

**ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ
АРМЕНИЯ**

Հայաստանի քիմիական հանդես 57, №4, 2004 Химический журнал Армении

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 547.784.2:66.081

**ВЫДЕЛЕНИЕ ГИДРОХЛОРИДА ГИСТИДИНА ИЗ ФЕРМЕНТАЦИОННОГО
РАСТВОРА**

А. Е. АГАДЖАНЫН, К. И. ЕГИЯН и А. С. САГИЯН

Научно-исследовательский институт “Биотехнология”, Ереван

Поступило 18 VIII 2003

Исследован процесс сорбции гистидина из фугата ферментационного раствора на сульфокатионите в NH_4^+ форме. Исходя из кривых распределения ионного состояния аминокислот определены оптимальные величины pH исходного и равновесного растворов, позволяющие отделять гистидин и лизин от сопутствующих нейтральных аминокислот и глутаминовой кислоты из нативного раствора сорбционным способом. На этой стадии одновременно раствор целевого продукта очищается также от основного количества окрашенных компонентов и неорганических солей. Изучен процесс разделения гистидина от лизина из аммиачного элюата на сульфокатионите в солевой форме и определены оптимальные параметры сорбционного процесса.

Описаны технологические стадии получения гидрохлорида гистидина из очищенного от лизина раствора. На основании полученных данных разработан эффективный способ выделения и очистки моногидрохлорида гистидина из ферментационного раствора.

Рис. 4, табл. 1, библиограф. ссылок 13

Гидрохлорид L-гистидина широко применяется в пищевой и химической промышленности, медицине, сельском хозяйстве и т.д. [1]. В промышленности гидрохлорид L-гистидина в основном получают микробиологическим способом [1]. Одной из ключевых стадий технологии получения индивидуальных аминокислот по вышеуказанному способу является предварительная очистка раствора аминокислот от неорганических солей и окрашенных компонентов методом сорбции на сульфокатионите. На этой стадии в значительной степени освобождаются от сопутствующих аминокислот и добиваются концентрирования раствора аминокислот.

При биосинтезе гистидина в ферментационных растворах наряду с целевой аминокислотой накапливаются также нейтральные и основные аминокислоты в суммарном количестве до 120% от количества гистидина [2]. В патентной литературе технологический путь осуществления биосинтеза описан подробно [3], однако о выделении и очистке гистидина из ферментационного раствора информация отсутствует [3-4]. В работе [5] изучена сорбция гистидина на сульфокатионите в H^+ и NH_4^+ формах при различных значениях величин pH ферментационного раствора с целью его очистки от нейтральных аминокислот. На основе данных изотермы сорбции авторы пришли к выводу, что в случае использования смолы в H^+ форме сорбцию гистидина необходимо проводить при pH раствора 5,5, а в случае NH_4^+ формы – при pH 3,5-4,0. В работе [6] из осветленного гидролизата белков сорбцию основных аминокислот на сульфокатионите в NH_4^+ форме проводят при pH исходного гидролизата, равном 4,5. Необходимо отметить, что авторы работ [5-6] допустили некоторые неточности. В частности, для проведения такого рода работ необходимо исходить не из данных изотермы сорбции [5], а из формы нахождения аминокислоты в процессе сорбции. Регулирующим критерием при сорбции, на наш взгляд, является не столько pH исходного раствора, сколько равновесного. Авторами не учтено, что изменение pH раствора происходит и в процессе сорбции на смоле и, вероятно, поэтому в наших опытах предложенные ими условия не обеспечили отделение гистидина от нейтральных аминокислот и лизина.

В данной работе приведены результаты исследования процесса отделения гистидина от сопутствующих нейтральных аминокислот, лизина и глутаминовой кислоты ионообменной сорбцией на сульфокатионите КУ-2-8 в NH_4^+ форме.

Экспериментальная часть

Сорбцию аминокислот из фугата ферментационного раствора проводили в динамических условиях на колонке с сечением 7 см² и высотой слоя катионита 40 см. Скорость подачи жидкости регулировали перистальтическим насосом "Masterflex" (США). Подготовку катионита и активированного угля к работе проводили стандартным методом [7]. Отделение биомассы и других взвесей от ферментационного раствора проводили на центрифуге марки "К-70Д" (Германия) с фактором разделения –1500. Время центрифугирования –20 мин. Содержание гистидина и сопутствующих аминокислот в растворе определяли на автоматическом анализаторе аминокислот "ААА-Т339" (Чехословакия), содержание сухих веществ (СВ) – на рефрактометре "RL-3" (Польша).

