

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 577.112.388.2.66.081

ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИОННОГО ПРОЦЕССА ВЫДЕЛЕНИЯ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ ИЗ ФЕРМЕНТАЦИОННОГО РАСТВОРА L-ПРОЛИНА

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

Научно-исследовательский институт "Биотехнология", Ереван

Поступило 19 II 2001

Исследован процесс отделения биомассы и других взвесей из культуральной жидкости (КЖ) L-пролина. Выяснено, что технологически приемлемым способом является подкисление КЖ серной кислотой до pH 3,0 - 3,3, дальнейшая термическая обработка при 55-60°C в течение 40 мин и центрифугирование массы при скорости вращения ротора 4500 об/мин в течение 25 мин. В статических условиях изучено влияние величины pH внешнего раствора на емкость смолы КУ-2х8 в H⁺-форме по пролину из фугата и показано, что максимальное поглощение аминокислоты наблюдается в интервале pH равновесного раствора 1,1÷1,35. Получены выходные кривые сорбции пролина из фугата в зависимости от формы нахождения смолы в ряду H⁺-Na⁺-NH₄⁺. Показано, что в исследуемой системе форма смолы при pH внешнего раствора 1,1 мало влияет на емкость смолы по пролину. Сняты изотермы сорбции пролина из синтетического раствора и из фугата на катионите КУ-2х8 и рассчитаны коэффициенты распределения пролина и сопутствующих аминокислот. Показано, что избирательность сорбции возрастает по мере увеличения числа атомов углерода в молекулах нейтральных аминокислот. Так как пролин имеет циклическую структуру, он этой закономерности не подчиняется. Установлено, что из присутствующих в фугате аминокислот наименьшей избирательностью к катиониту обладает пролин. Исследована зависимость ширины стационарного фронта сорбции иона пролина от скорости потока фугата и определен оптимальный параметр процесса.

Полученные данные могут служить основой для разработки технологии получения смеси аминокислот из КЖ пролина.

Рис. 6, табл. 1, библиографических ссылок 12.

L-Пролин находит широкое применение в пищевой и химической промышленности, медицине, сельском хозяйстве и т.д. В промышленности L-пролин в основном получают микробиологическим способом. КЖ пролина, получаемая выращиванием продуцента рода *Brevibacterium flavum* AP-113 в питательной среде, содержащей источники углерода, азота, органические и минеральные добавки, содержит до 60 г/л L-пролина и сопутствующих пролину аминокислот (L-валин, D,L-аланин, L-изолейцин, L-глутаминовая кислота, L-лизин и глицин) в суммарном количестве не более 10-15% от общего содержания аминокислот, а также биомассу, остаточный мел, сахар, пигменты, минеральные соли и другие балластные вещества. При микробиологическом способе получения аминокислот вначале из КЖ целевой продукт выделяют в виде элюата или пермеата, а затем проводят его очистку от остаточных сопутствующих веществ.

В патентной литературе в основном подробно описаны стадии очистки аминокислот, а стадия выделения из КЖ изложена поверхностно [1-4]. В литературе имеется много публикаций Селеменева [5-7] о механизме и кинетике сорбции аминокислот на ионнообменных смолах. Однако эти работы в основном проводились на растворах чистых аминокислот, а полученные в них сорбционные закономерности лишь частично воспроизводятся в технологических условиях. Исходя из этого исследование равновесия, кинетики и динамики сорбции аминокислот из технологических растворов можно считать актуальным и полученные результаты с уверенностью могут быть воспроизведены в производственных условиях.

Целью настоящей работы является исследование некоторых технологических стадий выделения смеси аминокислот из ферментационного раствора L-пролина и определение оптимальных технологических параметров процесса.

Условия эксперимента

Изотермы сорбции пролина на катионите КУ-2х8 в H⁺-форме фракцией -0,4+0,325 мм в статических условиях получали методом переменной концентрации аминокислот при соотношении раствор : катионит = 100 : 1. Время установления равновесия определяли по изменению содержания пролина в жидкой фазе.

Кинетические эксперименты в ограниченном объеме раствора при 20°C проводили в стеклянном стакане, помещенном в термостат. В крышке стакана имелись отверстия для электродов рН метра, пропеллерной мешалки и отбора проб. В 100 мл раствора быстро вносили 0,5 г (абсолютно сухой вес) навески предварительно набухшего катионита и через определенные промежутки времени отбирали пробы раствора для

определения в них содержания пролина. Объем проб, отобранных за время опыта, до установления равновесия не превышал 2%.

Выходные кривые сорбции пролина и неорганических ионов снимали на колонке с сечением 7 см^2 и высотой слоя катионита 40 см .

