

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 577.19:602.4

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ РАСТВОРОВ

А. Е. АГАДЖАНЫН, Г. Ж. ОГАНИСЯН, К. И. ЕГИЯН и А. С. САГИЯН

Научно-производственный центр "Армбиотехнология"

НАН Республики Армения

Армения, 0056, Ереван, ул. Гюрджяна, 14

E-mail: armbiotech@gmail.com

Поступило 15 VII 2015

Исследованы процессы выделения и очистки различных классов БАВ из ФР, выявлены закономерности этих процессов, разработаны технологические параметры процессов и созданы эффективные технологии их выделения и очистки из ФР.

Разработан бессорбционный процесс выделения L-валина из ФР. Определены оптимальные технологические параметры кристаллизации технических кристаллов валина из раствора соляной кислоты и электромембранного способа перевода валина из гидрохлоридной формы в цвиттерионную.

Исследован процесс трансформации цитрата натрия в лимонную кислоту из пермеата ФР методом электродиализа и показано, что технологически предпочтительно проводить трансформацию до 90-95%, а трансформацию остаточного цитрата после электродиализа и обессоливания раствора осуществлять с помощью ионного обмена.

Исследован процесс выделения микробного меланина из нативного раствора с использованием ионообменных смол и определены оптимальные технологические параметры процесса сорбции и элюции.

Изучены физико-химические свойства выделенного микробного меланина и выявлен ряд структурных особенностей.

Разработана эффективная технология выделения и очистки биоингибирующего вещества из КЖ, которая позволяет получить очищенный от сопутствующих примесей продукт, имеющий сильное биоингибирующее действие на патогенные микроорганизмы.

Рис. 5, табл.1, библиограф. ссылок 47.

Особое место в биотехнологическом производстве биологически активных веществ (БАВ) занимает выделение и очистка целевого продукта из ферментационных растворов (ФР).

В процессе выделения и очистки БАВ из ФР часто приходится использовать сложные и, как правило, нестандартные индивидуальные технологические подходы, позволяющие получить целевые продукты высокой степени чистоты.

Одной из наиболее трудоемких стадий при выделении БАВ, в частности аминокислот из ФР, является обессоливание центрифугатов или пермеатов сорбционным методом. На этой стадии образуется значительное количество сорбционных и регенерационных стоков и расходуются большие объемы аммиачных растворов, которые приходится утилизировать.

Согласно оценкам экономистов, себестоимость БАВ примерно на 60% определяется затратами на стадиях выделения и очистки из ФР, поэтому разработка эффективных методов выделения и очистки БАВ, представляющих коммерческий интерес, является актуальной задачей [1].

Целью предлагаемой работы являлось исследование процессов выделения и очистки различных классов БАВ (аминокислоты, оксикислоты, микробного меланина и биоингибирующего продукта) из ФР и разработка эффективных технологий выделения и очистки вышеуказанных классов БАВ из ФР микробного синтеза.

Выделение и очистка L-валина из ФР

ФР валина, помимо целевого продукта, содержит также сопутствующие аминокислоты, окрашенные компоненты, минеральные соли и т.д. [2]. Если очистка валина от окрашенных компонентов, минеральных солей и некоторых сопутствующих аминокислот не представляет сложности, то очистка от лейцина, который по физико-химическим показателям схож с валином, связана с большими трудностями. В патентной литературе известен способ выделения и очистки валина из ФР [3]. Суть способа заключается в отделении биомассы центрифугированием, подкисление фугата до pH 1.5-2.0 и сорбцией валина на катионите КУ-2×8 в H^+ -форме и его элюции из фазы смолы аммиачной водой. Далее элюат подвергают вакуум-выпариванию, обесцвечиванию, концентрированию и выделяют технические кристаллы L-валина. Перекристаллизация технических кристаллов в горячей соляной кислоте позволяет получить целевой продукт с содержанием основного вещества 99.2-99.4%. Недостатком способа является многостадийность, что приводит к низкому выходу целевого продукта на стадии выделения и очистки. Так, нап-

пример, применение ионообменного метода извлечения валина из фугата приводит к тому, что в технологии используются несколько трудоемких стадий (сорбция, десорбция, отгонка аммиака, утилизация сорбционных и регенерационных стоков и т.д.) Существенным недостатком метода является и то, что неправильно выбраны технологические параметры солянокислой перекристаллизации и его трансформации из солевой формы в цвиттерионную.

Для выделения валина из ФР в работе [4] предлагается использовать экстракционный метод с использованием жидкого сульфокатионита (раствор динилнафталинсульфокислоты в гептане).

Возможность использования жидких сульфокатионитов для выделения аминокислот из водных сред приведена также в работе [5]. Необходимо отметить, что работы по извлечению валина из пермеатов ФР с использованием жидкого сульфокатионита, как проведенные нами, так и другими авторами работ [6], показали невозможность отделения валина от сопутствующих аминокислот (лейцин, аланин) на стадии экстракции. Если принять во внимание, что при использовании жидких катионитов возникает необходимость регенерации органического растворителя и для рекстракции аминокислот с катионита приходится использовать водный раствор аммиака высокой концентрации (8-10%) то предложенный метод по некоторым показателям уступает способу, указанному в работе [3].

Экспериментальная часть

Эксперименты по растворимости L-валина и L-лейцина в растворе соляной кислоты проводили выдерживанием в термостате с периодическим отбором жидкой фазы для анализа на содержание аминокислоты. К 100 мл раствора соляной кислоты соответствующей концентрации добавлялось такое количество кристаллов L-валина и L-лейцина, чтобы после установления равновесия оставались нерастворенные кристаллы (~0.5 г), которые от раствора отделяли фильтрацией. Во избежание кристаллообразования при фильтрации воронку и приемник термостатировали.

Содержание аминокислот в растворе определяли с помощью аминокислотного анализатора "ААА-881" (ЧССР) и спектрофотометрически.

Изогидрическую кристаллизацию технических кристаллов валина в растворе соляной кислоты проводили при изменении температуры раствора путем отбора проб с температурным интервалом 5°C.

Эксперименты по трансформации гидрохлорида валина в цвиттерионную форму и обессоливание раствора проводили в прямоточном циркуляционном четырехкамерном аппарате с межмембранным

расстоянием 3 мм. Камеры электродиализатора были разделены катионообменными мембранами МК-40 (Россия).

