

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ  
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱՇԱԴԵՄԻԱ  
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ  
АРМЕНИЯ

Հայաստանի քիմիական հանդես 56, №4, 2003 Химический журнал Армении

*ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ*

УДК 661+664+668.394+668.395+668.7

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ ОСНОВАНИЯ ШИФФА  
ДЛЯ ОТДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ АМИНОКИСЛОТ**

**А. С. САГИЯН, К. И. ЕГИЯН, К. И. АТАЯН,  
С. Р. КАГРАМАНЯН и А. Е. АГАДЖАНЫАН**

Научно-исследовательский институт "Биотехнология", Ереван

Поступило 18 II 2002

Исследовалась возможность отделения первичных и вторичных аминокислот с использованием способности первичных аминокислот образовывать основания Шиффа с альдегидами в виде медных комплексов в статических условиях и в виде свободных оснований Шиффа в динамических условиях. Установлены оптимальные параметры, обеспечивающие эффективное отделение вторичной аминокислоты L-пролина от сопутствующих первичных аминокислот. Показана высокая степень очистки L-пролина от сопутствующих аминокислот в случае смолы АВ-17-8 в 5-сульфосалицилальдегидной форме с 50% насыщенностью альдегидом. На основании полученных результатов разработан эффективный малоотходный технологичный метод выделения и очистки L-пролина из ферментационных растворов микробиологического производства, обеспечивающий высокий выход (>90%) и качество целевой аминокислоты (>99%).

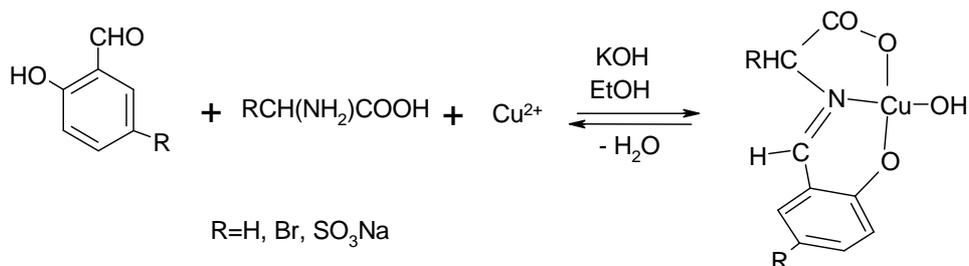
Рис. 2, табл. 3, библиограф. ссылок 7.

Аминокислоты белкового происхождения являются важными компонентами многих физиологически и фармакологически активных препаратов [1-3]. В связи с получением новых высокоактивных штаммов продуцентов аминокислот в последнее время микробиологический метод их получения вытесняет из практики применение в производстве других методов. [4]. Особенности микробиологического производства обусловлены также успешным решением вопросов отделения целевой аминокислоты из смеси сопутствующих аминокислот, образующихся в процессе биосинтеза [5, 6].

В настоящей работе приводятся результаты по исследованию реакции образования стабильных оснований Шиффа первичных аминокислот с салициловым альдегидом и его производными в статических условиях в виде

медных комплексов и в динамических условиях в виде свободных оснований Шиффа и их использованию в процессах выделения L-пролина из ферментационных растворов микробиологического производства. Статические опыты проводились при непрерывном перемешивании в щелочной среде этанола при 50 °С добавлением альдегида и CuSO<sub>4</sub> к модельной смеси аминокислот – L-пролина (86,0 г/л), L-валина (10 г/л), L-лейцина (2,2 г/л), L,D-аланина (3,2 г/л), L-глутаминовой кислоты (1,4 г/л) и глицина (1,2 г/л) (соотношение аминокислот выбрано в соответствии с аминокислотным составом ферментационных растворов (схема 1).

Схема 1



За ходом реакции образования медных комплексов оснований Шиффа аминокислот и альдегидов следили методом ТСХ по уменьшению концентрации сопутствующих L-пролину аминокислот в растворе (табл. 1). Как видно из таблицы, связывание первичных сопутствующих аминокислот с салициловым альдегидом и его производными происходит не количественно, что, по-видимому, связано с обратимостью реакции образования оснований Шиффа в статических условиях. Кроме этого, в процессе образования шиффовых оснований первичных аминокислот происходит частичная конверсия L-пролина (~10%).

