

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

А.Е. АГАДЖАНИЯН, Г.Ж. ОГАНЕСЯН, Д.Г. АРУТЮНЯН, Р.А. БРУТЯН

*НИИ биотехнологии АОЗТ, 375056, Ереван*

Исследован процесс флокуляции взвешенных веществ и биомассы из культуральной жидкости (КЖ) синтеза глутаминовой кислоты в зависимости от pH среды, типа флокулянта и его концентрации, времени отстаивания; определены оптимальные параметры отделения осадка, обесцвечивания пермеата глутаминовой кислоты, проведенного на анионите АВ-16ГС в зависимости от температуры раствора, скорости потока жидкости; основные параметры процесса кристаллизации и перекристаллизации глутаминовой кислоты. Полученные данные использованы для разработки технологии выделения и очистки глутаминовой кислоты из КЖ и получения моноглутамата натрия.

Ուսումնասիրվել է կուլտուրալ հեղուկից (ԿՀ) կախությունների և կենսազանգվածի ֆլոկուլացման պրոցեսը կախված միջավայրի pH-ից, ֆլոկուլյանտի տիպից ու կոնցենտրացիայից, նստվածքազդյացման ժամանակից, և որոշվել են պրոցեսի օպտիմալ պարամետրերը: АВ-16ԳՍ անիոնիտով հետազոտվել է գլուտամինաթթվի պերմեատի գունազրկման պրոցեսը, կախված ջերմաստիճանից, խեժով անցկացվող լուծույթի ծավալից և հոսքի արագությունից, ու որոշել պրոցեսի պարամետրերը: Որոշվել են բյուրեղացման և վերաբյուրեղացման պրոցեսների հիմնական պարամետրերը: Ստացված փորձնական տվյալների հիման վրա մշակվել են ԿՀ գլուտամինաթթվի անջատման ու մաքրման, ինչպես նաև նատրիումի մոնոգլուտամինատի ստացման տեխնոլոգիաներ:

The process of flocculation of hanging substances and biomass from cultural liquid (CL) has been investigated depending on the medium pH and flocculant type and its concentration, the sedimentation time, and optimal parameters of this process were determined. Glutamic acid permeate discolouration process with anionite АВ-16ԳՍ depending on temperature, solution volume and flow rate was investigated and the optimal parameters were determined. The basic parameters of crystallization and double crystallization were found. The data obtained in these experiments were used for development of technologies for glutamic acid extraction and purification from CL and formation of sodium monoglutamate.

### *Кислота глутаминовая - флокулянт хитозан - технологические параметры выделения*

Глутаминовая кислота и ее мононатриевая соль находят широкое применение в пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве и т. д. [3,6].

Ввиду сложности компонентного состава КЖ глутаминовой кислоты вопросы определения основных технологических параметров выделения и очистки ее являются актуальными. В литературе эти вопросы освещены недостаточно.

**Материал и методика.** КЖ микробиологического синтеза l-глутаминовой кислоты, полученной культивированием штамма-продуцента l-глутаминовой кислоты *Brevibacterium flavum* НИТИА-39 (ВКПМ-5031), представляет собой суспензию темно-коричневого цвета, содержащую микробные клетки, частицы мела и другие взвеси, составляющие около 1% в пересчете на сухое вещество (СВ). Содержание глутаминовой кислоты составляет 40-52 г/л, сопутствующие аминокислоты (аланин, глицин, лизин) в сумме — 4-5 г/л, азотсодержащие

и безазотистые органические вещества в сумме —1,0-1,5% в пересчете на СВ. Вязкость КЖ составляет 1,6-2,0 спз, плотность 1,04-1,05 г/см<sup>3</sup>.

Устойчивость суспензии оценивали по скорости образования осадка.

Скорость осаждения взвесей определяли измерением высоты осадка (Н) через 5, 10, 20, 30 и 60 мин отстояния после добавления к подогретой до 50-55° КЖ соответствующего количества флокулянта. Далее жидкость перемешивали в течение 15-20 мин, охлаждали до 18-20° и выдерживали 60 мин. Высота слоя отстаиваемой взвеси во всех опытах равнялась 10 см [5].

Обычно при микробиологическом способе производства биологически активных веществ коллоидальные частицы и клетки микроорганизмов из раствора осаждают коагуляцией с использованием кислотно-солевых коагулянтов или флокуляцией с последующим отделением осадка от раствора фильтрацией или центрифугированием [4].