Скорость подачи жидкости регулировали перестатическим насосом типа "Masterflex". Подготовку катионита к работе проводили в соответствии с ГОСТ-ом 10896-78 [8]. Растворы аминокислот готовили из соответствующих препаратов фирмы "Reanal", имевших квалификацию "ч.д.а.". Использованные в работе химикаты NaOH, HCl, NaCl, KCl и аммиачная вода имели чистоту марки "х.ч." или "ч.д.а.".

Концентрацию пролина в растворе определяли спектрофотометрическим методом с использованием реакции с флерескамином и измерением поглощения образовавшегося соединения (хромофор 3 типа аминокислот) в диоксане на спектрофотометре "Specord M-40" при длине волны $\lambda_{\text{max}} - 313\text{ нм}$ [9]. Содержание пролина и сопутствующих аминокислот в растворе определяли также на автоматическом анализаторе аминокислот "AAA-339". Содержание неорганических ионов в растворе определяли атомно-абсорбционным методом на приборе "AAS-1". Солевой состав фугата составлял $0,48\text{ г-экв/л}$, а концентрация пролина – $42,0\text{ г/л}$.

Приведенные на кривых точки усреднены по данным трех опытов.

Результаты и их обсуждение

При микробиологическом способе получения биологически активных веществ первым этапом выделения является отделение биомассы и других взвесей из КЖ. Исследования показали, что сернокислотное подкисление КЖ до pH 3,0-3,3 и термическая обработка при $55-60^\circ\text{C}$ в течение 40 мин приводят к коагуляции основных взвесей из ферментационной среды. В этом процессе хорошие коагуляционные свойства проявляет образовавшийся сульфат кальция. При подкислении примеси КЖ (полисахариды, пигменты, белки), имеющие изоэлектрическую точку в этом диапазоне pH, выпадают в осадок [10]. Надосадочную жидкость от взвесей отделяли центрифугированием.

Как видно из рис.1, если в интервале pH 1÷3 концентрация ионов кальция в фугате мало изменяется, то при $\text{pH} > 3$ она резко возрастает. Повидимому, при $\text{pH} < 3$ концентрация сульфат-ионов достаточна, чтобы основное количество кальция, образовавшегося из мела, осаждалось в виде гипса. Наибольшее осадкообразование происходит при $\text{pH} < 3$. При pH фугата 3,5-6,0 вследствие ухудшения коагуляции осадкообразование в системе начинает резко уменьшаться. Технологически приемлемым способом отделения биомассы и других взвесей из ферментационного раствора L-пролина являются подкисление КЖ серной кислотой до pH 3,0-3,3, дальнейшая термическая обработка при $55-60^\circ\text{C}$ в течение 40 мин и

центрифугирование массы при скорости вращения ротора 4500 об/мин в течение 25 мин.

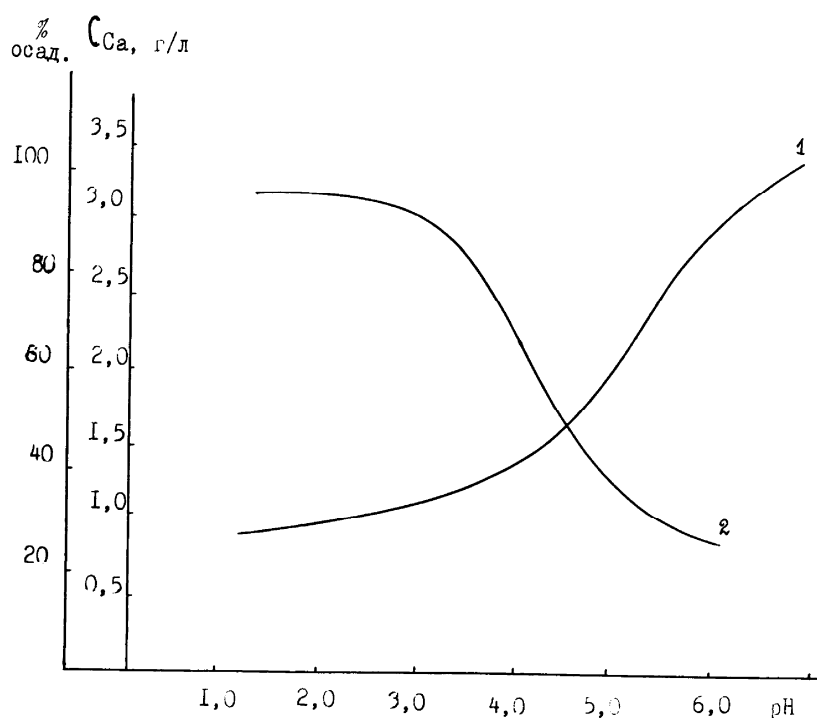


Рис. 1. Зависимость концентрации ионов кальция в фугате и процент осадкообразования от величины pH КЖ: 1 – концентрация кальция в фугате, 2 – процент осадкообразования.