С целью повышения стабильности оснований Шиффа первичных аминокислот и увеличения выхода реакции их образования была исследована возможность проведения ее в динамическом режиме с использованием анионообменных смол, как реакции на основе полимеров. Ответственным этапом подобных процессов является получение эффективных носителей (матрица) реакционноспособных частиц альдегида (противоион). В качестве матрицы исследовались анионообменные смолы ЭДЭ-10П, АВ-17-8, АВ-17-6 и АВ-17-2П, а в качестве противоиона – салициловый альдегид, 5-бромсалициловый альдегид и 5-сульфосалициловый альдегид. Альдегидные формы смол получали пропусканием 3-4 объемов 15% водно-спиртовых растворов салицилового и 5-бромсалицилового альдегидов и водного раствора натриевой соли 5-сульфосалицилового альдегида через ионообменные колонки со смолами в ОН<sup>-</sup> форме. В случае 5-сульфосалицилового альдегида одновременно получали смолу с 50% насыщенностью альдегидом в статических условиях обработкой анионитов водным раствором натриевой соли 5-сульфосалицилового альдегида при перемешивании в мольном соотношении альдегид/обменная емкость смолы = 0,5/1 (схема 2).

Таблица 1

**Результаты опытов по связыванию сопутствующих L-пролину аминокислот из модельного раствора смеси аминокислот (г/л) L-Pro-86,0; L-Val-10,0; D,L-Ala-3,2; L-Leu-2,2; L-Glu-1,4; Gly-1,2 в виде медных комплексов оснований Шиффа с альдегидами в статических условиях при 50°C**

N п/п	Наименование альдегида	Время, ч	Концентрация аминокислот, г/л					Степень связывания САК****, %	
			L-Pro	L-Val	D,L-Ala	L-Leu	L-Glu		Gly
1	Салициловый альдегид	1		6,4	1,5	1,6	0,8	0,7	39,0
		2		6,0	1,0	1,0	0,5	0,5	50,0
		3		5,8	0,8	0,8	0,4	0,4	54,5
		4		5,2	0,7	0,8	0,4	0,4	58,4
		5	76,42	5,25	0,72	0,82	0,42	0,46	57,4***
2	5-бромсалициловый альдегид	1		6,6	1,8	1,6	1,0	0,9	33,9
		2		6,4	1,5	1,2	0,8	0,7	41,2
		3		6,3	1,2	1,0	0,8	0,6	45,0
		4		6,2	1,0	1,0	0,8	0,6	46,7
		5	72,52	6,26	1,08	1,01	0,81	0,62	45,7***
3	5-сульфосалициловый альдегид	1		6,8	1,6	1,7	0,6	0,8	33,8
		2		5,4	1,2	1,3	0,5	0,6	50,0
		3		4,8	1,0	1,2	0,4	0,5	56,2
		4		4,6	0,9	1,1	0,4	0,4	58,9
		5	66,44	4,62	0,92	1,13	0,42	0,43	58,3***

\* – опыты проводились в среде C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH в присутствии KOH;

\*\* – опыты проводились в воде; \*\*\* – данные аминокислотного анализатора; \*\*\*\*

– САК-сопутствующие аминокислоты.

Необходимость получения 50% 5-сульфосалицилальдегидной формы смолы обусловлена теоретическими соображениями, т. к. в ряду салициловых альдегидов по отношению к реакции образования шиффовых оснований карбонильная группа реакционноспособна при наличии в положении ионизированной гидроксильной группы.

Полученные альдегидные формы смол были использованы в процессах отделения L-пролина от сопутствующих аминокислот путем связывания последних на анионообменных смолах в виде стабильных оснований Шиффа с фрагментом альдегида (схема 3).

Процессы проводили в динамическом режиме пропусканием раствора смеси аминокислот через ионообменные колонки, заполненные анионитами в альдегидных формах. L-пролин, как аминокислота, не способен образовывать стабильные шиффовые основания с альдегидными фрагментами смолы и выходит из колонки. За ходом процессов отделения пролина от сопутствующих аминокислот следили определением количества отдельных аминокислот в выходящем с колонки растворе (табл. 2).

