

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 547.466.25:532.78

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ВАЛИНА ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

А. Е. АГАДЖАНЫН, Г. Ж. ОГАНЕСЯН и Е. А. АГАДЖАНЫН

Научно-исследовательский институт “Биотехнология”, Ереван

Поступило 6 IX 2000

Для очистки валина от сопутствующих аминокислот изучена его растворимость в соляной кислоте в зависимости от ее концентрации и температуры раствора и получены кривые растворимости.

Исследованы процессы кристаллизации технических кристаллов валина из раствора соляной кислоты в зависимости от концентрации кислоты, соотношения твердой и жидкой фаз (т:ж) и количества используемого хлорида натрия. Изучено влияние температуры раствора на процесс изогидрической кристаллизации валина из солянокислого раствора и определены оптимальные параметры процесса. На основании полученных данных разработана технология выделения и очистки валина из культуральной жидкости микробного синтеза.

Рис. 2, табл. 1, библиограф. ссылок 15.

Валин находит широкое применение в пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве и т. д. [1]

В промышленности L-валин в основном получают микробиологическим способом. Культуральная жидкость (КЖ) валина, получаемая путем выращивания продуцента в питательной среде, содержащей источники углерода, азота, а также минеральные и органические добавки, помимо целевого продукта, содержит также сопутствующие аминокислоты. Если очистка валина от некоторых из них (аланин, лизин, глутаминовая кислота, пролин) не вызывает сложности, то очистка от лейцина, который по физико-химическим показателям схож с валином, создает большие

трудности. Ввиду того, что формы кристаллов валина и лейцина пластинчатые и такие кристаллы обладают большой поверхностной активностью, то прямой кристаллизацией трудно осуществлять их разделение [2,3].

Технологические показатели по выделению и очистке валина из КЖ, а также его отделению от сопутствующих нейтральных аминокислот в основном в неполном объеме приводятся в патентной литературе.

Известен способ разделения валина от лейцина или изолейцина центрифугированием раствора смеси валина и указанных аминокислот в системе вода-спирт(C₈-C₄). В результате этого происходит экстракция валина водой с последующим отделением органического слоя и выделением валина [4].

Запатентован способ получения кристаллического валина [5], основанный на взаимодействии валиносодержащего водного раствора с *n*-изопропилбензолсульфоновой кислотой или ее солями в водной среде с последующим отделением образующихся кристаллов и выделением валина.

Изучена экстракция валина из солевых водных растворов жидким сульфокатионитом – раствором динонилнафталинсульфокислоты в гептане. Рассчитано количество экстрагированного валина и определены условия его оптимальной экстракции и реэкстракции [6].

В работах [4, 6] отделение валина осуществляется в системе вода–органический растворитель, что создает дополнительные трудности, связанные с регенерацией органических растворителей; а в работах [5,6] выделение валина проводят из индивидуально чистого раствора.

Предложен способ выделения и очистки валина из водного раствора, содержащего, кроме валина, кислые аминокислоты, сульфаты, хлориды и краситель. Способ заключается в предварительной обработке ферментационного раствора кислотой или щелочью до pH 5,9 и последующей хроматографией на колонке с катионообменной смолой. Указанным способом невозможно очистить валин от лейцина [7].

Кристаллизация из раствора соляной кислоты позволяет отделять валин от лейцина [8], а также изолейцин от лейцина, треонина, аргинина, валина, лизина и глутаминовой кислоты [9].

Изучены условия разделения гидрохлорида D,L-валина на оптические антиподы [10].

Из вышеуказанных литературных данных следует, что с технологической точки зрения предпочтительно очистку валина от сопутствующих аминокислот осуществлять кристаллизацией технических кристаллов из раствора соляной кислоты с отделением гидрохлорида валина.

В вышеприведенных работах недостаточно отражены технологические параметры процесса кристаллизации (температура, соотно-

шение твердой фазы к жидкой, концентрация соляной кислоты и т. д.). Кроме того, отсутствуют данные о растворимости L-валина в растворе соляной кислоты в зависимости от концентрации кислоты и температуры раствора.

Данные о растворимости лейцина и изолейцина в соляной кислоте в зависимости от концентрации кислоты приведены в работе [11].