При производстве глутаминовой кислоты применение кислотно-солевых коагулянтов неприемлемо, так как при величине рН 3,0-3,3 происходит частичное осаждение целевого продукта и его безвозвратная потеря с осадком. Кроме того, раствор загрязняется минеральными солями, которые в конечном счете переходят в состав целевого продукта. Поэтому для улучшения седиментационных и фильтрационных свойств КЖ ее обрабатывали растворами флокулянтов. На основании результатов предварительных опытов в качестве флокулянта использовали природный поликатионит хитозан, получаемый из различных источников хитинсодержащего сырья в виде порошка, и сильноосновной поликатионит ППС, представляющий собой продукты полимеризации мономерной соли 2-метил-5-винилпиридина и диметилсульфата. ППС в промышленности выпускается в форме жидкого геля с концентрацией основного вещества 45% [2].

Осадок от надосадочной жидкости отделяли центрифугированием при скорости вращения ротора 3000 об/мин и времени центрифугирования 15-20 мин.

Концентрацию глутаминовой кислоты в образцах определяли бумажной хроматографией [7] и с помощью аминокислотного анализатора типа ААА-881.

Микрофильтрацию фугата осуществляли пропусканием жидкости через мембраны "Владипор" типа МФА-МА с размером пор 0,1 мк.

Светопропускание фугата определяли на спектрофотометре типа СФ-26,  $\lambda=410$  нм,  $l=1,0$  см.

Обесцвечивание подогретого пермеата осуществляли путем пропускания раствора через термостатированную ионообменную колонку, заполненную среднеосновной смолой АВ-16 ГС в С1-форме со скоростью потока жидкости 0,1-0,15 м/ч.

Содержание СВ в растворе определяли рефрактометром, а вязкость раствора — вискозиметром.

Степень осветления фугата определяли колориметрически на ФЭК-56М при  $\lambda=540$  нм,  $l=0,5$  см с использованием уравнения:

$$\tau = \frac{D_{исх} - D_{к.осв}}{D_{исх}} \cdot 100\%,$$

где  $D_{исх}$  — оптическая плотность (ОП) исходного раствора;  $D_{к.осв}$  — ОП раствора после обесцвечивания.

Подготовку активированного осветляющего угля марки ОУВ осуществляли контактированием угля с 1,5%-ным раствором соляной кислоты при температуре 60° в течение 60 мин с последующим отделением твердой фазы от жидкой фильтрацией и промывкой угля обессоленной водой до отсутствия ионов хлора в фильтрате.

**Результаты и обсуждение.** Как видно из рис. 1, оптимальное значение рН раствора, при котором обоими испытанными флокулянтами шло хорошее осаждение взвесей из КЖ, 3,5-5,5. При этом происходило расслоение суспензии с образованием плотного осадка и прозрачной надосадочной жидкости. При рН больше 8,5 образовывался хлопьевидный осадок, легко

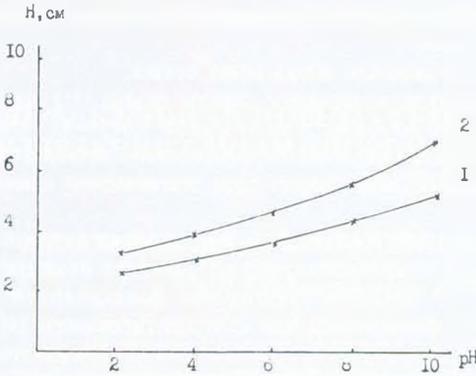


Рис. 1. Зависимость высоты слоя осадка от величины рН среды. 1 - с применением хитозана (с=18 мг/л); 2 - с применением ППС (с=35мг/л).

разрушающийся при перемешивании. Наблюдаемая картина характерна для обоих типов флокулянтов. При этом основное количество осадка (~80%) из раствора оседало в течение 25-30 мин.

При исследовании влияния концентрации применяемых флокулянтов на высоту слоя образовавшегося осадка было установлено, что оптимальная концентрация для хитозана составляет 16-19 мг/л, а для ППС

— 32-36 мг/л.

При оптимальных концентрациях флокулянтов и величинах рН 3,5-5,5 после центрифугирования образуется достаточно осветленный раствор.

Флокуляция с применением хитозана более эффективна, чем с применением ППС (рис. 1).