Пермеаты L-валина и L-изолейцина получали осаждением клеточно-го материала ФР безмельной ферментации центрифугированием в течение 20 мин при 4200 g, после чего полученные супернатанты подвергали ультрафильтрации с использованием аппарата периодического действия с полыми волокнами AP-02 (Россия). Из полученных пермеатов технические кристаллы валина и изолейцина выделяли вакуум-выпариванием до соответствующего значения сухих веществ (СВ) в растворе и водной кристаллизацией.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что из фугатов или пермеатов ФР мало- (L-лейцин) и среднерастворимые (L-валин) нейтральные аминокислоты можно выделять в форме технических кристаллов. Ввиду того, что кристаллы валина и лейцина имеют пластинчатую форму и обладают большой поверхностной активностью, то с помощью кристаллизации в водной среде невозможно осуществлять их разделение [2,3].

Авторами работ [3,7] показано, что если кристаллизацию валина осуществлять в солянокислой среде, то за счет изменения формы кристаллов отделение валина от лейцина и других сопутствующих аминокислот становится возможным.

В работе [8] изучен процесс выделения и очистки валина из ФР и определены некоторые параметры процесса.

В солянокислой среде осуществлено также разделение гидрохлорида D,L-валина на оптические изомеры [9].

В вышеприведенных работах недостаточно отражены технологические параметры процесса кристаллизации (температура, время, концентрация соляной кислоты, соотношение твердой и жидкой фаз, условия перевода гидрохлорида аминокислот в цвиттерионную форму и т.д.) нейтральных аминокислот (валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, тирозин и т.), кристаллы которых имеют пластинчатую форму.

Изучение растворимости L-валина и L-лейцина в соляной кислоте показало, что при перекристаллизации технических кристаллов валина оптимальная концентрация кислоты, необходимая для отделения валина от лейцина составляет 12.5-17.5%. Установлено, что высокий выход валина на стадии перекристаллизации получается при соотношении твердой фазы к жидкой, равном 1.2-1.35. При этом одному молю валина соответствует 1.6-1.9 грамм-иона хлора [10].

Изучение влияния температуры на концентрацию гидрохлорида валина в растворе в ходе изогидрической кристаллизации показало, что формирование и рост кристаллов целесообразно осуществлять при тем-

пературе массовой кристаллизации (49-40°C) с выдерживанием раствора в изотермических условиях в течение периода кристаллообразования [8].

После завершения кристаллизации отфильтрованные и отжатые на фильтре кристаллы гидрохлорида валина промывали охлажденным до 10°C 17% раствором соляной кислоты.

Исследования показали, что перевод валина из гидрохлоридной формы в цвиттерионную предпочтительно осуществлять с помощью электромембранного метода [10].

Установлено, что процесс трансформации эффективно протекает в четырехкамерном аппарате, имеющем следующую последовательность ионообменных мембран (рис 1).

Использование электромембранного способа трансформации позволяет одновременно регенерировать связанную с валином основную часть соляной кислоты, которую можно использовать на стадии солянокислой кристаллизации или в других технологических циклах.

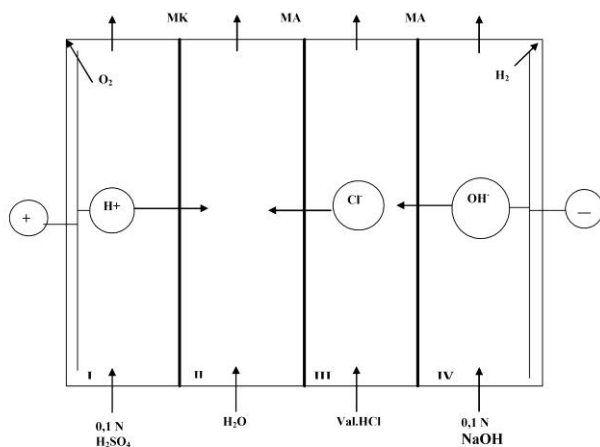


Рис. 1. Схема расположения мембран и поток растворов в четырехкамерном электродиализаторе. МА и МК- соответственно МА-40 и МК-40 типы мембран.

Установлено, что процесс трансформации эффективно протекает при предельной плотности тока ($i = 43 \text{ мА/см}^2$) и концентрации гидрохлорида валина в исходном растворе, равной 0.5 М. Процесс трансформации протекает без потери валина.

После электродиализа раствор валина упаривали до содержания СВ=48-50% и с помощью водной кристаллизации в двухступенчатом цикле выделяли кристаллы L-валина. Полученные кристаллы объединяли и водной перекристаллизацией, включающей растворение кристаллов, обесцвечивание, ультрафильтрацию, упаривание в вакууме, кристаллизацию и сушку, получали чистые кристаллы L-валина.

Ввиду того, что солянокислотная перекристаллизация используется также при разделении фенилаланина от тирозина [11,12] и лейцина от

изолейцина, полученные закономерности по кристаллизации и трансформации аминокислоты из гидрохлоридной формы в цвиттерионную, по-видимому, можно применять и в технологии получения этих аминокислот.

Выделение и очистка лимонной кислоты из ФР

Лимонная кислота и ее соли относятся к числу наиболее важных продуктов, производимых биотехнологическим способом в широких масштабах. Традиционный способ выделения лимонной кислоты из ФР включает отделение биомассы и ее осаждение из нативного раствора известковым молоком с последующим растворением цитрата кальция серной кислотой. Далее выделение лимонной кислоты из фильтрата осуществляется путем обесцвечивания, обессоливания, выпарки, кристаллизации и сушки [13]. При этом в производстве образуется большое количество жидких стоков и твердых отходов, в результате чего технология становится громоздкой и трудоемкой.

Известны способы выделения лимонной кислоты из нативного раствора экстракцией органическими растворителями, содержащими третичный амин [14], или октаном, содержащим тирдодециллуриламмин [15]. При этом необходимо использование высокоочищенных растворителей, что делает способ сложным в реализации и дорогим.

В последнее время значительное внимание уделялось сорбционному способу выделения как лимонной кислоты, так и цитратов [16,17]. Недостатком способа является использование большого объема смолы, что приводит к расходу большого количества кислоты, основания и деминерализованной воды для регенерации смол и образованию значительных объемов регенерационных и сорбционных стоков.