Установлено, что при микробиологическом способе получения хорошо растворимых аминокислот, к числу которых относится пролин, наиболее технологичным способом отделения аминокислоты от сопутствующих примесей органического и неорганического характера является сорбция целевого продукта на сульфокатионитах [1-4].

Так как аминокислоты являются биполярными молекулами, то для эффективного осуществления процесса сорбции вначале в статических условиях определена емкость сульфокатионита КУ-2х8 в H⁺форме по пролину из фугата при различных значениях величин pH равновесного раствора (рис.2).

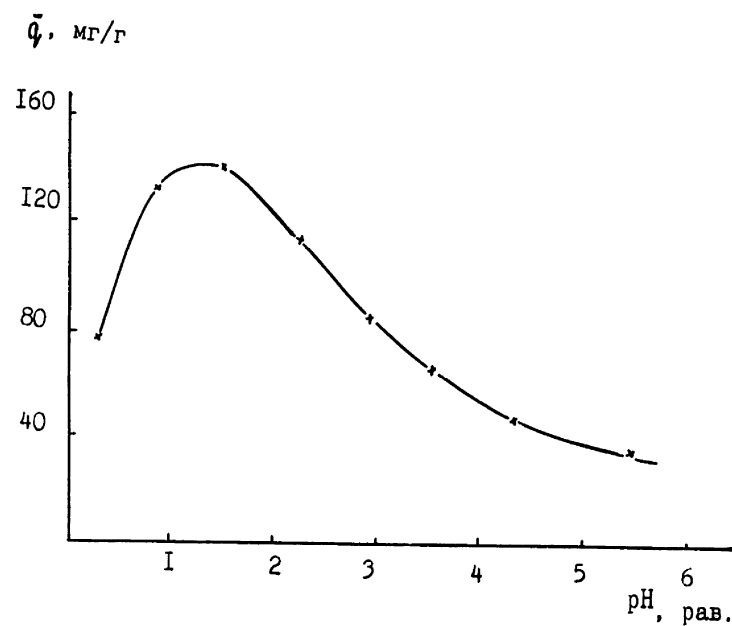


Рис. 2. Влияние величины pH раствора на емкость смолы по пролину из фугата.

Как видно из рис.2, максимальное поглощение пролина на смоле наблюдается в интервале pH равновесного раствора 1,1÷1,35. При дальнейшем снижении величины pH раствора наблюдается понижение емкости смолы по пролину, что, по-видимому, связано с конкурирующим действием водородных ионов. Снижение емкости по пролину при pH(3 связано с изменением формы пролина и конкурирующим влиянием неорганических ионов фугата.

При ионообменной очистке важное значение имеет изучение процесса сорбции в зависимости от формы нахождения смолы (рис.3).

Из рис.3 видно, что в выбранной системе до проскока пролина через один объем катионита можно пропускать до 2,45-2,75 объема фугата.

Несмотря на то, что емкость смолы по пролину до проскока в H⁺форме больше (2,75 объема), чем в NH₄⁺-форме (2,45 объема), однако технологически предпочтительно на стадии сорбции использовать смолу в NH₄⁺-форме, т.к. при этом из технологического цикла исключается стадия регенерации смолы. Это дает возможность сэкономить значительное количество соляной кислоты и деминерализованной воды для регенерации катионита, что делает процесс менее трудоемким.