Целью настоящего исследования является определение указанных технологических показателей процесса выделения и очистки, что позволит значительно уменьшить количество используемых химикатов и повысить выход L-валина.

В работе [8] кристаллизацию технических кристаллов валина проводят в среде концентрированной соляной кислоты, при этом выход L-валина на стадии выделения и очистки из КЖ составляет 37%.

Экспериментальная часть

Растворимость L-валина в растворе соляной кислоты изучалась выдерживанием в термостате с периодическим отбором жидкой фазы для анализа на содержание валина. Опыты проводились в стеклянном кристаллизаторе емкостью 0,5 л, снабженном рубашкой, обратным холодильником и мешалкой. К 200 мл раствора соляной кислоты соответствующей концентрации добавлялось такое количество кристаллов валина, чтобы после установления равновесия оставались нерастворенные кристаллы ($\geq 0,5$ л), которые от раствора отделяли фильтрацией. При фильтрации во избежание кристаллообразования воронку и приемник термостатировали. Осадок отжимали, высушивали и взвешивали.

Содержание валина и сопутствующих аминокислот в растворе определяли с помощью аминокислотного анализатора “ААА-881” (ЧССР) [12] и спектрофотометрически [13].

Исследование влияния температуры на процесс изогидрической кристаллизации валина из солянокислого раствора технических кристаллов проводили путем отбора проб жидкой фазы раствора с интервалом температуры в 5°C. Перед отбором проб перемешивание раствора прекращалось на 2 мин. За это время верхняя часть объема раствора очищалась от кристаллов, что давало возможность отобрать пипеткой жидкую фазу. В случае плохого расслоения массы использовали пипетки, снабженные фильтром для отделения твердых частиц.

Приведенные на кривых и в таблице экспериментальные данные являются средними по трем опытам.

В работе использовались аминокислоты фирмы “Reanal” (Будапешт) и производства НИИ “Биотехнология” (РА); ионообменные смолы КУ-2-8,

ЭДЭ-10П, “Реахим” (СССР), NH_4OH , NaOH , HCl , NaCl , активированный осветляющий уголь марки ОУ-А “Реахим” (СССР).

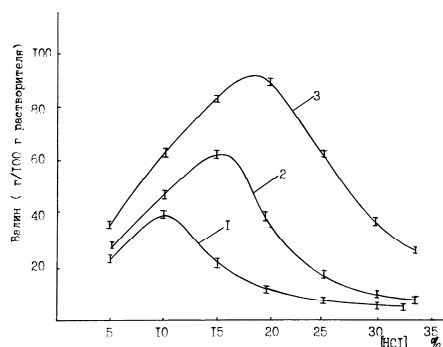


Рис. 1 Кривые растворимости валина в растворе соляной кислоты в зависимости от температуры раствора и концентрации кислоты, °C: 1 – 20; 2 – 50; 3 – 80.

Результаты и обсуждение

Экспериментальные результаты по растворимости валина в соляной кислоте в зависимости от концентрации кислоты и температуры раствора приведены на рис. 1.

Как видно из полученных кривых, с повышением температуры раствора в интервале от 20 до 80°C растворимость валина с ростом концентрации кислоты увеличивается до определенного предела, после чего уменьшается. Уменьшение растворимости валина с повышением концентрации кислоты, по-видимому, обусловлено солевым эффектом. Максимальная растворимость валина при 80°C происходит при концентрации кислоты, равной 17-20, при 50°C – 15-17, а при 20°C – 8,5-12%.

Из полученных кривых и из кривых растворимости лейцина [11] следует, что кристаллизацию технических кристаллов валина из раствора соляной кислоты нужно осуществлять методом изогидрической кристаллизации. Причем при кристаллизации технических кристаллов оптимальная концентрация кислоты, необходимая для отделения валина от лейцина, находится в интервале 14-19%.

Для исследования процесса кристаллизации из КЖ технические кристаллы валина выделяли путем отделения биомассы и примесей высокомолекулярных частиц микрофльтрацией с последующим вакуум-выпариванием образовавшегося пермеата до содержания сухих веществ (СВ) 40-43% и водной кристаллизацией.

Содержание валина в полученных технических кристаллах составляло от 50 до 55, лейцина – от 2,0 до 2,6, сумма других сопутствующих аминокислот – до 20%, а остальное – балластные вещества органического характера и минеральные соли.