В работах [18,19] описан электродиализный метод получения лимонной кислоты из ее натриевой соли из модельного раствора.

Основным недостатком электродиализного способа получения лимонной кислоты является то, что при этом нативный раствор очищается лишь от катионов.

Экспериментальная часть

КЖ лимонной кислоты получена культивированием штамма-продуцента *Yarrowia Lipolytica* ВКМ У-2820 Д в питательной среде. В конце ферментации лимонная кислота в КЖ накапливается в форме цитрата натрия.

Электромембранную трансформацию цитрата натрия в лимонную кислоту проводили в электродиализаторе с межмембранным расстоя-

нием 3 мм. В анодной камере циркулировал 0.1 н раствор H_2SO_4 , а в катодной — 0.1 н раствор NaOH.

Концентрация цитрата натрия в растворе составляла 74 г/л. Величина предельной плотности тока в исследуемой системе составляла 26.4 мА/см² [20].

Концентрации лимонной кислоты и ее солей определяли переводом их в пентабромацетон и экстракцией хлороформом с последующим определением оптической плотности экстракта при длине волны 245 нм.

Обессоливание и обесцвечивание раствора лимонной кислоты после электродиализа осуществляли пропусканием раствора по направлению снизу вверх через три последовательно соединенные ионообменные колонки, заполненные сульфокатионитом КУ-2×8 в H^+ -форме, анионитом ЭДЭ-10 П в цитратной форме и ионсорбентом ИА-1р в Cl^- -форме. Количество смолы, загружаемой в каждую колонку, определяли исходя из общего количества катионов, анионов и окрашенных компонентов в цитратном растворе [21].

Результаты и их обсуждение

Экспериментальные результаты по трансформации цитрата в лимонную кислоту в зависимости от продолжительности опыта приведены на рис. 2.

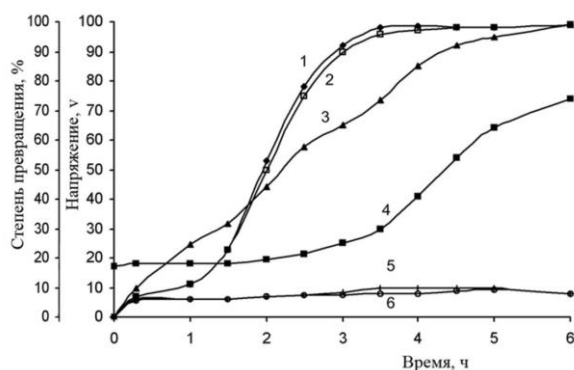


Рис. 2. Кинетика трансформации цитрата в лимонную кислоту в двух- (1), трех- (2) и четырехкамерном (3) электродиализаторе: 4, 5, 6 — изменение напряжения в цепи четырех-, трех- и двухкамерных электродиализаторов, соответственно.

Как видно из рис. 1, трансформация эквимольной смеси одно- и двузамещенных солей цитрата натрия в лимонную кислоту в двух- и трехкамерных электродиализаторах в зависимости от времени имеет вид S-образной кривой.

Из данных, полученных в двух- и трехкамерных электродиализаторах, следует, что если трансформация цитрата, равная 90%, протекает в течение 2.7-3.0 ч, то для увеличения этого показателя до 98-99.0% необходимо продлить опыт еще на 3.0 ч.

Из рис. 1 видно, что трансформация цитрата в кислоту в двух- и трехкамерных электродиализаторах протекает быстрее, чем в четырех-

камерном. Процесс трансформации цитрата в лимонную кислоту в двух- и трехкамерных электродиализаторах протекает со значительно меньшим расходом энергии (рис.1, кр. 5,6), чем в четырехкамерном (рис. 1, кр. 4). Если учитывать, что в процессе электродиализа в анодной камере двухкамерного электродиализатора происходит частичное (~5-7%) окисление лимонной кислоты с образованием α -кетоглutarовой кислоты, то процесс трансформации предпочтительно проводить в трехкамерном электродиализаторе. Так как полная трансформация цитрата в лимонную кислоту приводит к большому расходу энергии и при этом не удается освободиться от неорганических анионов, трансформацию цитрата путем электродиализа проводили до уровня 85-90%, а полную трансформацию цитрата из раствора после электродиализа и его очистки от анионов осуществляли с помощью ионного обмена [22].

Ионообменную деминерализацию раствора лимонной кислоты проводили путем пропускания его через две последовательно соединенные колонки, заполненные катионитом КУ-2×8 в H^+ -форме, и анионитом ЭДЭ-10П в цитратной форме. При этом происходит как полная трансформация цитрата в лимонную кислоту, так и обессоливание раствора. Результаты сорбции приведены на рис. 3.

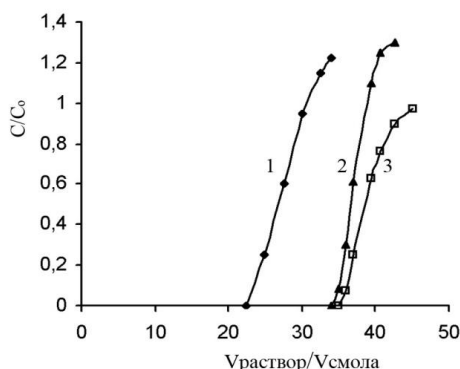


Рис. 3. Выходные кривые сорбции ионов Na^+ (1), Cl^- (2) и SO_4^{2-} (3) при обессоливании раствора лимонной кислоты после электродиализа: C_0 — концентрация ионов в растворе, поступающем в колонку; C — концентрация ионов в растворе, выходящем из колонки.

Исследования показали (рис. 3), что для полной трансформации цитрата через один объем катионита можно пропускать до 22 объемов раствора лимонной кислоты. Для освобождения от сопутствующих неорганических анионов через один объем анионита можно пропускать до 34 объемов раствора. Далее для очистки раствора от остаточных окрашенных пигментов и взвесей собранный обессоленный раствор лимонной кислоты подвергали обесцвечиванию с помощью активированного угля, после чего обессоленный и обесцвеченный раствор подвергали вакуум-упариванию до содержания сухих веществ (СВ) 72-74% и выделяли кристаллы лимонной кислоты изогидрической кристаллизацией.

Разработанный способ можно использовать также на стадии выделения других пищевых оксикислот (молочной, яблочной) из ФР.