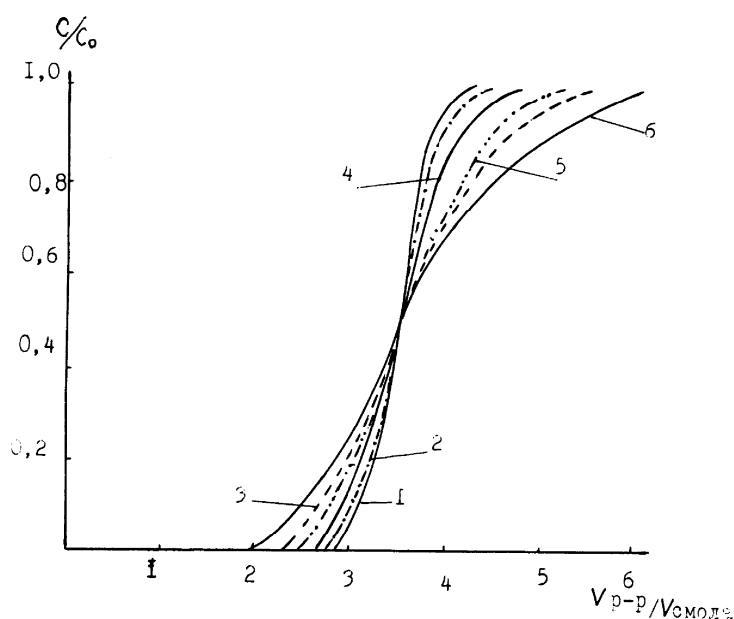


Рис. 3. Выходные кривые сорбции пролина из фугата (рН-1,1) в зависимости от формы смолы (Слин. - 0,17 м/ч, кр.1-3) и линейной скорости потока жидкости (смола в Н⁺-форме, кр.4-6) 1-Н⁺форма; 2-Na⁺форма; 3 – NH₄⁺ форма; 4 - 0,34 м/ч; 5 - 0,68 м/ч; 6 - 2,04 м/ч.

Так как фугат имеет сложный состав (неорганические ионы, заряженные и незаряженные органические соединения различной природы и т.д.) и мольное соотношение концентрации пролина к сопутствующим примесям мало, то для выяснения распределения пролина и неорганических ионов в процессе сорбции сняты их выходные кривые из фугата (рис.4). После пропускания 3,2 объемов фугата на один объем смолы катионит с той же скоростью промывался деминерализованной водой до значений величин сухих веществ (СВ) выходящей из смолы жидкости, равных нулю.

Так как в процессе сорбции, помимо электростатического притяжения, существенную роль играет дополнительное взаимодействие гидрофобной части пролина с матрицей сорбента, то фронт сорбции однозарядного иона натрия опережает фронт выхода пролина. Фронт выхода ионов калия и кальция сливается с фронтом пролина. Поэтому очистка пролина от остаточного количества этих металлов осуществляется в последующих стадиях обессоливания (рис.4).

Как показывает кр.1, фронт выхода сопутствующих пролину примесей значительно опережает фронт выхода пролина, что и дает возможность с помощью ионного обмена очистить пролин от значительного количества сопутствующих примесей органического и неорганического характера.

