурье А.Л. Хроматографические материалы, М., Химия, 1978, с.118.
- [3] Belokon Yu.N., Tararov V.I., Saveleva T.F., Saporovskaya M.B., Belikov V.M. // Makromol chem., 1986, №187, p.1005.