Преимущество предложенного способа трансформации и обессоливания раствора лимонной кислоты заключается в том, что на стадии выделения в результате комбинирования электродиализного и сорбционного методов значительно уменьшается количество используемых ионов (до 12 раз по сравнению только с сорбционным методом) и химикатов, а также снижаются энергозатраты (до 2 раз по сравнению с электродиализным способом). Кроме того, в несколько раз снижается объем образующихся в производстве сорбционных и регенерационных стоков.

При биосинтезе лимонной кислоты с использованием вышеуказанного штамма-продуцента в ферментационном растворе накапливается также изолимонная кислота до ~10% от общего количества лимонной кислоты. Так как изолимонная кислота не кристаллизуется, она в основном накапливается в маточнике, из которого ее можно выделять в форме монокалийевой соли [16,22]. Выделение соли изолимонной кислоты значительно снижает себестоимость лимонной кислоты, т.к. изолимонная кислота примерно в 15-20 раз дороже лимонной.

Выделение и очистка микробного меланина из ФР и изучение его физико-химических свойств

Меланины — темнокрашенные высокомолекулярные нерегулярные полимеры, образующиеся в организмах при ферментативном окислении азотсодержащих и безазотистых полифенолов [23,24]. Они обладают радиопротекторными и антиоксидантными свойствами, являются сорбентом радионуклидов и тяжелых металлов и способны эффективно защищать живые организмы от ультрафиолетового излучения. Меланины используются в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве и других областях [25].

Для получения меланинов используют следующие технологии: химический синтез, предусматривающий окисление тирозина и его производных [26], экстракция из животного материала и растительного сырья [27,28], микробный синтез [29,30].

Вследствие большого химического разнообразия биологических материалов, являющихся сырьем для получения меланина, единого стандартного метода выделения и очистки не существует [31].

Экспериментальная часть

ФР меланина был получен при культивировании штамма-продуцента *Bacillus thuringiensis* K1 на питательной среде [30]. Концентрация меланина в ФР составляла 4-8 г/л.

Сорбцию меланина в динамических условиях проводили на колонке (6×70 см) при линейной скорости потока супернатанта по направлению снизу вверх, равной 0.034 см/с.

Элюцию меланина со смолы проводили 3.0% аммиачным раствором при скорости потока элюента через колонку по направлению сверху вниз, равной 0.015 см/с. Контроль за ходом процесса осуществляли измерением оптической плотности (ОП) раствора при 315 нм и сравнением полученной величины со значением ОП стандартного раствора синтетического меланина фирмы "Sigma".

ИК-спектры получали с использованием спектрометра типа "Nexus Nicolet FI-IR" (США) в таблетках KBr. Спектры ЭПР регистрировали при температуре 20°C на спектрометре типа "SE/X-2543 "Radiopan" (Польша) с высокочастотной модуляцией 100 кГц на частоте 9.4 ГГц. Спектральные измерения проводили на спектрометре "Perkin-Elmer 550SUV-VIS" (США).

Результаты и их обсуждение

Так как концентрация меланина в полученном ФР низкая, наиболее эффективным является применение сорбционного способа выделения пигмента из супернатанта. Исследование процесса сорбции меланина из супернатанта в статических условиях показало, что равновесное состояние в изученной системе устанавливалось через 2-4 ч в зависимости от типа применяемого сорбента (таблица).

Из приведенных данных следует, что из всех исследуемых сорбентов наибольшей емкостью по меланину обладают аниониты и порошкообразный активированный уголь марки ОУ-В. Емкость гранулированного активированного угля АГС-4 мала, что, по-видимому, связано с меньшей удельной поверхностью этой марки угля [32].

Как видно из данных таблицы, количество сорбированного меланина существенно зависит от гранулометрического состава анионитов (опыты 8,9). Поэтому для лучшей сорбции пигмента крупные гранулы ионосорбента размалывали и использовали фракции (-0.63 – +0.2 мм).

Сорбция меланина на смоле ИА-1р, по-видимому, обусловлена селективным взаимодействием между сорбатом и матрицей смолы, образованной в результате поликонденсации формальдегида, *m*-фенилендиамина и резорцина [32].

Исходя из полученных данных в динамических условиях на смоле ИА-1р проводили выделение меланина из супернатанта. Сначала рН супернатанта снижали от 8.9 до 3.5, затем раствор пропускали через ионообменную колонку, заполненную смолой ИА-1р в СГ-форме. Далее смолу промывали обессоленной водой, после чего меланин элюировали аммиачным раствором. Собранный аммиачный элюат подвергали ва-

куумному упариванию до концентрации меланина 200-250 г/л и раствор высушивали в сушильном шкафу с продувкой горячего воздуха (50-55°C). В результате высушивания получается черно-коричневая аморфная масса с металлическим блеском [30].

Таблица

Результаты сорбции меланина из супернатанта в зависимости от типа применяемого сорбента или смолы, величины pH раствора и размеров гранул смолы

Номер опытов	Наименование сорбента	pH супернатанта	pH супернатанта после сорбции	Концентрация меланина в исходном супернатанте, г/л	Концентрация меланина в супернатанте после сорбции, г/л	Емкость смолы или сорбентов к меланину, мг/мл
1	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	4.0	4.3	3.10	0.75	79.0
2	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	5.0	5.1	3.30	1.03	75.8
3	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	6.2	6.9	3.20	1.59	53.8
4	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	7.5	7.3	3.20	1.76	48.0
5	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	8.9	8.4	3.20	2.10	37.6
6	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	12.4	11.8	3.10	2.70	11.6
7	АВ-17 Cl ⁻ форма -0.75÷+0.5 мм	5.4	5.8	3.20	2.52	22.6
8	Dowex Cl ⁻ форма 100-200 меш.	5.4	6.2	3.20	1.13	69.2
9	АРА-8Р Cl ⁻ форма -0.75÷+0.5 мм	5.0	5.5	3.30	2.25	35.0
10	АРА-8Р Cl ⁻ форма -0.25÷+0.1 мм	5.0	5.5	3.30	1.85	48.3
11	ЭДЭ-10П Cl ⁻ форма -0.75÷+0.5 мм	5.4	5.8	3.20	1.85	45.0
12	Уголь актив. марка ОУ-В	5.0	6.6	3.30	1.00	76.6
13	Уголь актив. марка АГЦ-4	5.4	6.2	3.20	2.90	3.3
14	КУ-2×8 Н ⁺ форма -0.75÷+0.5 мм	5.4	1.6	3.20	2.25	28.3
15	КУ-2×8 NH ₄ ⁺ форма -0.75÷+0.5 мм	5.4	6.1	4.10	3.98	4.0
16	Полисорб 1	5.0	5.7	3.30	3.26	1.4
17	КМ целлюлоза КМ-32	5.0	5.7	3.30	3.25	1.7
18	Силикагель Ц-25И, 5/40 мк/м	5.0	5.6	4.20	4.12	2.7