Очистку валина от сопутствующих аминокислот и примесей неаминокислотного характера проводили кристаллизацией из соляной кислоты при различных соотношениях твердой фазы к жидкой и валина к хлор-иону. В качестве источника иона хлора использовали растворы соляной кислоты и кристаллы хлорида натрия.

Кристаллизацию из раствора соляной кислоты осуществляли растворением технических кристаллов валина и хлорида натрия в растворе соляной кислоты соответствующей концентрации при температуре 70-75°C. После растворения температуру массы снижали до 55-60°C и для освобождения от нерастворенных балластных веществ массу подвергали фильтрации. Фильтрат переносили в кристаллизатор и температуру снижали со скоростью 0,4°C/мин до 5°C, суспензию при этой температуре перемешивали 1,0-1,5 ч. Перемешивание раствора, помимо того, что способствовало образованию зародышей кристаллов, помогало раствору быстрее достигать изотермического состояния по всему объему, что создавало условия равномерного формирования и роста кристаллов гидрохлорида валина в кристаллизаторе [14]. Выпавшие кристаллы от раствора отделяли фильтрацией и промывкой охлажденным до 10°C 20% раствором соляной кислоты. Экспериментальные результаты приведены в таблице.

Как видно из таблицы, при кристаллизации технических кристаллов валина в 17 % растворе соляной кислоты лучшие результаты можно получить при соотношении твердой фазы к жидкой от 1,21 до 1,36. При этом одному молю валина соответствует от 2,0 до 2,2 г-ионов хлора (опыты 2,3,5). Оптимальное количество хлорида натрия, необходимое для смешивания с техническим кристаллом, при кристаллизации составляет 10%. Такое количество соли, с одной стороны, обеспечивает поддержание оптимальной концентрации ионов хлора в растворе и, с другой стороны, за счет солевого эффекта в маточном растворе уменьшается содержание валина. Так, например, в отличие от 3 опыт 4 проводили без использования хлорида натрия, что привело к увеличению концентрации валина в маточном растворе примерно в 2 раза. За счет этого выход валина в опыте 3 получился больше. Аналогичные закономерности наблюдались также в опытах 9 и 10, а также 11 и 12. Более наглядно это видно в опытах 4 и 5, т. к. при этом исходные навески кристаллов были взяты в большом количестве и механические потери мало влияли на результаты экспериментов.

Таблица

**Результаты кристаллизации технических кристаллов валина
из раствора соляной кислоты**

Опы- ты	Навеска тех- ниче- ских крис- таллов, г	Расход HCl, мл	Кон- цент- рация HCl, %	Расход NaCl от массы исход- ных кри- стал- лов, %	Соот- ноше- ние т:ж	Соот- ноше- ние валин/ хлор, моль/ г-ион	Вес гидро- хло- рида- валина, г	Содер- жание валина в ма- точ- нике, г/л	Выход валина, %
1	30	54	17	10	1:1,63	1:2,5	12,6	85,0	64,0
2	30	45	17	10	1:1,36	1:2,22	13,5	66,5	68,6
3	30	40	17	10	1:1,21	1:1,96	13,65	64,3	68,9
4	300	400	17	0	1:1,33	1:1,56	118,8	110,0	60,3
5	250	333,5	17	10	1:1,21	1:1,96	116,7	62,5	71,2
6	30	105	20	0	1:3,5	1:4	13,08	58,0	66,5
7	30	105	10,5	0	1:3,5	1:1,95	—	130,0	—
8	30	54	10,5	12	1:1,6	1:1,38	12,15	75,0	61,7
9	30	60	14	15	1:1,74	1:2	12,8	64,5	65,0
10	30	54	14	10	1:1,63	1:1,95	12,6	62,0	64,0
11	30	54	14	6,3	1:1,69	1:1,5	12,35	64,0	62,7
12	30	54	14	0	1:1,8	1:1,33	11,4	75,0	57,9
13	30	90	26	0	1:3	1:5,62	13,2	56,0	67,1

Исследования кристаллизации технических кристаллов валина в зависимости от концентрации кислоты с использованием хлорида натрия показали, что сравнительно высокие результаты можно получить в случае проведения процесса в 17% кислоте. Как видно из таблицы, увеличение концентрации кислоты выше 17% не приводит к существенному эффекту, а ниже этого получают пониженные результаты.