Схема 2

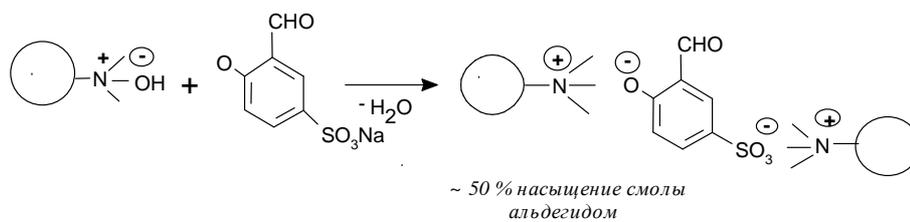
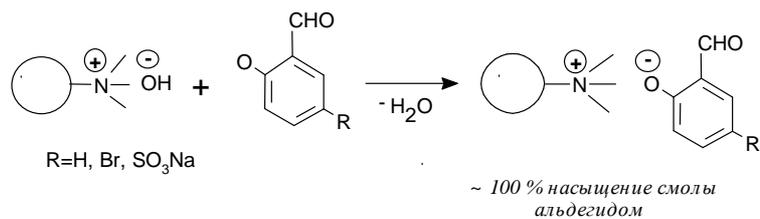
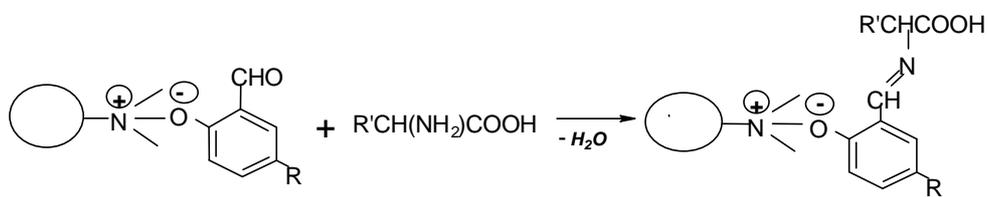
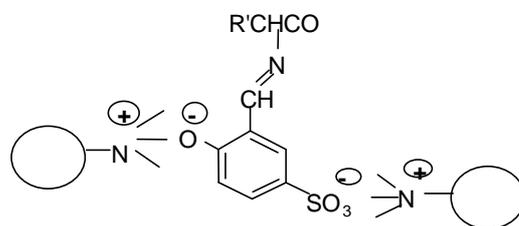


Схема 3



В случае 100 % насыщенных смол



В случае 50 % насыщенных смол

Таблица 2

Результаты опытов по связыванию сопутствующих L-пролину аминокислот в виде стабильных оснований Шиффа с фрагментом альдегида анионообменных смол в динамическом режиме, T=25°C, V<sub>смола</sub> = 100 мл, концентрация аминокислот в исходном растворе г/л: L-Pro-86; L-Val-10; D,L-Ala-3,2; L-Leu-2,2; L-Glu-1,4; Gly-1,2

№ опыта	Наименование и форма нахождения смолы	Объем раствора, мл	Концентрация аминокислот, г/л					
			L-Pro	L-Val	D,L-Ala	L-Leu	L-Glu	Gly
1.	ЭДЭ-10П Sal <sup>-</sup>	100	41	–	–	–	–	–
		200-300	86	–	–	–	–	–
		400	86	–	0,2	–	0,2	0,2
		500	86	–	1,0	–	0,8	0,6
		600	86	0,5	2,6	0,2	1,2	1,0
2.	ЭДЭ-10П 5-Br-Sal <sup>-</sup>	100	42	–	–	–	–	–
		200	86	0,5	–	–	–	–
		300	86	1,5	0,5	0,2	–	–
		400	86	3,4	1,2	1,4	0,5	0,4
		500	86	6,4	1,8	2,0	0,8	0,7
3.	ЭДЭ-10П 5-SO <sub>3</sub> -Sal <sup>-2</sup>	100	41	–	–	–	–	–
		200	86	–	–	–	–	–
		300	86	–	0,5	–	0,2	0,2
		400	86	0,2	1,2	–	0,6	0,4
		500	86	0,5	1,5	0,2	0,8	0,6
4.	AB-17-8 Sal <sup>-</sup>	100	41	–	–	–	–	–
		200-600	86	–	–	–	–	–
		700	86	–	0,5	–	0,2	0,2
		800	86	0,2	0,8	–	0,4	0,4
		900	86	0,8	1,0	0,2	0,6	0,5
5.	AB-17-8 5-Br-Sal <sup>-</sup>	100	41	–	–	–	–	–
		200	86	–	–	–	–	–
		300	86	0,5	0,2	–	0,2	0,2
		400	86	1,4	0,8	0,5	0,6	0,6
6.	AB-17-8 5-SO <sub>3</sub> -Sal <sup>-</sup>	100	41	4,2	1,2	1,0	0,7	0,6
		200	86	9,8	3,2	2,1	1,4	1,2
7.	AB-17-8 5-SO <sub>3</sub> -Sal <sup>-2</sup>	100	41	–	–	–	–	–
		200-400	86	–	–	–	–	–
		500	86	–	0,5	–	0,2	–
		600	86	–	0,8	–	0,6	0,4
		700	86	0,8	1,6	0,5	1,0	0,8
8.	AB-17-6 Sal <sup>-</sup>	100	41	–	–	–	–	–
		200	86	–	–	–	–	–
		300	86	0,8	0,5	0,3	0,2	0,2
		400	86	1,0	0,7	0,4	0,2	0,2
		600	86	1,4	0,8	0,6	0,4	0,4
9.	AB-17-2П Sal <sup>-</sup>	100	41	–	–	–	–	–
		200-600	86	–	–	–	–	–
		700	86	0,4	0,2	–	0,2	0,2
		800	86	1,0	0,5	0,4	0,8	0,6
9.	AB-17-2П 5-SO <sub>3</sub> -Sal <sup>-2</sup>	100	41	–	–	–	–	–
		200-300	86	–	–	–	–	–
		400	86	0,6	0,2	–	0,4	0,2
		500	86	1,2	0,4	0,2	0,6	0,4

Как видно из полученных результатов, наилучший эффект наблюдается в случае анионообменных смол АВ-17-8 и АВ-17-2П. Для выявления зависимости эффективности альдегидной формы смолы в реакциях образования стабильных оснований Шиффа от поверхностной структуры высокомолекулярной матрицы исследовали все 4 смолы в салицилальдегидной форме и проводили сравнительный анализ их работоспособности в процессах отделения пролина от первичных аминокислот (табл. 3).