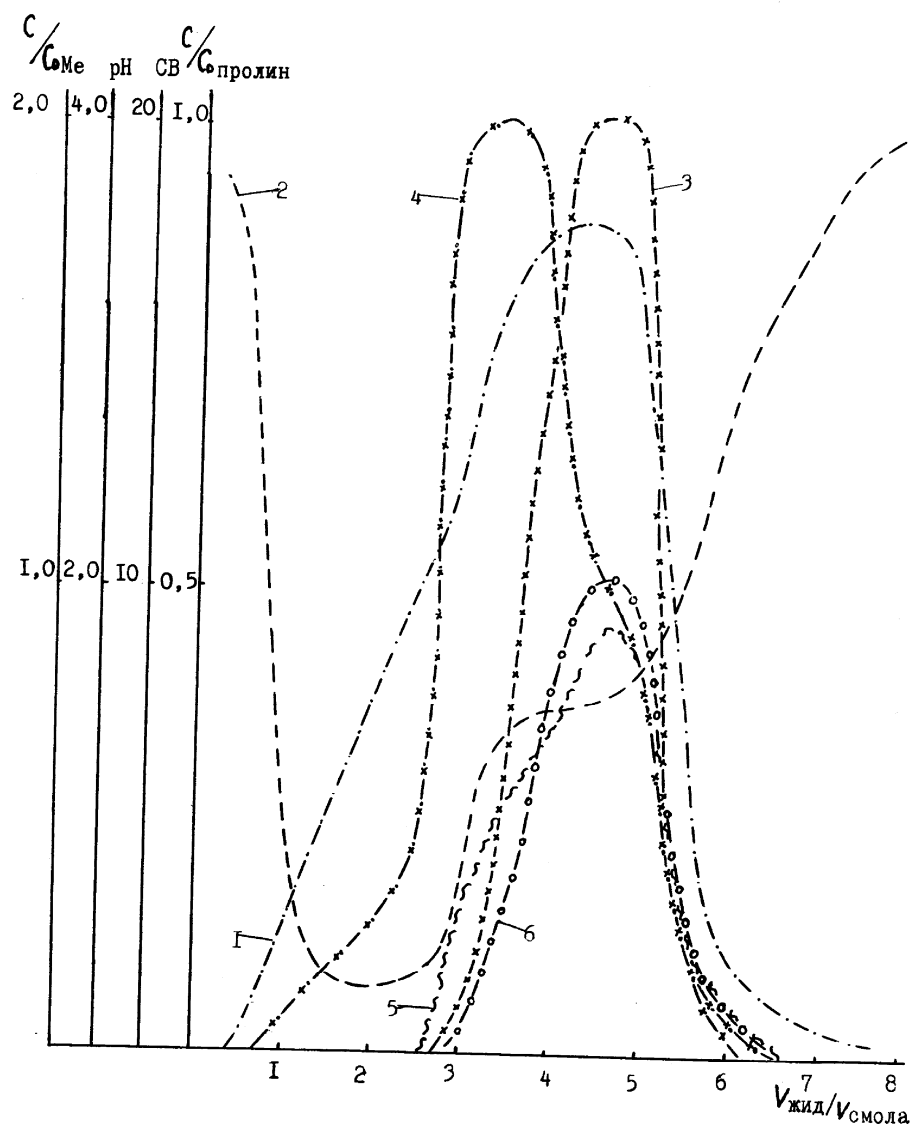


Рис. 4. Выходные кривые сорбции пролина и неорганических ионов на катионите КУ-2х8 в Н⁺форме: 1-СВ, 2-рН, 3-концентрация пролина, 4-Na⁺, 5-K⁺, 6-Ca²⁺.

Так как в начале процесса происходит и сорбция неорганических ионов, то величина рН выходящей из смолы жидкости начинает резко уменьшаться (рис.4, кр.2), а затем, когда уже смола переходит в солевую форму, сорбция пролина не приводит к уменьшению величины рН выходящей из смолы жидкости, и наоборот, рН начинает постепенно увеличиваться.

Равновесную обменную емкость катионита КУ-2х8 в Н⁺форме по пролину из чистого раствора пролина и фугата КЖ, при величине рН исходных растворов 1,1, в статических условиях определяли в виде

изотермы сорбции. На основании полученных данных были построены изотермы сорбции при температуре раствора 20°C (рис.5).

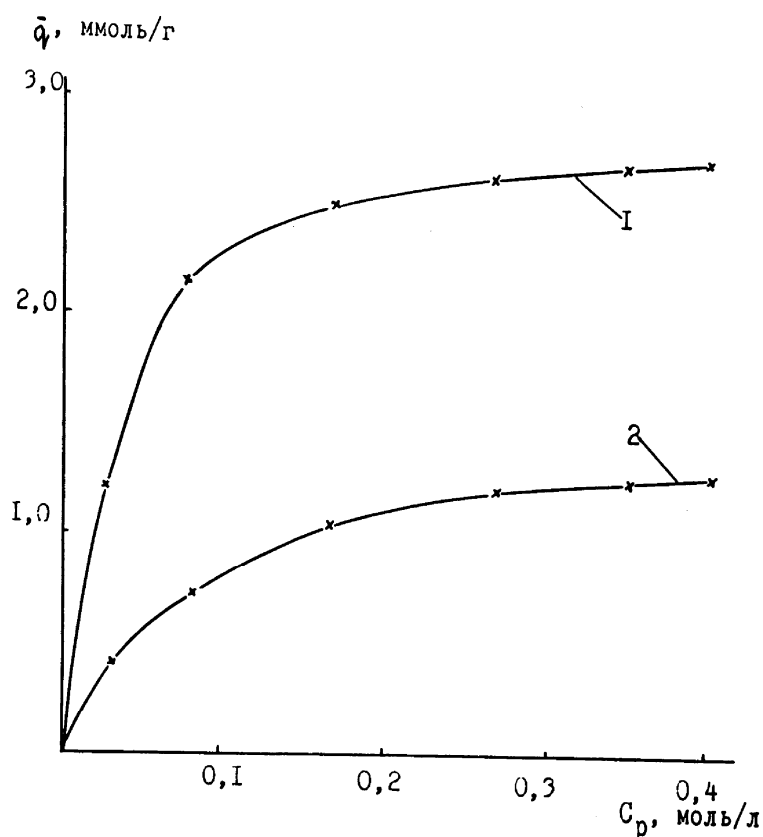


Рис. 5. Изотермы сорбции пролина: 1-из чистого раствора; 2-из фугата.

Как видно из рис.5, полученные из обоих растворов изотермы имеют выпуклую форму, что свидетельствует об избирательности процесса сорбции [11].

Из зависимости сорбционной способности катионита от равновесной концентрации пролина следует, что во всех исследуемых равновесных концентрациях пролина наблюдается возрастание сорбции.

Если при 0,4 ммоль/л равновесной концентрации пролина в растворе емкость смолы по пролину из чистого раствора пролина 2,7 ммоль/г, то из фугата – 1,23 ммоль /г. Уменьшение емкости смолы по пролину обусловлено конкурирующим влиянием водородных ионов и присутствующих в фугате различного рода сопутствующих примесей.

