

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 577.112.388.2:54.04

ДИНАМИКА ВЫДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ ИЗ НАТИВНОГО РАСТВОРА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ПРОЛИНА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА ОБРАЗОВАНИЯ ОСНОВАНИЙ ШИФФА В ДИНАМИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ

Ж. Н. САРИБЕКЯН

Арцахский научный центр
НҚР, Степанакерт, ул. Тиграна Меца, 26
Факс: (047)949093
E-mail: zhaklinasaribekyan@gmail.com

Поступило 25 IX 2017

Исследованы процессы выделения отдельных аминокислот из нативного раствора культуральной жидкости (КЖ) микробиологического синтеза L-пролина при использовании метода, основанного на способности сопутствующих пролину первичных аминокислот в динамическом режиме образовывать свободные основания Шиффа с сорбированным на смоле АВ-17 с 50% насыщением двухзаряженными ионами 5-сульфосалицилового альдегида. Получены динамические кривые выхода отдельных аминокислот как на стадии образования оснований Шиффа сопутствующих аминокислот и выделения L-пролина, так и на стадии гидролиза шиффовых оснований и выделения сопутствующих аминокислот. Определены также оптимальные значения pH и температуры на стадии выделения L-пролина из нативного раствора КЖ.

Рис. 3, библи. ссылка 9.

Мировое производство большинства белковых аминокислот основано на микробиологическом синтезе, успех которого обусловлен как конструированием высокоактивных штаммов-продуцентов целевой аминокислоты, так и успешным решением ее выделения из ферментационных растворов, содержащих наряду с целевой аминокислотой также и другие сопутствующие аминокислоты [1-3]. Одной из важных

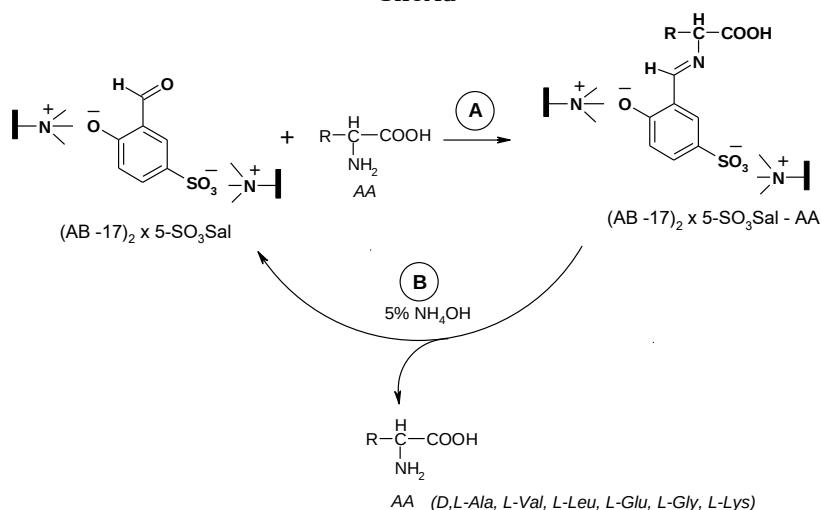
белковых аминокислот является L-пролин, для микробного синтеза которого в Научно-производственном центре "Армбиотехнология" НАН РА получен высокоактивный генетико-селекционный штамм-продуцент *Brevibacterium flavum* AP-111, который в процессе ферментации производит до 75-85 г/л L-пролина и не более 20% сопутствующих аминокислот (аланина, валина, лейцина, глицина, лизина, глутаминовой кислоты) от общего содержания аминокислот [4,5].

Недавно нами сообщалось о методе отделения пролина от сопутствующих аминокислот, основанном на способности первичных аминокислот, в отличие от пролина, образовывать основания Шиффа с карбонильными соединениями в динамическом режиме с использованием анионообменной смолы АВ-17 в 5-сульфосалицилальдегидной форме [6]. Этот метод был успешно испытан в процессах выделения L-пролина из культуральной жидкости, полученной в результате ферментации штамма *Brevibacterium flavum* AP-111.