Таблица 3

**Работоспособность анионообменных смол в салицилальдегидной форме в процессе отделения пролина от сопутствующих аминокислот,**

$$V_{\text{смолы}} = 1000 \text{ мл}$$

Наименование смолы	Емкость смолы по $Sal^*$ ( $г-экв/л$ ), $P_0$	Расход $Sal^*$ , кг	Количество связанных САК** ( $г-экв/л$ ), $P_1$	Работоспособность смолы $P_1/P_0 (100)$	Количество очищенного пролина, кг
ЭДЭ-10П	2,21	0,065	0,22	10,4	0,028
АВ-17-8	0,72	0,038	0,31	43,0	0,028
АВ-17-6	1,1	0,052	0,25	22,8	0,035
АВ-17-2П	0,56	0,032	0,45	80,4	0,061

\* – Sal – салициловый альдегид,

Как видно из табл. 3, наиболее эффективное отделение пролина от сопутствующих аминокислот наблюдается при использовании пористого анионита АВ-17-2П, что, по-видимому, обусловлено хорошей диффундирующей способностью аминокислоты к функциональным группам в фазе смолы. Смола ЭДЭ-10П, обменная емкость которой по альдегиду (содержание ионизированных частиц альдегида на смоле) составляет 2,21  $г-экв/л$ , участвует в процессе связывания сопутствующих аминокислот одинаково эффективно со смолой АВ-17-8 с обменной емкостью 0,72  $г-экв/л$ . Для выяснения причины относительно низкой эффективности (~3 раза) смолы ЭДЭ-10П исследовали поверхностные структуры смол ЭДЭ-10П и АВ-17-8 после получения их альдегидной формы методом ИК спектроскопии. Как и следовало ожидать, причиной низкой эффективности смолы ЭДЭ-10П в реакциях образования шиффовых оснований является большое содержание первичных, вторичных и третичных аминогрупп в смоле. Указанные группы в процессе получения альдегидной формы смолы нецеленаправленно связываются с карбонильной группой альдегидных фрагментов, например, в виде оснований Шиффа, и инактивируют таким образом альдегидные фрагменты в процессах связывания первичных аминокислот в виде стабильных оснований Шиффа (схема 4).

Схема 4

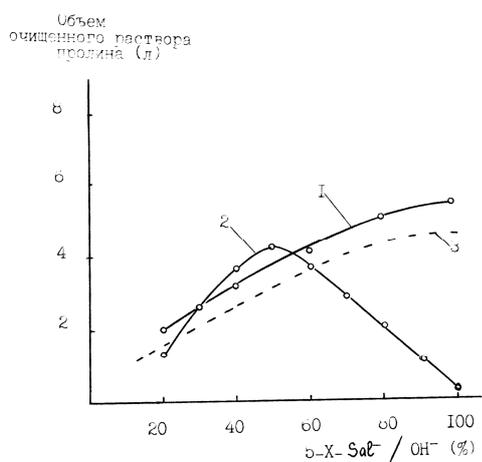
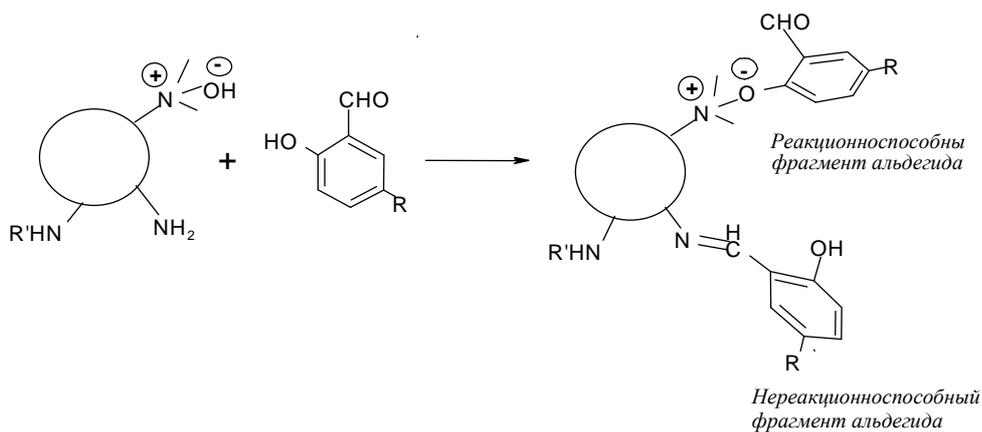


Рис. 1. Зависимость эффективности очистки пролина от степени насыщения смолы АВ-17-8 альдегидом,  $V_{\text{смолы}} = 1000 \text{ мл}$ . 1 – X=H, салициловый альдегид, 2 – X=SO<sub>3</sub> Na, 5-сульфосалициловый альдегид, 3 – X=Br, 5-бромсалициловый альдегид.