Для установления принадлежности полученного пигмента к меланинам использовали качественные реакции с окислителями. Установлено, что водный раствор пигмента обесцвечивается H_2O_2 и HNO_3 . В присутствии небольшого количества FeCl_3 из раствора пигмента выпадает коричневый хлопьевидный осадок, который исчезает при увеличении количества добавленной соли. Результаты указанных реакций показали присутствие в полученном пигменте хиноидных и фенольных структур, что подтверждает его меланиновую природу [23, 24].

В ряде работ для определения принадлежности пигментов к эумеланинам или феомеланинам предлагается использовать отношение интенсивностей поглощения при 650 и 500 нм. Так, у синтетических эумеланинов отношение D 650/500 колебалось в диапазоне 0,25-0,33, а у синтетических феомеланинов – в диапазоне 0.1-0.14 [33,34]. Проведенные нами эксперименты показали, что отношение интенсивностей поглощения микробного и синтетического меланина при 650 и 500 нм составляло 0.328 и 0.315, соответственно, из чего следует, что оба меланина принадлежат к эумеланинам.

В ИК-спектре водорастворимого микробного меланина (рис 4) присутствовали полосы, характерные для меланинов [35, 36]. При сопоставлении ИК-спектров виноградных пигментов, пигментов, выделенных из природной и культивированной чаги, синтетического и полученного нами микробного меланина обнаруживается их сходство в отношении основных полос поглощения.

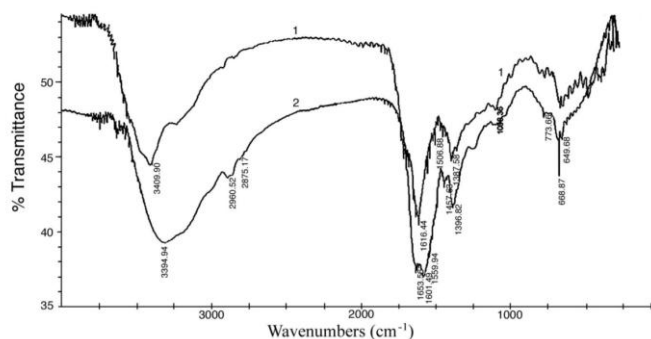


Рис. 4. ИК-спектры микробного (1) – разбавленного 1:200 и синтетического (2) – разбавленного 1:460 меланинов.

Особенностью меланинов как природных полимеров, содержащих развитые системы сопряженных связей, является наличие неспаренных электронов. Все меланины без исключения имеют ЭПР-поглощение в виде слегка асимметричного синглетного сигнала без сверхтонкой структуры с величиной g-фактора, варьирующей в пределах 2.003-2.004 [31].

Парамагнетизм природных меланинов оказывает существенное влияние на многие важные свойства: электропроводность, обменную

емкость, химическую реакционную способность, антиоксидантные свойства, биологическую активность и т.д.

На рис. 5 приведены ЭПР-спектры микробного и синтетического меланинов.

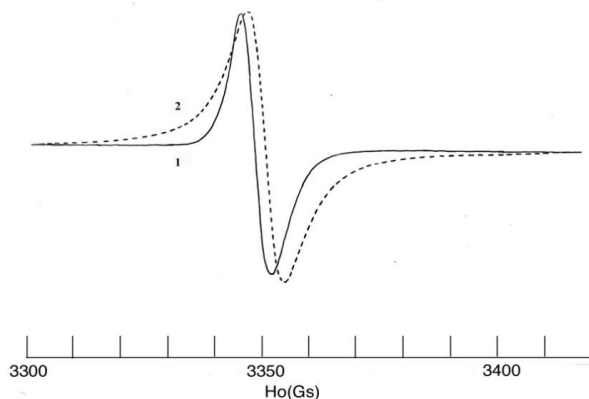


Рис. 5. Спектры ЭПР меланинов микробного(1) и синтетического (2) происхождения.

Спектр микробного меланина представлял собой слегка асимметричный синглет без сверхтонкой структуры с шириной линии между точками максимальной крутизны около 7 гаусс и значением g -фактора, равным 2.003. Двойное интегрирование этого спектра показало, что в нем содержится 0.21×10^{18} спин/г парамагнитных центров. Спектр синтетического меланина был также синглетным, но линия поглощения представляла уже лоренцевую форму с g -фактором, равным 2.004, и шириной около 8 гаусс. Число неспаренных электронов в нем 0.37×10^{18} спин/г.

Исследования показали, что в структуре микробного меланина имелись два типа парамагнитных центров, один из которых являлся лабильным, а другой — стабильным [36].

Изучено также влияние температурного воздействия на свойство микробного меланина [37]. Установлено, что аморфный осадок меланина устойчив при 120°C. При повышении температуры среды (до 200°C), по-видимому, начиналась деградация меланина, что приводило к частичному нарушению его структуры. В результате этого меланин терял способность растворяться в воде. При кипячении в щелочной среде меланин, по-видимому, восстанавливал первоначальную структуру и растворялся в воде. При температуре выше 350°C меланин подвергался разрушению и поэтому терял способность растворяться как в щелочной, так и кислой средах.

Исходя из данных гель-хроматографии (молекулярная масса микробного меланина составляла 4 кДа) и элементного анализа, водорастворимый меланин из культуры *Bacillus thuringiensis* serovar K1 имеет следующую эмпирическую формулу: $C_{185} H_{257} O_{62} N_{40} S$.

Препараты меланина были успешно использованы в сельском хозяйстве в качестве биостимулятора роста растений и в медико-биологических исследованиях.