Учитывая то обстоятельство, что наряду с целевой аминокислотой ценными продуктами являются также сопутствующие аминокислоты как в индивидуально чистом виде (для фармацевтической промышленности) [7,8], так и в форме аминокислотной смеси (для сельскохозяйственных нужд) [8,9], в настоящей работе исследовалась динамика выделения отдельных аминокислот из нативного раствора КЖ на стадиях отделения пролина и вымывания сопутствующих аминокислот со смолы. Поскольку известно, что при получении оснований Шиффа с первичными аминокислотами в динамическом режиме наибольшую эффективность проявляет анионообменная смола АВ-17 с 50% насыщенностью двухзаряженными ионами 5-сульфосалицилового альдегида $[(AB-17)_2 \times 5-SO_3Sal]$ [6], для изучения динамики выделения аминокислот из нативного раствора нами в качестве матрицы была выбрана именно эта смола.

Нами исследовалась динамика выхода отдельных аминокислот из колонки как в процессе связывания сопутствующих аминокислот на смоле посредством образования оснований Шиффа с реакционноспособными частицами 5-сульфосалицилового альдегида смолы (**A**), так и на стадиях разложения шиффовых оснований и выделения сопутствующих аминокислот (**B**) (схема).

Схема



Нативный раствор смеси аминокислот, полученной из КЖ микроорганизмического синтеза пролина с применением продуцента *Brevibacterium flavum* AP-111, в составе L-пролина — 78, L-валина — 4.0, D,L-аланина — 4.5, L-изолейцина — 1.2, L-лизина — 1.4, L-глутаминовой кислоты — 1.8, глицина — 3,0 г/л, пропускали через колонку, заполненную ионообменной смолой АВ-17 в форме 50% насыщения частицами 5-сульфосалицилового альдегида $[(AB-17)_2 \times 5-SO_3Sal]$ в направлении сверху вниз со скоростью 0.5 объема раствора смолы за 1 ч. При этом все сопутствующие первичные аминокислоты взаимодействуют с реакционноспособными группами сульфосалицилового альдегида с образованием стабильных оснований Шиффа непосредственно на смоле и задерживаются в колонке (путь А). А пролин как иминокислота не способен образовывать основания Шиффа и выходит из колонки. После насыщения смолы шиффовыми основаниями аминокислот начинается пропуск сопутствующих аминокислот. Количества отдельных сопутствующих аминокислот в выходящих из колонки растворах определяли через определенные промежутки времени методом ТСХ, контрольные анализы проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе марки "Nexera X2 (Shimadzu, Japan)". На основании полученных данных выстроили динамические кривые выходов отдельных аминокислот из колонки (рис. 1).

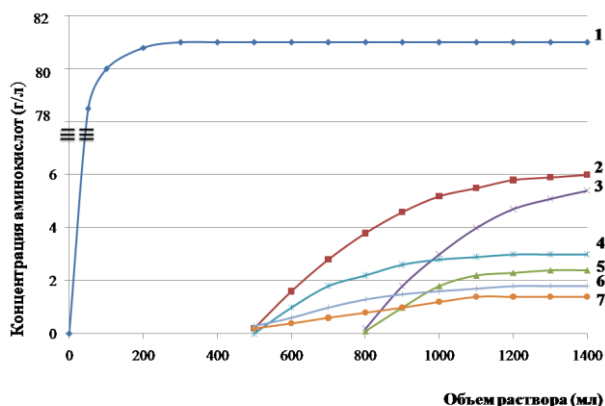


Рис. 1. Кривые выхода отдельных аминокислот из колонки со смолой (AB-17)₂x5-SO₃Sal (100 мл) в процессе выделения L-пролина из нативного раствора КЖ (путь А): 1. L-Pro; 2. D,L-Ala; 3. Val; 4. Gly; 5 L-Ileu; 6. L-Glu; 7. L-Lys.

Как видно из представленных динамических кривых, в процессе выделения пролина из нативного раствора КЖ вначале из колонки выходит только пролин, и количество очищенного раствора пролина составляет примерно 5 объемов по отношению к объему смолы. После насыщения смолы основаниями Шиффа сопутствующих аминокислот начинается проскок отдельных сопутствующих аминокислот, причем после пропуска примерно 5 объемов нативного раствора по отношению к объему смолы из колонки начинают выходить аланин, глицин, глутаминовая кислота и лизин. Проскок валина и изолейцина из колонки начинается после пропуска через колонку примерно 8 объемов относительно объема смолы исходного нативного раствора. Таким образом, данная смола обеспечивает не только очистку пролина от всех сопутствующих аминокислот, но и предоставляет возможность отделить валин и изолейцин от остальных сопутствующих аминокислот, что особенно важно для их дальнейшего выделения.