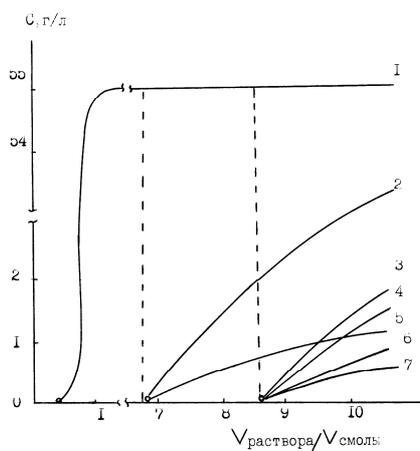


Рис. 2. Динамические кривые выхода отдельных аминокислот из колонки со смолой АВ-17-8 в салицилальдегидной форме: 1 – L-пролин, 2 – L-валин, 3 – D,L-аланин, 4 – L-лизин, 5 – L-лейцин, 6 – L-глутаминовая кислота, 7 – глицин.

Из полученных данных также следует, что в случае использования 5-сульфосалицилового альдегида в качестве противоиона при 100 % насыщении альдегидом смола полностью теряет способность связывать сопутствующие аминокислоты (табл. 2, оп. № 6). Для выяснения зависимости эффективности очистки пролина от степени насыщения смолы ионизированными частицами альдегида исследовали смолу АВ-17-8 в салицилальдегидной, 5-бромсалицилальдегидной и 5-сульфосалицилальдегидной формах с разной степенью насыщенности альдегидом (рис. 1). Как видно из рисунка, в случае салицилового и 5-бромсалицилового альдегидов увеличение процентного содержания альдегидных частиц на смоле 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 ( $5\text{-SO}_3\text{Sal}^{2-}/\text{OH} = 1/1$ ). Дальнейшее увеличение содержания альдегида на поверхности смолы приводит к уменьшению эффективности отделения; при 100% насыщении смола теряет способность взаимодействовать с аминокислотами. Причина заключается в том, что до 50% насыщения смолы молекула 5-сульфосалицилового альдегида фиксируется на смоле за счет ионизированных сульфо- и гидроксигрупп. Такая фиксация приводит к увеличению реакционной способности фрагментов альдегида по отношению к реакции образования оснований Шиффа, т. к. при этом  $\alpha$ -гидроксильная группа находится в ионизированном состоянии. При увеличении количества 5-сульфосалицилового альдегида на поверхности смолы ( $5\text{-SO}_3\text{Sal}/\text{OH}^- > 50\%$ ) сильноокислотная сульфогруппа постепенно вытесняет ионизированную гидроксильную группу и молекула альдегида фиксируется на смоле только за счет ионизированной 5-сульфогруппы. Нейтрализация ионизированной  $\alpha$ -гидроксильной группы в этом случае приводит к инактивации карбонильной группы альдегида в реакциях образования шиффовых оснований с аминами. Исходя из вышеизложенного на стадии получения смол в 5-сульфосалицилальдегидной форме сорбцию альдегида необходимо осуществлять в статических условиях при перемешивании с использованием растворов с четко рассчитанным количеством натриевой соли 5-сульфосалицилового альдегида по отношению к обменной емкости смолы по  $\text{OH}^-$  иону (емкость смолы по  $\text{OH}^-$  иону / мольное количество  $5\text{-SO}_3\text{Sal}$  в растворе =  $1/0,5$ ).

В процессе связывания сопутствующих аминокислот в случае использования смолы в салицилальдегидной и 5-бромсалицилальдегидной форме наблюдается частичное вымывание салицилового альдегида со смолы, о чем свидетельствует наличие альдегида в выходящем с колонки растворе сопутствующих аминокислот. Причиной этого, по-видимому, является недостаточно сильная фиксация полученных шиффовых оснований первичных аминокислот на матрице смолы ионной связью за счет ионизированной гидроксильной группы. В случае смол в 5-сульфосалицилальдегидной форме полученные основания Шиффа сопутствующих аминокислот прочно фиксируются на смоле как за счет ионизированной гидроксильной, так и сильноокислотной 5-сульфогруппы и не вымываются с поверхности смолы.