На основании данных равновесных опытов были рассчитаны коэффициенты распределения (K_d) находящихся в фугате аминокислот на катионите (табл.).

**Величины коэффициента распределения аминокислот при сорбции
из фугата на катионите КУ-2х8**

Аминокислоты	Kd
Пролин	1,45
Лизин	11,4
Глутаминовая кислота	1,77
Глицин	4,03
Аланин	4,26
Валин	4,45
Изолейцин	5,5

Как видно из таблицы, самой меньшей избирательностью к катиониту обладает пролин.

Приведенные величины Kd аминокислот показывают, что насколько длинее углеродный радикал в молекуле нейтральной аминокислоты, настолько селективнее происходит ее сорбция на катионите. А т.к. с помощью сорбции на сульфокатионите невозможно очистить пролин от сопутствующих аминокислот, то вначале нужно осуществлять выделение из КЖ смеси аминокислот, а затем проводить очистку пролина от остаточных сопутствующих примесей. Для эффективного проведения процесса сорбции большое значение имеют скорости процесса. Для характеристик скорости процесса сорбции методом ограниченного объема были получены кинетические кривые: $F=f(t)$. Степень превращения F вычисляется как отношение продифундировавшего за время t вещества в шарообразную частицу (R_t) к равновесному количеству поглощенного вещества ($R()$).

Кинетические кривые сорбции сняты как из фугата КЖ пролина, так и из индивидуально пролинсодержащего солевого раствора с ионной силой 0,7 и 2,0. Ионная сила раствора создавалась с помощью хлорида натрия (рис.6). Увеличение ионной силы раствора пролина приводит к замедлению скорости сорбции. Процесс сорбции пролина при pH внешнего раствора 1,1 во всех случаях происходит достаточно быстро, и в выбранной системе за 10 мин в процессе устанавливается сорбционное равновесие.

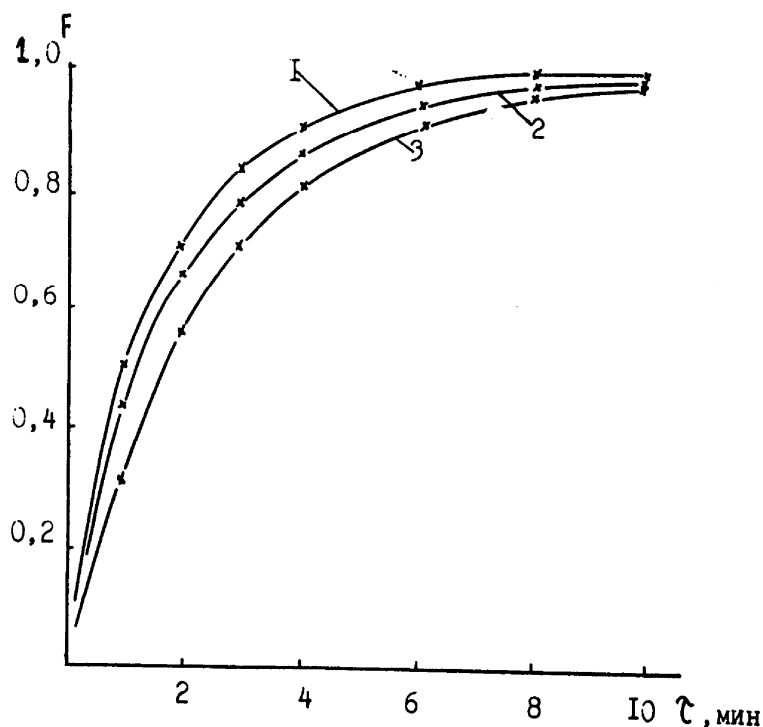


Рис. 6. Кинетические кривые сорбции пролина: 1- раствор пролина с ионной силой 0,7, 2 - фугат КЖ пролина, 3 - раствор пролина с ионной силой 2,0.

Исследование скорости сорбции пролина на катионите КУ-2х8 в H^+ -форме в зависимости от гидродинамического режима показало, что увеличение скорости перемешивания раствора от 90 ($R=480$) до 800 $об/мин$ ($R=4200$) практически не оказывает влияния на скорость сорбции. Последующие опыты проводились при скорости вращения мешалки 350 $об/мин$, т. к. в этом случае интенсивность перемешивания не влияет на толщину пленки раствора, окружающей зерно катионита.

Для определения механизма сорбции был использован метод прерывания процесса. Опыты показали, что скорость обмена после прерывания в начальный момент больше, чем перед прерыванием. Это свидетельствует о том, что стадией, определяющей скорость всего процесса, является диффузия ионов внутри зерна сорбента (гелевая кинетика).