С целью изучения динамики выделения сопутствующих L-пролину аминокислот осуществляли гидролиз их оснований Шиффа непосредственно на смоле пропуская через колонку 3-4 объема 5% водного раствора аммиака. До пропуска раствора аммиака колонку промывали дистиллированной водой до полного вытеснения нативного раствора КЖ из межгранульного пространства смолы. Пропускание раствора аммиака сопровождается гидролизом оснований Шиффа и выделением сопутствующих аминокислот из смолы. На основании полученных данных выстроены динамические кривые выходов отдельных сопутствующих аминокислот из колонки (рис. 2).

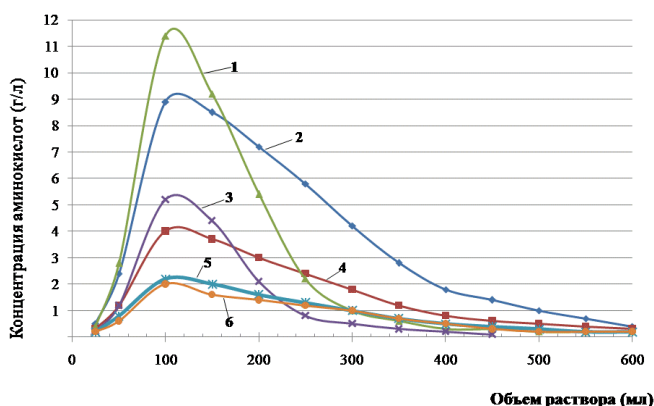


Рис. 2. Кривые выхода отдельных аминокислот из колонки со смолой (AB-17)₂ x 5-SO₃Sal (100 мл) в процессе разложения оснований Шиффа и элюции САК (путь Б): 1. D,L-Ala; 2. Val; 3. Gly; 4. L-Ileu; 5. L-Glu; 6. L-Lys.

Из представленных динамических кривых следует, что валин и изолейцин сравнительно труднее элюируются со смолы, чем другие сопутствующие аминокислоты. Учитывая то обстоятельство, что именно эти две аминокислоты относительно дольше задерживаются на смоле в период проскока сопутствующих аминокислот в процессе выделения пролина из нативного раствора (рис. 1), можно предположить, что причина этого кроется в относительно бóльшей стабильности их основания Шиффа с реакционноспособной группой 5-сульфосалицилового альдегида смолы.

С целью оптимизации процесса выделения пролина из нативного раствора были исследованы смеси аминокислот и определены оптимальные значения pH и температуры нативного раствора, обеспечивающие максимальные выходы очистки целевой аминокислоты. Результаты приведены на рис. 3.

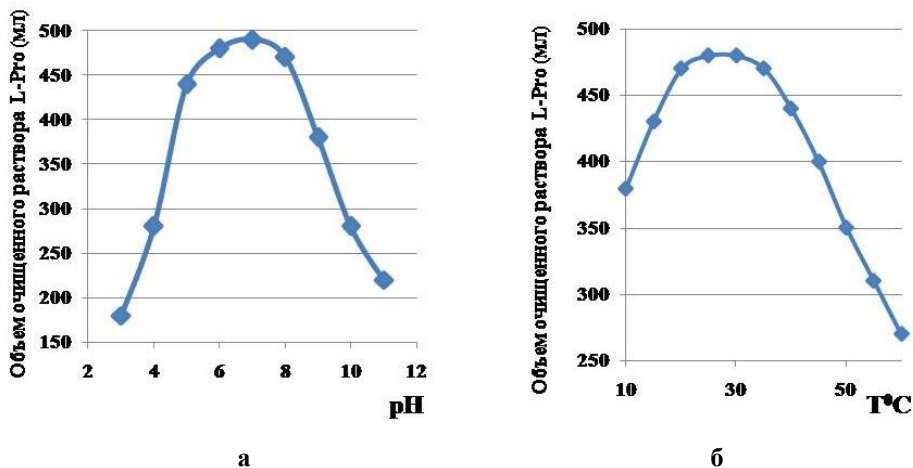


Рис. 3. Зависимость эффективности очистки пролина от pH(а) и температуры (б) нативного раствора при использовании смолы (AB-17)₂x5-SO₃Sal (100 мл): соотношение L-Pro/сопутствующие аминокислоты = 80/20 (%), скорость пропускания раствора – 5 объемов раствора / 1 объем смолы / 1 ч в направлении сверху вниз.