С целью освобождения от остаточных взвесей и высокомолекулярных соединений фугат подвергали микрофльтрации. При этом контролировали следующие показатели исходного и полученного раствора: содержание целевой аминокислоты, ОП, СВ и вязкость (табл. 1).

Таблица 1. Параметры обрабатываемой жидкости на разных стадиях очистки.

Наименование раствора	Показатели			
	СВ, %	ОП	Конц. глут. к-ты, г/л	Вязкость, спз
Фугат	17,0	0,82	50,2	2,06
Пермеат	15,7	0,67	48,8	1,52

Как видно из табл. 1, микрофльтрация фугата снижала оптическую плотность на 0,15 единиц, а вязкость раствора на 0,54 спз, что указывает на удаление из раствора части высокомолекулярных веществ и их агрегатов. Это заметно улучшало последующие стадии выделения и очистки.

Чистота выделяемой глутаминовой кислоты в значительной мере зависит от степени очистки раствора от окрашенных соединений. Для освобождения от них применяли ионитовый способ обесцвечивания пермеата. Ранее нами было показано [1], что процесс обесцвечивания на анионите эффективно протекает при температуре раствора 42-50°, что и было применено в этих экспериментах. При пропускании 15 объемов пермеата на один объем смолы показатели осветления раствора достаточно высоки и составляют примерно 85% (рис. 2). Введение стадии осветления раствора позволяет значительно,

без существенного снижения качества кислоты, повысить степень упаривания раствора перед кристаллизацией.

Для выделения кристаллов глутаминовой кислоты осветленный фильтрат упаривали под вакуумом при температуре 50-60° и остаточном давлении 0,015-0,017 МПа до заданного объема. Затем pH раствора снижали с помощью соляной кислоты до значения 3,2 (до изоэлектрической точки).

Полученную массу охлаждали при перемешивании до 10° и после выдерживания раствора при этой температуре в течение 5-6 ч выпавшие кристаллы из раствора отделяли фильтрацией через поливинилхлорную ткань.

Анализом содержания глутаминовой кислоты в высушенных кристаллах и в маточном растворе определяли выход кислоты (табл.2).

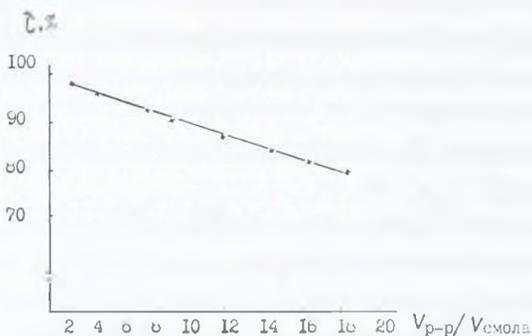


Рис. 2. Зависимость степени осветления пермеата на анионите АВ-16 ГС от объема пропущенного раствора.

Таблица 2. Зависимость выхода глутаминовой кислоты от степени упаривания раствора

№ п.п.	Конц. глут. к-ты в р-ре, г/л	Степень упаривания $\frac{V_{ис.к}}{V_{к.оп}}$	Выход глут. к-ты, %	Содержание глут. к-ты в продукте, %	Содержание глут. к-ты в маточном р-ре, г/л
1	49,7	2,0	62,5	97,4	19,8
2	48,8	2,8	72,4	96,8	21,3
3	47,9	4,0	78,2	94,1	22,6
4	47,4	4,5	78,9	92,6	22,5
5	48,0	5,2	87,6	91,2	24,3
6	45,0	6,5	92,4	87,4	25,7
7	47,1	7,4	93,6	85,2	27,2

Из полученных данных следует, что увеличение концентрации глутамата натрия в упаренном растворе и его перевод в форму глутаминовой кислоты с охлаждением раствора приводит к увеличению выхода глутаминовой кислоты с 62,5 до 93,6 %. Однако при этом чистота продукта уменьшается на 12 %. Поэтому с технологической точки зрения выгоднее, чтобы перед кристаллизацией содержание СВ в упаренном растворе составляло 45-60% (степень упаривания раствора 4,0-5,2). При этом концентрация остаточных углеводов, определяющая в основном вязкость раствора, не должна превышать 8-10 спз.

Опыты показали, что увеличение продолжительности кристаллизации с 5-6 ч до 65-70 ч приводит к повышению выхода глутаминовой кислоты лишь на 3-5 %. Из данных табл. 2 следует также, что концентрация глутаминовой кислоты в маточном растворе практически не зависит от степени

упаривания и сохраняется на уровне 20-27 г/л.