Выделение и очистка биоингибирующего продукта из культуральных жидкостей

Биоингибирующие вещества в основном представляют собой синтезируемые бактериями (бактериоцины) или дрожжами (микоцины) продукты, которые друг от друга отличаются по молекулярному весу, химическому составу и спектру влияния [38].

За последние два десятилетия получение новых биоингибирующих продуктов приобрело более актуальный характер, т. к. увеличилось число бактерий, устойчивых к влиянию антибиотиков, что приводит к увеличению распространения болезней среди как населения, так и животных [39].

Биоингибирующие вещества имеют различную природу [40].

В литературе опубликовано много работ, посвященных классификации бактериоцинов [38-42], а также биосинтезу и выделению их из культуральных жидкостей (КЖ) в лабораторных условиях. В некоторых работах выделение бактериоцина из КЖ осуществляют центрифугированием, после чего фугат подвергают ультрафильтрации [40-43]. Далее из пермеата бактериоцин осаждают высаливанием сульфатом аммония, выделившийся осадок растворяют в растворе цитрата натрия и диализуют. Диализат подвергают гель-фильтрации. Собранные фракции объединяют и лиофильно высушивают. Сухую массу растворяют в воде и пропускают через колонку, заполненную карбоксиметилцеллюлозой. Со смолы целевой продукт элюируют раствором хлорида натрия. Собранные активные фракции смешивают, подвергают диализу и фракционируют с помощью ВЭЖХ. Активные фракции смешивают, лиофильно высушивают и после растворения в воде проверяют бактериоцидные свойства.

Предложенные подходы выделения и очистки биоингибирующих продуктов из КЖ в основном имеют исследовательский характер и являются нетехнологичными.

Цель исследования заключалась в разработке эффективного технологического способа выделения и очистки биоингибирующего продукта из КЖ молочнокислых бактерий, имеющего высокое бактериоцидное действие.

Экспериментальная часть

КЖ биоингибирующих веществ условно анаэробных штамов (*Lactobacillus acidophilus* 1991 ВКПМ 6257 и *Lactobacillus rhamnosus* 2012 ИНМИА 9614), полученную после выращивания в среде MRS при температуре 37°C в течение 48 ч, подвергали центрифугированию в течение 20 мин при 2900g. Супернатант подвергали ультрафильтрации путем пропускания его через разделительный ультрафильтрационный аппарат с полыми волокнами AP-02 периодического действия. Далее пермеат подвергали упариванию в вакууме до достижения СВ в пермеате 27-30%. Для осаждения целевого продукта к 30 мл упаренного пермеата при перемешивании добавляли сульфат аммония до достижения степени насыщения раствора 30-80%. рН упаренного раствора составлял 3.5 и 6.5. После 20-минутного перемешивания массу выдерживали при 4°C в течение 20 ч. Образовавшийся осадок отделяли от раствора центрифугированием в течение 15 мин при 5400g.

Сорбционный процесс выделения биоингибирующего вещества из супернатанта КЖ осуществляли пропусканием раствора через две последовательно соединенные ионообменные колонки. Первая колонка заполнена катионитом КУ-2×8, а вторая — анионитом ЭДЭ-10П в H^+ и OH^- формах, соответственно. Линейная скорость потока супернатанта по направлению снизу вверх составляла 0.034 см/с. Сорбированный целевой продукт со смолы элюировали аммиачным раствором. Фракции, обладающие биоингибирующим свойством, объединяли и подвергали вакуум-упариванию до СВ раствора 50-52%, и после разбавления определяли биоингибирующую активность полученного продукта.

Экстракцию биоингибирующего продукта из элюата осуществляли добавлением к 20 мл элюата определенного количества органического растворителя соответствующего типа и после 10-минутного экстрагирования массу оставляли на расслоение, после чего органический слой отделяли от водного. Вакуум-упариванием экстракта органический растворитель отделяли от водного слоя и определяли биоингибирующую активность упаренных растворов. Упаренный водный раствор присоединяли к исходному супернатанту для ионообменной очистки.

Содержание биоингибирующего продукта в различных образцах определяли методом образования ингибирующей зоны на тест-культурах.

В работе условной единицей антибактериальной активности (Аи/мл) считалась величина разбавления, при которой образец проявлял минимальную зону (2 мм) подавления роста тест-культур.

В качестве исследуемых тест-культур использовали условно-патогенные бактерии родов *Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium* Г-38 и *Bacillus Subtilis* Г-17-89.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что с помощью высаливания сульфатом аммония при различных значениях pH раствора целевого продукта не удается количественно провести осаждение биоингибирующего продукта из упаренного пермеата независимо от степени насыщения раствора от 35 до 80%, соответственно. По-видимому, причина невыпадения осадка связана с его небольшим молекулярным весом (700-1100 D) [44], низким содержанием в КЖ, а также высокой растворимостью.

Учитывая вышесказанное, для выделения целевого продукта из супернатанта применен метод ионообменной хроматографии пропусканием раствора биоингибирующего продукта через сульфокатионит и среднеосновной анионит, соответственно [45-46]. Обменная емкость анионита к целевому продукту составляла 1280 ед/мл.

Исследования показали, что на стадии ионного обмена ~77% от общего количества СВ исходного супернатанта как примеси очищается от целевого продукта. В процессе сорбции 79% биоингибирующего продукта сорбируется на смоле.

Фракции элюата, имеющие биоингибирующее свойство, подвергались вакуум-упарке до содержания СВ в растворе 52%. Активность биоингибирующего продукта в упаренном растворе 5800 ед/мл. Выход целевого продукта на стадии ионного обмена ~67%.

Показано, что при ионообменном методе выделения биоингибирующего продукта из супернатанта только частично удастся очистить целевой продукт от сопутствующих примесей. Для доочистки полученного элюата от примесей нами применялся экстракционный способ. В качестве экстрагента использовали органические растворители различного характера.

Из применяемых органических растворителей сравнительно эффективным оказались диметил- и диэтилкетоны и ацетонитрил. Высокая экстрагирующая способность вышеуказанных соединений, по-видимому, связана с большой величиной их дипольных моментов.

Микробиологическим анализом установлено, что полученный упаренный экстракт подавляет рост условно-патогенных (*E. Coli*, *S. typhimurium* и *B. Subtilis*) и патогенных (*Staphylococcus aureus*-21G, *Pseudomonas aeruginosa*-12, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis* 597) культур в 200-кратном разбавлении полученных образцов.