Из полученных данных следует, что максимальное отделение пролина от сопутствующих аминокислот происходит в интервалах pH 5.8-7.8 и температуры 20-35°C. При значениях pH и температуры выше и ниже указанных интервалов, возможно, происходит незначительное образование или частичный гидролиз шиффовых оснований сопутствующих аминокислот с альдегидными фрагментами смолы.

Экспериментальная часть

Аминокислотный анализ растворов проводили методами ТСХ на пластинках "Silufol" (Merk), бумажной хроматографии и на автоматическом аминокислотном анализаторе "Nexera X2" (Shimadzu, Japan). В качестве буферного элюента для ТСХ использовали смесь растворителей этанол-бутанол-ацетон-аммиак-вода, 2:2:4:3:1, а для бумажной хроматографии — бутанол-уксусная кислота-вода, 4:1:5. В работе использовались аминокислоты производства "ACROS Organics" (Бельгия) и НПЦ "Армбиотехнология" НАН РА, 5-сульфосалициловый альдегид, анионообменная смола АВ-17, NH_4OH , HCl , NaOH , CH_3COOH , CH_3COCH_3 — "Реахим" (РФ).

Форма смолы $(\text{AB-17})_2 \times 5\text{-SO}_3\text{Sal}$ была получена перемешиванием в 0.5 л колбе 100 мл смолы АВ-17 в OH^- форме (обменная емкость 0.7 г-экв/л) с раствором 7.84 г 5-сульфосалицилового альдегида (0.035 г-экв) в 200 мл воды в течение 1 ч с последующим промыванием смолы дистиллированной водой до нейтральных значений pH промывных вод.

Изучение динамики отделения пролина от сопутствующих аминокислот (САК). Нативный раствор смеси аминокислот при комнатной температуре пропускали через ионообменную колонку, заполненную 100 мл смолы $(\text{AB-17})_2 \times 5\text{-SO}_3\text{Sal}$ в направлении сверху вниз со скоростью 40-60 мл/ч. Выходящий из колонки раствор собирали в количестве 14 фракций по 100 мл и определяли их аминокислотный состав.

Изучение динамики выделения САК. С целью вытеснения нативного раствора смеси аминокислот из межгранульного пространства смолы колонку промывали 300 мл дистиллированной воды. Затем через колонку в направлении сверху вниз со скоростью 100 мл/ч пропускали 600 мл 5% водного раствора аммиака. Собирали 6 фракций по 100 мл выходящего из колонки раствора и определяли их аминокислотный состав, как было указано выше.

Определение оптимальных значений pH и температуры осуществляли посредством пропускания через колонку с рубашкой, заполненную 20 мл смолы $(\text{AB-17})_2 \times 5\text{-SO}_3\text{Sal}$, нативного раствора смеси аминокислот при разных температурах (10, 20, 30, 40, 50, 60°C) и pH среды (3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Температурный режим раствора в межгранульном прост-

ранстве смолы обеспечивали путем подачи воды с определенной температурой через рубашку колонки, а pH исходного раствора регулировали добавлением водных растворов уксусной кислоты и аммиака. Аминокислотный анализ собранных растворов осуществляли, как было указано выше.