Определены также оптимальные значения pH и температуры растворов, обеспечивающих эффективное отделение пролина от сопутствующих аминокислот. Оно происходит при исходном значении pH раствора 5,5-8,5 и температуры 15-50°C. При значении pH выше или ниже указанного диапазона происходит частичное разложение оснований Шиффа и наблюдается «проскок» сопутствующих аминокислот в раствор пролина. Неполная очистка пролина при температуре выше 50°C, по-видимому, связана с частичным разложением

оснований Шиффа, а при температуре ниже 15°C – замедлением реакции образования оснований Шиффа с первичными аминокислотами.

После вытеснения аминокислот из межгранульного пространства смолы промыванием водой сопутствующие L-пролину аминокислоты элюируют со смолы пропуская 3-4 объема 8% водного раствора аммиака. При этом непосредственно на смоле происходит разложение оснований Шиффа и выделение сопутствующих аминокислот с одновременным восстановлением альдегидной формы смолы. Следует отметить, что в случае использования смол в салицилальдегидной и 5-бромсалицилальдегидной формах в процессе элюции сопутствующих аминокислот происходит частичное вымывание фрагментов альдегида со смолы (до 40%).

В случае использования смол в 5-сульфосалицилальдегидной форме в процессе элюции сопутствующих аминокислот исходная емкость смолы по альдегиду полностью восстанавливается, и такие смолы можно использовать многократно без дополнительной регенерации.

Анализ полученных результатов показывает, что для практического пользования наиболее эффективным и технологичным является смола АВ-17-8 в 5-сульфосалицилальдегидной форме с 50% насыщенностью альдегидом, которую можно использовать многократно в процессах очистки L-пролина от сопутствующих аминокислот. Преимуществом натриевой соли 5-сульфосалицилового альдегида, в отличие от салицилового и 5-бромсалицилового альдегидов, является также его хорошая растворимость в воде, что позволяет исключить использование спирта или других органических растворителей на стадиях получения альдегидных форм смолы.

Смолу АВ-17-8 в 5-сульфосалицилальдегидной форме использовали для выделения L-пролина из смеси аминокислот, полученной из ферментационных растворов микробиологического производства. Для этого культуральную жидкость микробиологического производства L-пролина с использованием штамма-продуцента *Brevibacterium Flavum* AP-111 подвергали центрифугированию, ионообменной сорбции и десорбции, обесцвечиванию и ультрафильтрации. Полученный раствор смеси аминокислот с содержанием (г/л): L-пролина – 55; L-валина – 5,1; D,L-аланина – 1,4; L-лейцина – 0,6; L-лизина – 0,9; L-глутаминовой кислоты – 0,45 и глицина – 0,4 пропускали через ионообменную колонку со смолой АВ-17-8 в 5-сульфосалицилальдегидной форме. Динамические кривые выхода отдельных аминокислот с колонки представлены на рис. 2. Как видно из рисунка, данный подход позволяет получить примерно 7 объемов по отношению к объему смолы полностью очищенного от всех сопутствующих аминокислот раствора L-пролина. Очищенный таким образом раствор L-пролина с значением pH 6,3 подвергается ультрафильтрации для удаления механических микропримесей, вакуум-концентрированию и кристаллизации из водно-спиртовых растворов (1/1) при температуре 0-5°C. Кристаллы фильтруют, а маточный раствор возвращают на стадию обесцвечивания раствора смеси аминокислот. Общий выход L-пролина

с учетом его количества в маточном растворе превышает 90 % от его исходного содержания в культуральной жидкости.

## 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» МП РА (Ереван); анионообменные смолы ЭДЭ-10П, АВ-17-8, АВ-17-6 и АВ-17-2П – «Реахим» (РФ),  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{NaOH}$ , 5-бромсалициловый альдегид, активированный уголь – « Реахим» (РФ). Натриевая соль 5-сульфосалицилового альдегида была синтезирована по методике [9]. Регенерацию смол в  $\text{OH}^-$  форме осуществляли согласно ГОСТ СССР No 10896-78. Анализ альдегидов проводили на спектрофотометре «Specord M-40» при длине волны  $\lambda_{\text{max}} = 255$  и  $354$  нм, соответственно, по корреляционным диаграммам.

Перевод анионообменных смол в салицилальдегидную и 5-бромсалицилальдегидную форму осуществляли пропусканием 8% водно-спиртового раствора салицилового и 5-бромсалицилового альдегидов в направлении снизу вверх через колонку с 1000 мл смолы в  $\text{OH}^-$  форме со скоростью 500 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. Аналогичным образом получали также смолы в 5-сульфосалицилальдегидной форме с 100% насыщенностью альдегидом.