Исследования показали, что при экстракции ~62-65% биоингибирующего продукта из элюата переходит в органическую фазу. Если

учесть, что оставшиеся в водном растворе ~38-35% биоингибирующего продукта после отгонки экстрагента возвращаются на стадию ионнообменной очистки, то выход целевого продукта на стадии экстракции можно довести до 97%. Выход целевого продукта из супернатанта с учетом возврата растворов в технологический цикл составляет ~64%.

Авторы работы [47], исследующие продукты метаболизма, полученные в процессе культивирования аналогичных штаммов молочнокислых бактерий, показали, что антимикробное свойство конечного продукта связано с наличием в нем низкомолекулярного пептида. С помощью масс-спектрометра (MALDI-TOF/TOF) определен молекулярный вес пептида (1.1 КДа), а секвенированием установлено, что он состоит из 11 аминокислотных остатков следующего состава: Asn-Val-Gly-Val-Leu-X-Pro-Pro-X-Leu-Val.

Преимущество разработанного комбинированного способа выделения и очистки биоингибирующего продукта заключается в том, что с помощью ионообменной хроматографии из КЖ выделяется частично очищенный упаренный раствор биоингибитора, из которого путем экстракции малым объемом органического растворителя получается очищенный от неорганических и органических примесей продукт, имеющий сильное биоингибирующее действие на патогенные микроорганизмы.

Проведенные исследования позволили с использованием различных технологических подходов разработать эффективные технологии выделения и очистки различных классов БАВ из ФР, которые запатентованы в девяти патентах.

ՖԵՐՄԵՆՏԱՑԻՈՆ ՆԵՂՈՒԿՆԵՐԻՅ ՏԱՐԲԵՐ ԴԱՍԵՐԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՐԵՆ ԱԿՏԻՎ ՆՅՈՒԹԵՐԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ ԵՎ ՄԱՔՐՄԱՆ ՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՏԱԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա. Ե. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Գ. Ժ. ՆՈՎՆԱՆՆԻՍՅԱՆ, Կ. Ի. ԵՂՅԱՆ և Ա. Ս. ՍԱՂՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են ֆերմենտացիոն հեղուկներից (ՖՀ) տարբեր դասերի կենսաբանորեն ակտիվ նյութերի անջատման և մաքրման գործընթացները, որոշվել այդ պրոցեսների օրինաչափությունները և տեխնոլոգիական ցուցանիշները ու մշակվել ՖՀ-ից նրանց անջատման և մաքրման արդյունավետ տեխնոլոգիաները:

Մշակվել է առանց սորբցիոն հղանակի կիրառման ՖՀ-ից վալինի անջատման գործընթացը: Որոշվել են ազաթթվից վալինի տեխնիկական բյուրեղների վերաբյուրեղացման օպտիմալ տեխնոլոգիական ցուցանիշները ու էլեկտրաթաղանթային հղանակով վալինը հիդրոթերմիկ ձևից ցվիտտերիոնի փոխարկման հնարավորությունը:

Ուսումնասիրվել է ՖՀ-ի պերմեատից էլեկտրոդիալիզի հղանակով նատրիումի ցիտրատի տրանսֆորմացիան կիտրոնաթթվի ու ցուլց է տրվել, որ տեխնոլոգիապես նախընտրելի է աղի փոխարկումը թթվի իրականացնել մինչև 90-95%, իսկ մնացորդային ցիտրատի փոխարկումը կիտրոնաթթվի ու լուծույթի ազազրկումը իրականացնել իոնափոխանակային հղանակով:

Ուսումնասիրվել է ՖՀ-ի վերնստվածքային հեղուկից իոնափոխանակային եղանակով միկրոբային մեկանիների անջատման գործընթացը և որոշվել են սորբցիայի և էլյուցիայի օպտիմալ տեխնոլոգիական ցուցանիշները:

Ուսումնասիրվել են անջատված միկրոբային մեկանիների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները ու պարզվել կառուցվածքային մի շարք առանձնահատկություններ:

Մշակվել է կուլտուրալ հեղուկներից կենսաարգելակիչ նյութերի անջատման և մաքրման արդյունավետ եղանակ, ինչը հնարավորություն է տալիս ստանալ ուղեկցող խառնուրդներից մաքրված ախտածին մանրէների աճը արգելակող բարձր կենսաարգելակիչ հատկությամբ օժտված արգասիք:

TECHNOLOGICAL FEATURES IN ISOLATION AND PURIFICATION OF VARIOUS CLASSES OF BAS FROM FERMENTATION SOLUTIONS

A. E. AGHAJANYAN, G. J. HOVHANNISYAN, K. I. YEGHIYAN and A. S. SAGHYAN

Scientific and Production Center «Armbiotechnology» NAS RA

14, Gyurjyan Str., Yerevan, 0056, Armenia

Fax: (37410)654183

E-mail: armbiotech@gmail.com

The processes of isolation and purification of various classes of biologically active substances (amino acid, citric acid, microbial melanin and bioinhibiting substances) from fermentation solutions (FS) of microbial synthesis were studied, the regularities of these processes revealed, their technological parameters worked out and efficient technologies for isolation and purification of the afore-mentioned compounds from FS created.

The sorption-free process for L-valine isolation from the FS was developed. Optimal technological parameters for crystallization of valine technical crystals from hydrochloric acid solution and those for electromembrane method for valine transfer from hydrochloride form to zwitterion form were determined.

The process of sodium citrate transformation to citric acid from the FS permeate by electrodialysis was investigated and for the first time it has been shown that it is technologically preferable to carry out transformation up to 90-95%, and to conduct the transformation of the residual citrate after electrodialysis and solution desalting by the ion-exchange procedure.

The process of microbial melanin isolation from native solution with ion-exchange resins depending on the nature and structure of resins and physico-chemical characteristics of sorbate and sorbent was explored.

The optimal technological parameters of sorption and elution were established.

Physico-chemical properties of the isolated microbial melanin were studied and a number of structural peculiarities revealed.

The technologically available efficient method for isolation of the bioinhibiting substance from FS has been elaborated. Its essence is that a partially purified evaporated solution of bioinhibitor is isolated from the native solution by ion-exchange chromatography. From the latter by extraction with a small amount of organic solvent, a product purified from inorganic and organic impurities is obtained, which has a strong bioinhibiting action on pathogenic microorganisms.