По экспериментальным кинетическим данным были рассчитаны коэффициенты диффузии пролина по уравнению Паттерсона [12]. Расчеты показали, что величины коэффициента диффузии иона пролина в фазе смолы при различных степенях заполнения лежат в пределах $7,5 \times 10^{-7} \div 4,6 \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$.

Полученные величины коэффициента диффузии и коэффициента распределения можно использовать как для описания теоретических выходных кривых, так и для моделирования сорбционного процесса.

Ввиду того, что процесс сорбции пролина из фугата проводится в динамических условиях, изучено влияние скорости потока раствора на показатели сорбции.

Как известно, характер формирования фронта сорбции определяется формой изотермы ионного обмена [11]. В случае выпуклой изотермы образуется стационарный фронт, перемещающийся вдоль колонки с постоянной скоростью.

Выходные кривые сорбции пролина при различных скоростях потока (рис.3) показывают, что в исследованном интервале с уменьшением скорости пропускания фугата заостряется фронт поглощения и увеличивается емкость смолы по пролину до проскока.

Технологически приемлемой скоростью потока раствора при сорбции является 0,17 м/ч, т. к. скорость (меньше этой величины) может привести к нарушению стационарности фронта сорбции и к плохой отмывке зерна смолы от остаточных взвесей фугата.

Насыщенная пролином смола промывается деминерализованной водой до значений pH выходящей из смолы жидкости, равной 3,8÷4,0 и СВ равной нулю. Сорбированные аминокислоты из фазы смолы элюируются 40%-раствором аммиака.

Исследования показали, что при элюции 85%-я сорбированная пролином смола накапливается в 0,6 объема смолы жидкости. При сравнении с исходными –угатом (концентрация пролина – 4 г/л СВ – 1 у) и концентрация пролина в собранном элюате в 4–5 раз меньше. Установлены значения изменения величин СВ в зависимости от концентрации пролина в элюате при сравнении с тем же изменением в исходном –угате и уменьшался примерно в 4–5 раз. Это свидетельствует о том, что на стадии ионного обмена удалось уменьшить примерно в 10 раз присутствующие примеси.

Поскольку в начале процесса элюции аммиачный раствор расходуется в основном для нейтрализации катионов пролина и других присутствующих аминных групп в избытке, в хвосте из смолы жидкость величина рН равномерно возрастает, переходя от 5 к 7. Завершается процесс нейтрализации катионов аминных групп и начинается вместе с аминными группами в хвосте раствор аммиака. рН элюата резко возрастает (11,8÷12,0), а значение СВ элюата снижается до 1,5÷1,0. Изменение этих двух показателей свидетельствует о завершении процесса элюции аминокислот.

Для освобождения от избытка аммиака собранный аммиачный элюат смеси аминокислот подвергается вакуум-упариванию при 60°C и остаточном давлении 0,1 МПа до содержания СВ упаренного раствора 23–25%.

Из упаренного раствора распылительной сушкой для сельскохозяйственных нужд можно получить технические кристаллы смеси аминокислот.

Получение чистых кристаллов L-пролина из упаренного элюата смеси аминокислот проводятся обесцвечиванием, обессоливанием, а окончательную очистку пролина от остаточных сопутствующих аминокислот можно осуществлять одним из способов, указанных в работах [1-4].

L-ՊՐՈԼԻՆԻ ՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ԼՈՒԾՈՒՅԹԻՑ ՍՈՐԲՅԻՈՆ ԵՂԱՆԱԿՈՎ ԱՄԻՆԱԹՔՎԱՅԻՆ ԽԱՌՆՈՒՐԴԻ ԱՆՁԱՏՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա. Ե. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Կ. Ի. ԵՂՅԱՆ, Ա. Ս. ՍԱԴՅԱՆ և Գ. Ժ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է L-պրոլինի կուլտուրալ հեղուկից (Կ.Հ.) կախությոնների անջատման պրոցեսը ու որոշվել օպտիմալ տեխնոլոգիական պարամետրերը: Ստատիկ պայմաններում ուսումնասիրվել է արտաքին լուծույթի pH-ի մեծության ազդեցությունը ֆուգատից ըստ պրոլինի KY-2x8 H⁺ ձևի կատիոնիտի տարողության վրա ու ցույց է տրվել, որ ամինաթթվի մաքսիմալ կլանումը նկատվում է հավասարակշռային լուծույթի pH-ի մեծության 1,1÷1,3 տիրույթում: Ստացվել են ֆուգատից պրոլինի կլանման ելքի կորերը կախված խեժի գտնվելու ձևից H⁺ - Na⁺ - NH₄⁺ շարքում ու ցույց տրվել, որ հետազոտվող համակարգում արտաքին լուծույթի pH-ի մեծության 1,1 արժեքի դեպքում կատիոնիտի ձևը քիչ է ազդում խեժի տարողության վրա ըստ պրոլինի: Մինթետիկ լուծույթից ու ֆուգատից KY-2x8 կատիոնիտի վրա հանվել են պրոլինի սորբցիայի իզոթերմ կորերը ու հաշվել պրոլինի և ուղեկցող ամինաթթուների բաշխման գործակիցները: Ուսումնասիրվել է պրոլինի իոնի սորբցիայի ստացիոնար ճակատի լայնքի կախվածությունը խեժով ֆուգատի բացթողման արագությունից ու որոշվել պրոցեսի օպտիմալ պարամետրերը: Ստացված տվյալները հիմք կհանդիսանան պրոլինի Կ.Հ. ամինաթթվային խառնուրդի ստացման տեխնոլոգիայի մշակման համար:

THE INVESTIGATION OF THE SORPTION PROCESS OF ISOLATION OF AMINO ACIDS MIXTURE FROM THE ENZYMATIC SOLUTION OF L-PROLINE

A. E. AGHAJANYAN, K. I. YGIAN, A. S. SAGHIYAN and G. J. OGHANISYAN

The process of separation of biomass and other suspensions from L-proline cultural liquid is investigated and it is found out that the technologically acceptable method is the addition of sulfuric acid to pH 3.0-3.3, the further thermal processing at 55-60⁰ during 40 min and centrifugation by the speed of rotor – 4500 turns/min during 25 min. The influence of the pH-value of the external solution in the stationary conditions on the capacity of KU-2x8 resin in the H⁺-form by proline is investigated and it is shown that the maximum of amino acid absorption is observed at the pH 1.1-1.35.

The proline sorption curves in independence of resin form ($H^+-Na^+-NH_4^+$) are obtained and it is shown that the form of resin has little influence on the resin capacity by proline at the pH-value of external solution equal to 1.1.

The proline sorption isotherms from synthetic solution and supernatant on the KU2×8 Cation-exchange resin are obtained and the coefficients of Proline and accompanying amino acids' distribution are calculated.

It is shown that the selective sorption is increased by increasing the number of Carbon-atoms in the amino acid molecules. As proline has cyclic structure, it is not subject to this rule.

L-Proline has the smallest selectivity to the cation-exchange resin from the supernatant's amino acids.

The stationary front width of proline-ion sorption in dependence of the rate of supernatant flow is studied and the optimal parameters of the process are defined.

The data obtained can be used as the basis for the working out of the technology for obtaining of aminoacids mixture from the cultural liquid of proline.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Наотакэ С., Тфкеказу А., Набору И.* Пат. №3598838 (1971) США // С.А. 1971, v.74, p.6223.
- [2] *Сагиян А.С., Джемгарян С.М., Акопян Э.М.* А.с. №1464436 (1988) // Б.И. 1989, №9, с.255.
- [3] *Сагиян А.С., Арзуманов Е.Н., Аветисян А.Х., Акопян Э.М., Агаджанян А.Е., Мурадян А.Г.* А.с. N1300941 (1985) // Б.И. 1987, №12, с.266.
- [4] *Мурадян А.Г., Агаджанян А.Е., Акопян Э.М., Карабеков Б.П.* А.с. №1504978 (1989) // Б.И. 1989, №32, с.260.
- [5] *Котова Д.Л., Селеменев В.Ф., Крысанова Т.А., Зяблов А.Н.* // ЖФХ, 1998, т.72, №9, с. 1976.
- [6] *Матвеева М.В., Лепехина С.Г., Селеменев В.Ф.* // Теория и практика сорбционных процессов, 1999, №24, с.76.
- [7] *Селеменев В.Ф., Котова Д.Л., Крысанова Т.А.* // Теория и практика сорбционных процессов, 1998, №23, с.103.
- [8] ГОСТ 10896-78 Иониты. Подготовка к испытанию, 1978.
- [9] *Toome V., Manhart K.* //Analytical Letters, 1975, v.8 (7), p.441.
- [10] *Toyohi S., Tanegawa T., Sacki M., Kawakita G.* Пат. N4523999 (1986) США // РЖХ 1986, 5 О 194П.
- [11] *Гельферих Ф.* Иониты Основы ионного обмена. М, ИЛ, 1962, с.490.
- [12] *Paterson S.* //Proc. Phys. Soc., 1947, v.59, p.50.