ՊՐՈԼԻՆԻ ՄԱՆՐԵԱԲԱՆԱԿԱՆ ՍԻՆԹԵԶԻ ԿՈՒՏՈՒՐԱԼ ՆԵՂՈՒԿԻ ՆԱՏԻՎ ԼՈՒԾՈՒՅԹԻՑ ԱՍԻՆԹԵԶԱՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ ԴԻՆԱՄԻԿԱՆ ՇԻՖԻ ՆԻՄՔԵՐԻ ԱՌԱՋԱՅՄԱՆ ՄԵԹՈԴԻ ԿՐԱՌՄԱՆ ԴԵՊԲՈՒՄ

Ժ. Ն. ՍԱՐԻԲԵԿՅԱՆ

Հետազոտվել է L-պրոլինի մանրէաբանական սինթեզի կուլտուրալ հեղուկից ստացված նատիվ լուծույթից առանձին ամինաթթուների անջատման պրոցեսները դինամիկ պայմաններում 5-սուլֆոսալիցիլալդեհիդի երկլիցքավորված մասնիկներով 50% հագեցված AB-17 խեժի ալդեհիդային մնացորդների հետ պրոլինին ուղեկցող առաջնային ամինաթթուների կայուն ազատ Շիֆի հիմքեր առաջացնելու հատկությունների վրա հիմնված մեթոդի օգտագործման պարազայում: Ստացվել են առանձին ամինաթթուների անջատման դինամիկ կորերը ինչպես ուղեկցող ամինաթթուների Շիֆի հիմքերի առաջացման և պրոլինի անջատման փուլում, այնպես էլ Շիֆի հիմքերի հիդրոլիզի և ուղեկցող ամինաթթուների անջատման փուլում: Որոշվել են նաև միջավայրի pH-ի և ջերմաստիճանի օպտիմալ արժեքները մանրէաբանական սինթեզի կուլտուրալ հեղուկի նատիվ լուծույթից պրոլինի անջատման փուլում:

DYNAMICS OF ISOLATING AMINO ACIDS FROM THE NATIVE SOLUTION OF CULTURE LIQUID OF PROLINE MICROBIOLOGICAL SYNTHESIS WHEN USING THE METHOD OF SCHIFF BASES FORMATION

Zh. N. SARIBEKYAN

Artsakh Scientific Center

26, Tigran Mets Str., Stepanakert, Nagorno-Karabakh Republic

Fax: (047)949093

E-mail: zhaklinasaribekyan@gmail.com

The processes of isolating individual amino acids from the native solution of culture liquid (CL) of L-proline microbiological synthesis using the method based on the ability of proline concomitant primary amino acids to form in a dynamic mode free Schiff bases with aldehyde moieties of resin AB-17 with 50% saturation of double-charged particles of 5-sulfosalicylic aldehyde have been studied. Dynamic output curves of individual amino acids both at the stage of formation of Schiff bases of concomitant amino acids and L-proline isolation, and at the stage of hydrolysis of Schiff bases and isolation of concomitant amino acids were obtained. Optimal values of pH and temperature at the stage of L-proline isolation from the native solution of CL were also determined.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ikeda M. // *Advances in Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2003, v. 79, p. 1.
- [2] Sahm H., Eggeling L., de Graaf A.A. // *Biol. Chem.*, 2000, v. 381, №9-10, p. 899.
- [3] Ohnishi J., Hayashi M., Mitsuhashi S., Ikeda M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, v.62, №1, p. 69.
- [4] Кочарян Ш.М., Карапетян Ж.В., Келешян С.К., Азизян А.Г., Акопян Э.М., Арушанян А.В., Амбарцумян А.А. Способ получения L-пролина / АС СССР № 1409659, 1988.
- [5] Kocharyan Sh. M., Karapetian Zh.V., Keleshian S.K., Azizian H.G., Akopian E.M., Arushanian A.V., Hambartzumian A.A. Method for producing of L-proline by fermentation / Patent Hungary № 199898, 1991.
- [6] Сарибекян Ж.Н., Симонян А.М., Агаджанян А.А., Сагиян А.С. // *Хим. ж. Армении*, 2017, т. 70, № 3, с. 417.
- [7] Садовникова М.С., Беликов В.М. // *Успехи химии*, 1977, т. 47, с. 357.
- [8] Сагиян А.С. Энантиомерно чистые аминокислоты, способы получения. М., Наука, 2010, с. 9.
- [9] Ashot S. Saghyan, Peter Langer. Asymmetric synthesis of non-proteinogenic amino acids // WILEY-VCH, 1016, p. 1.
- [10] Ottenheim J.H. Amino Acids fortification of the prefein foods, 1969, p. 446.