The performed investigations allowed to develop efficient technologies for isolation and purification of various classes of BAS from FS using different technological approaches.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Simg S.P, Verma I.N.* // Biotechnol. Dull., 1987, v.5, №2, p. 5.
- [2] *Карабеков Б.П., Мурадян А.Г., Хачатурян Р.М., Манешин В.В., Агаджанян А.Е.* Разовый технологический регламент на производство высокоочищенного L-валина, №01-85, Ереван, НПО "Армбиотехнология", 1987, 248 с.
- [3] А. с. СССР N 1426041, МКИ C12P 13/08, 1985.
- [4] *Солдатов В.С., Куваева З.И., Бычкова В.А., Водопьянова Л.А.* // ЖФХ, 1999, т. 73, №6, с. 935.
- [5] Патент США N 4661606, МКИ C07D209/20, 1987.
- [6] *Куваева З.И., Солдатов В.С., Рыскал В.А.* Опытнo-промышленный регламент на производство L-валина, Трипольский биохимический завод, 1988, 69 с.
- [7] *Արմնիադիր* N 98001 ՀՀ, ՄԱԴ C07 C99/12, 1999.
- [8] *Агаджанян А.Е., Оганесян Г.Ж., Агаджанян Е.А.* // Хим. ж. Армении, 2002, т. 55, №4, с. 121.
- [9] *Фелднер В.А., Пейча Дз.А, Вискна А.Э.* // Изв. АН Латв. ССР, 1988, №2, с.216.
- [10] *Агаджанян А.Е., Варданян А.А., Сагиян А.С.* // Биотехнология, 2007, №4, с.41.
- [11] *Карабеков Б.П., Хачатурян Р.М., Манешин В.В.* Опытнo-промышленный регламент на производство L-фенилаланина кристаллического и кормового концентрата №64-1761-08-88. Ереван, НПО "Армбиотехнология", 1988, 325 с.
- [12] А. с. СССР №715572, 1980.
- [13] *Смирнов В.А.* Пищевые кислоты. М., Пищевая промышленность, 1983, 425 с.
- [14] Патент EP №0460854, C07C51/42, 1987.
- [15] Патент США №5426220, C07C 51/41, 1996.
- [16] Патент России №2090611, C12P7/48; B01D15/04, 1997.
- [17] Патент Италии №1256043, C12K, 1995.
- [18] *Лемба Я.К., Крамзака И.Р., Карклин Р.Я.* // Изв. АН Латв. ССР, 1988, №2, с. 77.
- [19] *Novalic S., Okwor J., Ruble K.* // Desalination, 1996, v. 105, №3, p. 277.
- [20] *Цатурян А.О.* // Хим. ж. Армении, 2013, т. 66, №1, с. 140.
- [21] *Агаджанян А.Е.* // Хим. ж. Армении, 2005, т. 58, №4, с. 122.
- [22] Патент России N2191828, C12P7/48; B01D15/04, 2002.
- [23] *Лях С.П.* Микробный меланогенез и его функция. М., Наука, 1981, 274 с.
- [24] *Prota G.* Melanins and Melanogenesis. N.-Y.: Acad. Press, 1992, 290 p.
- [25] *Барцевская М.И., Васильева С.М.* // Вопросы медицинской химии, 1999, №1, с. 3.
- [26] Патент США №5618519, C12P17/14, 1997.
- [27] Патент России №2083214, A61K 35/36, 1997.
- [28] USA Patent Application №20020041905, A1A61K035/78, 2002.
- [29] Патент России №2186105, C2 C12N1/14, 2002.
- [30] Патент Армении №1385, A2 C12P 17/00, 2003.
- [31] *Макардей Ф.В., Венгер Л.А., Слюсаренко Л.И., Барба И.Н.* // Изв. вузов. Химия и химическая технология, 1994, №4-6, с. 3.
- [32] *Агаджанян А.Е.* // Биотехнология, 2006, №1, с. 36.
- [33] *Ozeki H., Ito S., Wakamatsu K., Thody A.J.* // Pigment Cell Res., 1996, v. 9, p. 265.
- [34] *Wakamatsu K., Ito S.* // Pigment Cell Res., 2002, v. 15, p. 174.
- [35] *Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Бабицкая В.И.* // Прикл. биохимия и микробиология, 2002, №1, с. 68.
- [36] *Aghajanyan A.E., Hambardzumyan A.A., Hovsepyan A.S., Asaturian A.A., Vardanyan A.A., Saghiyan A.S.* // Pigment Cell Res., 2005, v. 18, p. 130.

- [37] *Aghajanyan A.E., Asaturian A.A., Hambardzumyan A.A., Sargsyan L.B., Hovsepyan A.S., Vardanyan A.A., Saghiyan A.S. // Applied Biochemistry and Microbiology, 2011, v. 47, №5, p. 500.*
- [38] *Juan C., Oscariz G., Pisabarro // Int. Microbiol, 2001, №4, p. 13.*
- [39] *Yoneyama H., Katsumata R. // Biosci Biotechnol. Biochtm, 2006, v. 70, №5, p. 1060.*
- [40] *Kozak W., Dardoeski J. // Lactocin-a bacteriocin produced by Streptococcus Lactis // Bull. Acad. Pol. Sci, 1977, v. 25, p. 217.*
- [41] *Chung-Hoi Kim, Geun-Eog Ji, Cheol Ahn // Food Sci. Biotechnol., 2000, v. 9, №4, p. 270.*
- [42] *Todorow S., Onno B., Sorokin O. // International Journal of Food Microbiology, 1999, v. 48, p. 167.*
- [43] *Lu R., Fasano S., Madayiputhiya N., Morin N., Nataro J., Fasano A. // J. Pediatr Gastroenterol Nutr., 2009, v. 49, p. 23.*
- [44] *Tkhruni F.N., K.J. Karapetyan, S.C. Chailyan. // Russian Journal of Infection and Immunity, 2014, September, special issue, p. 57.*
- [45] *Патент Армении №1723A2, C12P 1/04, 2006.*
- [46] *Патент Армении №2925A, C12P 1/04, 2015.*
- [47] *Mkrtchyan H, Gibbons S., Heidelberger S., Zloh M. // International Journal of Antimicrobial Agents, 2010, v. 35, p. 255.*