Для понимания механизма кристаллизации важно выяснить степень воздействия температуры на концентрацию гидрохлорида валина в ходе изогидрической кристаллизации. Экспериментальные результаты приведены на рис. 2.

На кривой наблюдается ярко выраженный участок, соответствующий индукционному периоду кристаллизации. Из формы кривой видно, что окончание индукционного периода, характеризующегося постоянством концентрации гидрохлорида валина в растворе, совпадает с началом массовой кристаллизации, начинающейся при температуре раствора 46-49°C. Характерный изгиб на кривой до 15-10°C соответствует процессу формирования кристаллов. Последний участок кривой характеризуется

состоянием раствора, близким к состоянию минимального пересыщения, когда наступает динамическое равновесие между твердой и жидкой фазами. Дальнейшее снижение температуры раствора не оказывает существенного влияния на процесс кристаллизации. Приведенное исследование кинетики кристаллизации гидрохлорида валина показывает, что формирование и рост кристаллов целесообразно осуществлять при температуре массовой кристаллизации с выдерживанием раствора в изотермических условиях в течение периода кристаллообразования. Для сокращения продолжительности кристаллизации необходимо быстрее охладить раствор до состояния пересыщения, при котором наступает массовая кристаллизация, а равномерное перемешивание и изотермические условия благоприятны для формирования и роста кристаллов.

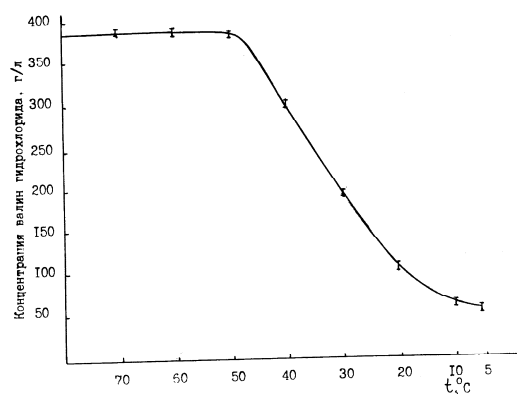


Рис. 2 Изменение концентрации гидрохлорида валина в растворе в зависимости от температуры охлаждения.

Получение валина из отфильтрованных чистых кристаллов гидрохлорида осуществляли обесцвечиванием водного раствора гидрохлорида осветляющим активным углем марки “ОУ-А” и нейтрализацией обесцвеченного фильтрата до рН 6,0. Исследования показали, что для легкого отмывания образовавшейся неорганической соли от выпавших кристаллов валина нейтрализацию раствора гидрохлорида валина нужно осуществлять концентрированным раствором аммиачной воды. Выпавшие кристаллы валина отделяли от маточного раствора фильтрацией и водной промывкой до отсутствия иона хлора в фильтрате. В конце кристаллы промывали этиловым спиртом и подвергали вакуум-сушке. Для извлечения остаточного валина из маточного раствора нейтрализации раствор обессоливали пропусканием через сильноокислый катионит КУ-2-8 в H^+ -форме и среднеосновной анионит ЭДЭ-10П в OH^- -форме. Далее обессоленный раствор упаривали до содержания СВ 48-50% и водной кристаллизацией выделяли кристаллы L-валина. Высушенные кристаллы объединяли с остальным продуктом.

Выход L-валина из КЖ составляет 51,4 %, содержание валина в полученном продукте – 99,6%, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +27,8^\circ (c=8, 6\text{н HCl})$ [15].