Исследование процесса очистки глутаминовой кислоты от примесей органического и неорганического характера показали, что в отличие от ряда аминокислот физико-химические свойства глутаминовой кислоты позволяют с помощью водной перекристаллизации очистить ее от примесей и получить препарат квалификации "х.ч." без дополнительного ионитового обессоливания. Это обусловлено сравнительно низкой растворимостью глутаминовой кислоты в воде и крутым подъемом кривой растворимости кислоты в зависимости от температуры раствора [8].

Водную перекристаллизацию глутаминовой кислоты проводили растворением кристаллов в минимальном количестве обессоленной воды при 80°. Горячий раствор осветляли заранее подготовленным активным углем в количестве 1,0-1,5 % от веса раствора и наносили на поверхность фильтрующей воронки в виде "угольной подушки". Пропущенный через "угольную подушку" осветленный раствор со скоростью 1,5-2,0 град/мин охлаждали при непрерывном перемешивании сначала до комнатной температуры, а затем со скоростью 2,5-3,0 град/мин до 10° и выдерживали при этой температуре в течение 6-8 ч. Отделенные от маточного раствора кристаллы на фильтре промывали одним объемом на объем кристаллов охлажденной до 10° обессоленной водой (табл. 3).

**Таблица 3. Выход глутаминовой кислоты при перекристаллизации в зависимости от содержания основного вещества в техническом продукте**

Содержание основного вещества в технической глутаминовой к-те, %	Концентрация глутаминовой к-ты в маточном р-ре, г/л	Выход кристаллов, %	Содержание ионов хлора в продукте, %
85,2	20,0-21,0	74,5	0,054
91,2	18,0-19,0	77,6	0,014
94,1	14,0-15,0	82,4	0,0045
97,4	11,0-12,0	84,3	не обнаружен

Как видно из табл. 3, при водной перекристаллизации выход глутаминовой кислоты в значительной степени зависит от чистоты исходных кристаллов и составляет от 74,5 до 84,3 %.

Высушивание полученных кристаллов осуществляли в вакуум-сушильном шкафу при температуре 55-60° и остаточном давлении 0,013-0,015 МПа в течение 8-10 ч.

Из очищенных кристаллов для получения моноглутамата натрия к сырым кристаллам глутаминовой кислоты добавляли воду, чтобы отношение веса воды к сухой глутаминовой кислоте было равно 2:1, и к полученной таким образом суспензии при непрерывном перемешивании по каплям добавляли 50%-ный раствор едкого натра до рН 7,0. Раствор по вышеуказанному режиму упаривали до содержания СВ=55-57 %. В упаренный раствор вносили затравки кристаллов моноглутамата натрия, затем охлаждали в течение 3 ч до 10° и оставляли при этой температуре на 8-10 ч. Выпавшие кристаллы от маточного раствора отделяли на центрифуге и подвергали вакуум-высушиванию по вышеуказанному режиму. Полученный препарат по чистоте соответствовал квалификации "х.ч."

Таким образом, представленные в работе данные способствовали разработке эффективной технологии выделения и очистки глутаминовой кислоты из КЖ и получению моноглутамата натрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Հարությունյան Ջ. Դ., Աղաջանյան Ա. Ե., Քոչարյան Շ. Ս. և ուրիշներ: ՀՀ արտոնագիր N 413, 1997:
2. Баран А.А., Тесленко А.Я. Флоккулянты в биотехнологии, 143, Изд. "Химия", Л., 1990.
3. Биотехнология. Принципы и применение. Под ред. И. Хиггенса. 470, Изд. "Мир", М. 1988.
4. Верникова Л.М., Жуковская С.А. Антибиотики, 7, 658, 1969.
5. Ельшин А.И., Греченко С.А., Путницев С.А., Зуев Б.Г., Курош В.В. Биотехнология, 5, 34, 1985.
6. Неклюдов А.Д., Котов В.Б., Гошев В.Е., Зубец А.М., Горбачева Н.А. Микробиологическая промышленность, 7, 33, 1972.
7. Успенская Ж.В., Кретович В.Л. Методики количественной бумажной хроматографии сахаров, органических кислот и аминокислот у растений, 43, Изд. АН СССР, М.-Л., 1962.
8. Saeky Masaru and Sakata Yosiky Ferm. And Ind., 10, 906, 1982.

Поступила 28.X.1997