Смолы в 5-сульфосалицилальдегидной форме с 50% насыщенностью альдегидом получали в 2 л колбе при непрерывном перемешивании 1000 мл смолы в  $\text{OH}^-$  форме с рассчитанным количеством 5% водного раствора натриевой соли 5-сульфосалицилового альдегида, содержащего альдегид в мольном количестве, равном 1/2 части обменной емкости смолы по  $\text{OH}^-$  иону.

Для изучения процесса отделения L-пролина от других аминокислот был использован модельный раствор смеси аминокислот состава (г/л): L-пролин – 86; L-валин – 10; D,L-аланин – 3,2; L-лейцин – 2,2; L-глутаминовая кислота – 1,4; и глицин-1,2. Для изучения влияния pH исходного раствора на эффективность процесса исходные растворы с значением 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.

Статические опыты по отделению L- пролина от других аминокислот проводили следующим образом: в 2 л колбе к 1 л раствора модельной смеси аминокислот (0,98 моля) и 235 г (2,94 моля) KOH в этаноле при перемешивании добавляли 1,47 моля альдегида (179 г салицилового, 294 г 5-бромсалицилового

и 329 г натриевой соли 5-сульфосалицилового альдегидов). Перемешивание продолжали при температуре 50°C в течение 5-6 ч. Через каждый час брали пробу, нейтрализовали уксусной кислотой и анализировали аминокислотный состав.

Динамические опыты по отделению L-пролина от других аминокислот проводили следующим образом: раствор смеси аминокислот с рН 6,3-6,6 пропускали через ионообменную колонку (20x3 см), заполненную 100 мл смолы (ЭДЭ-10П, АВ-17-8, АВ-17-6 и АВ-17-2П) в альдегидной форме ( $\text{Sal}^-$ , 5- $\text{BrSal}^-$ , 5- $\text{SO}_3\text{Sal}^-$  и 5- $\text{SO}_3\text{Sal}^{2-}$ ) со скоростью 40-50 мл раствора за 1 ч. В выходящем из колонки растворе определяли количество L-пролина и других аминокислот. Пропускание раствора смеси аминокислот через колонку продолжали до появления в выходящем с колонки растворе сопутствующих аминокислот. Затем колонку промывали дистиллированной водой до исчезновения следов аминокислот в выходящем с колонки растворе (~300 мл). Для вымывания сорбированных сопутствующих аминокислот со смолы через колонку пропускали 400 мл 8% раствора водного аммиака, затем промывали дистиллированной водой до нейтральных значений рН (~500 мл). При этом смолы восстанавливают исходную емкость по альдегиду: в случае смол в салицилальдегидной и 5-бромсалицилальдегидной формах – 50-60%, а в случае смол в 5-сульфосалицилальдегидной форме – ~100 %.

Опыт по выделению и очистке L-пролина из культуральной жидкости (КЖ) микробиологического производства проводили следующим образом: 1000 мл КЖ, полученной после ферментации с использованием штамма-продуцента *Brevibacterium Flavum* AP-111, центрифугировали, фугат подкисляли серной кислотой до рН 1,8 и пропускали через ионообменную колонку с 800 мл катионообменной смолы КУ-2x8 в  $\text{H}^+$  форме. Смолу промывали водой до рН 4,5-5,0 и пропускали через нее 1000 мл 5% водного раствора аммиака. Из полученного элюата удаляли аммиак вакуум-выпариванием, разбавляли дистиллированной водой до концентрации сухих веществ, равной 9-10, добавляли 5% активированного угля, перемешивали при 45°C в течение 30 мин и фильтровали суспензию через бумажный фильтр. Из полученного раствора смеси аминокислот выделяли L-пролин пропуская через колонку со смолой АВ-17-8 в 5-сульфосалицилальдегидной форме (с 50% насыщенностью альдегидом), как это описано выше. Очищенный раствор L-пролина концентрировали под вакуумом до значения СВ 70-80%, добавляли смесь вода-этанол (1/1) и кристаллизовали целевой продукт при температуре 5-10°C. Выпавшие кристаллы отделяли от маточного раствора фильтрованием. Маточный раствор можно выпаривать и кристаллизовывать повторно или возвращать на стадию обесцвечивания раствора смеси аминокислот. Выход L-пролина составляет 80,5 г с учетом его количества в маточном растворе, что соответствует 89,5 % исходя из его исходного содержания в КЖ. Удельное вращение полученного образца L-пролина –  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -51,05^\circ$  (с=2,5; 1N HCl) ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25}(\text{лит.}) = -48,5-52,5^\circ$  (с=2,5; 1N HCl)).