**ԿՈՒԼՏՈՒՐԱԼ ՀԵՂՈՒԿԻՑ ՎԱԼԻՆԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ ԵՎ ՄԱՔՐՄԱՆ
ՊՐՈՑԵՍԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ**

Ա. Ե. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Գ. Ժ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ և Ե. Ա. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է L-վալինի լուծելիությունը աղաթթվում կախված թթվի կոնցենտրացիայից ու ջերմաստիճանից և ստացվել լուծելիության կորերը:

Հետազոտվել է աղաթթվում վալինի տեխնիկական բյուրեղների բյուրեղացումը կախված թթվի կոնցենտրացիայից, պինդ և հեղուկ ֆազերի հարաբերությունից (պ:h) ու օգտագործվող նատրիումի քլորիդի քանակից:

Հետազոտվել է աղաթթվից վալինի իզոհիդրիկ բյուրեղացման պրոցեսի կախվածությունը ջերմաստիճանից ու որոշվել օպտիմալ ցուցանիշները:

Ստացված տվյալների հիման վրա մշակվել է կուլտուրալ հեղուկից վալինի անջատման և մաքրման տեխնոլոգիա:

**INVESTIGATION ON THE ISOLATION AND PURIFICATION
OF VALINE FROM CULTURAL LICUID**

A. Y. AGHAJANYAN, G. I. OGHANISYAN and Y. A. AGHAJANYAN

The solubility of valine in a solution of hydrochloric acid in dependence of the acid concentration and the solution temperature and a solubility curve obtained. From the results obtained it has been shown that the increase of the solution temperature from 20 to 80 caused the increase of valine solubility up to certain limit, after which it is decreasing. Maximum of valine solubility at 80 is observed at the concentration of acid equal to 17-20%, at the 50- by the 15-17% and at 20- by the 8.5-12%. It has been shown that the optimal concentration of acid, which is necessary from the isolation of valine from leucine from the technical crystals is in the interval of 14-19%. Processes of crystallisation of the technical – grade valine crystals have been studied from hydrochloric acid solution in dependence of the acid concentration, solid/liquid phase ratio and the amount of sodium chloride used. During the process of crystallization of valine technical crystals 17% solution of hydrochloric acid the better results has been achieved by the using the correlation between solid phase and liquid in the interval from 1.21 to 1.36. In these conditions 1 mol of valine is corresponded to 2.0-2.2 g-ion of chlor. The optimal concentration of sodium chloride which is necessary from the mixing with the technical crystals is 10%. Effect of solution temperature on the process of isohydric crystallization of valine from hydrochloric acid solution have been studied and optimal parameters of the process were obtained. Technology of isolation and purification of valine from cultural liquid of microbiological synthesis is developed based on the obtained results.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Садовникова М.С., Беликов В. М. // Успехи химии, 1978, т. 47, №2, с. 357.
- [2] Матусевич Л.Н. Кристаллизация из растворов в химической промышленности. М., Химия, 1968, с. 304.
- [3] Цудому Мацуиси. Пат. №62-6702 (1987) Япония. // РЖХ, 1988, 60130П
- [4] Отани Масару, Кодзима Масами, Китахара Тосно. Пат. №63-203652 (1987) Япония. //РЖХ 1989, 24 О 251 П

- [5] *Йосегава Казуизо, Канеко Тетсуна, Такаиши Норико*. Пат. 15689001 (1997) США // РЖХ 1999, 17 О 157 П.
- [6] *Солдатов В.С., Куваева З.И., Бычкова В.А.* // Ж. прикладной химии, 1999, т.72, №6, с.935.
- [7] *Ниси Акио, Ито Дзюнъе, Нарисе Масаеси*. Пат. №62-255453 (1987) Япония //РЖХ 1988, 24 О 207 П.
- [8] *Мурадян А.Г., Карабеков Б.П., Агаджанян А.Е.* А.с. №1426041 (1985) (ДСП).
- [9] *Калнинь И.К., Андабурская М.Б., Мукане Э.Е.* А.с. №715572 (1980) //Б.И.1980, №6, с. 138
- [10] *Фелднер В.А., Пейча Дз. А., Вискна А.Э.* // Изв. АН Латв. ССР, 1988, №2, с.216.
- [11] *Сазэки Массару, Саката Йосики.* // *Ferm. and Ind.*, 1982, 40, №10, с.906.
- [12] *Остерман Л.А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., Наука, 1985, с. 457.
- [13] *Reeve W., Adams R.* // *Anal. Chem.*, 1950, v. 22, p. 755.
- [14] *Хамский Е.В.* Кристаллизация из растворов. Л., Наука, 1967, с.458.
- [15] *Агаджанян А.Е., Зурабян А.С., Агаджанян Е.А.* Пат. Республики Армения №674 (1998). // Официальный патентный бюллетень "Армпатента". 1999, №4, с.16.