**ՇԻՖՖԻ ՀԻՄՔԵՐԻ ԱՌԱՋԱՑՄԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ՕԳՏԱԳՈՐԾՈՒՄԸ  
ԱՌԱՋՆԱՅԻՆ ԵՎ ԵՐԿՐՈՐԴԱՅԻՆ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ  
ՀԱՄԱՐ**

**Ա. Ս. ՍԱՂՅԱՆ, Կ. Ի. ԵՂԻՅԱՆ, Կ. Ի. ԱԹԱՅԱՆ,  
Ս. Ռ. ՂԱՀՐԱՄԱՆՅԱՆ և Ա. Ե. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ**

Օգտագործելով ալդեհիդների հետ Շիֆֆի հիմքեր առաջացնելու հատկությունը հետազոտվել է ստատիկ պայմաններում առաջնային ամինաթթուների Շիֆֆի հիմքերի պղնձային կոմպլեքսներ և դինամիկ պայմաններում ազատ կայուն Շիֆֆի հիմքեր առաջացնելու ռեակցիաները: Որպես ալդեհիդ օգտագործվել են սալիցիլային, 5-բրոմ- և 5-սուլֆասալիցիլային ալդեհիդները, իսկ որպես խեժ դինամիկ պայմաններում իրականացվող փորձերում՝ *ЭДЭ-10П*, *AB-17-8*, *AB-17-6* և *AB-17-2П* իոնափոխանակային խեժերը: Որոշվել է ուղեկցող առաջնային ամինաթթուների խառնուրդից *L*-պրոլինի անջատման էֆեկտիվությունը ապահովող օպտիմալ ցուցանիշները *pH*, *T*, իոնիզացված ալդեհիդով խեժի հագեցվածության աստիճանը, խեժի մակերեսային կառուցվածքը: Ցույց է տրվել 5-սուլֆասալիցալային ալդեհիդով 50% հագեցվածությամբ *AB-17* խեժի կիրառման դեպքում ամինաթթուների խառնուրդից բարձր մաքրությամբ *L*-պրոլինի անջատման հնարավորությունը: Ստացված տվյալների հիման վրա մշակվել է մանրէաբանական արտադրության կուլտուրալ հեղուկներից ստացված ամինաթթվային խառնուրդներից *L*-պրոլինի անջատման էֆեկտիվ տեխնոլոգիայի մատչելի քիչ թափոնային մեթոդ, որը ապահովում է նպատակային արգասիքի բարձր քիմիական ելքը (>90%) և մաքրության աստիճանը (>99%):

**SEPARATION OF PRIMARY AND SECONDARY AMINO ACIDS  
BY SCHIFF'S BASE FORMATION REACTION**

**A. S. SAGHIYAN, K. I. EGHYAN, K. I. ATAYAN,  
S. R. KAHGRAMANYAN and A. E. AGHAJANYAN**

*Possibility to separate primary and secondary amino acids due to their ability to form Schiff's bases with aldehydes as cuprum complexes in static position and as free Schiff's bases in dynamic regime was studied. Salicylic aldehydes, 5-bromosalicylic aldehydes and 5-sulfosalicylic aldehydes were used as aldehydes and anion-exchange resins EDE-10n, AB-17-8, AB17-6, and AB-17-12n were used as resins in dynamic experiments. Optimal parameters (e.g. temp., pH, resin saturation with ionized aldehydes, resin matrix surface structure) which provide efficient separation of the secondary amino acid L-proline from the concomitant primary amino acids were determined. Higher purification degree of L-proline from the concomitant amino acids in case of AB-17 resin as 5-sulfosalicylic aldehydes with 50 % saturation with aldehydes was demonstrated. A novel, efficient, low waste technological method for separation and purification of L-proline from the fermentation broth, which provides both high yield (>90 %) and high quality of the final amino acid (>99 %) was developed.*

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Rico-Sanz J.* // Int. J. Sports Nutr., 1998, v. 8(2), p. 113.
- [2] *Torii K.* A new Pharmacologic and Physiologic aspects for L-Amino Acids. Adjinomoto Co, Inc., Kawasaki, 1999
- [3] *Мачураг Т.* // Тезисы Международного симпозиума по аминокислотам. 1996, г. Гродно.
- [4] *Кочарян Ш.М., Карапетян Ж.В., Келешян С.К., Азизян А.Г., Акопян Э.М., Арушанян А.В., Амбарцумян А.А.* А. с. СССР 1409659, 1988.
- [5] Патент 3598838 (1971) США // С.А. 1971, т. 75, с. 6223
- [6] *Сагиян А.С., Каграманян С.Р., Овсепян Г.Ц., Джамгарян С.М., Басенцян К.Е., Акопян Э.М., Григорян С.К., Селемьнев В.Ф., Капанцян Э.Е., Оганесян Э.М.* // Арм. хим.ж., 1992, т. 45, №1-2, с. 270.
- [7] *Belokon' Yu.N., Tararov V.I., Savel'eva T.F., Saporovskaya M.M., Belikov V.M.* // Macromol. Chem., 1986, №187, p. 1005.