В работе использованы: NaOH, HCl, H₂SO₄, NaCl, водный аммиак чистоты "х.ч.", ионообменная смола КУ-2-8 и активированный уголь марки "ОУ-А" производства "Реахим" (СССР) [8]. Контрольные растворы аминокислот готовили из препаратов фирмы "Reanal" (Венгрия) квалификации "ч.д.а."

Содержание неорганических ионов в растворе определяли атомно-абсорбционным методом на приборе "ААS-1" (Германия), угол вращения – на спектрополяриметре "Polamat А" (Германия), цветность раствора гистидина – на фотоэлектроколориметре "КФК-2" (СССР)

при длине волны 400 нм. Приведенные в работе результаты усреднены по данным трех опытов.

Результаты и их обсуждение

Учитывая, что сорбция аминокислот на сульфокатионите в солевой форме в основном происходит по механизму ионного обмена [9], определяли ионную форму аминокислот в растворе при различных значениях pH раствора. Исходя из значений изоэлектрических точек гистидина ($pI=7,6$), нейтральных аминокислот ($pI=5,5-6,0$) и лизина ($pI=9,6$) расчетным путем [10-11] была построена диаграмма распределения различных ионных форм указанных аминокислот в растворе в зависимости от величины pH.

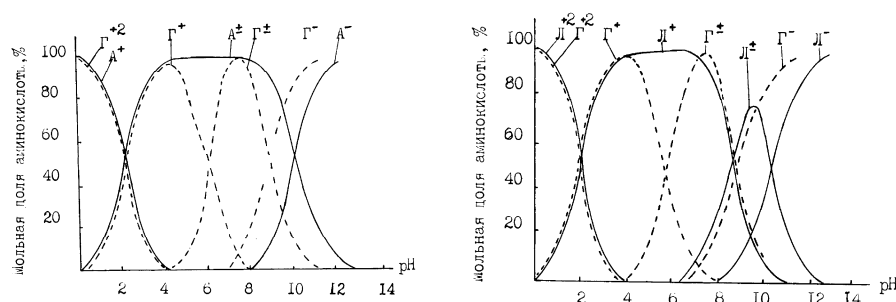


Рис. 1. Зависимость мольной доли различных ионных форм нейтральных аминокислот (А) и гистидина (Г) от значения pH раствора

Рис. 2. Зависимость мольной доли различных ионных форм гистидина (Г) и лизина (Л) от значения pH раствора

Как видно из приведенных на рис. 1 и 2 диаграмм, в диапазоне pH раствора от 3 до 5 гистидин и лизин в растворе находятся в основном в катионной форме, а нейтральные аминокислоты – в цвиттер-ионной. Следовательно, если величины pH равновесного раствора в процессе сорбции на сульфокатионите в NH_4^+ форме сохранить в указанном интервале, гистидин и лизин будут сорбироваться смолой, а нейтральные аминокислоты в основном будут удалены с выходящей из смолы жидкостью.

Правомерность вышеуказанного предположения проверяли в процессе сорбции с использованием фугата ферментационного раствора гистидина, полученного путем выращивания штамма-продуцента *Brevibacterium flavum* НИТИА-29 в питательной среде, содержащей источник углерода, азота, а также минеральные и органические добавки. Полученный ферментационный раствор имел следующий аминокислотный состав, г/л: гистидин – 7,7 ; лизин – 4,56; валин 1,45; глицин – 3,2; аланин – 0,48; глутаминовая кислота – 0,5. Солевой состав фугата – 0,41 г-экв/л.

После отделения биомассы и других взвесей от раствора методом центрифугирования фугат подкисляли серной кислотой до соответствующей величины pH и пропускали через колонку, заполненную сульфокатионитом КУ-2-8 в NH_4^+ форме. Через один объем смолы

было пропущено 3,0-3,2 объема фугата. После завершения подачи раствора смолу промывали обессоленной водой до СВ выходящей из смолы жидкости до нуля и рН 3,5-4,0. Далее сорбированные аминокислоты элюировали из колонки 4,0% раствором аммиака и определяли аминокислотный состав элюата. Результаты анализа приведены в таблице.

Таблица

Содержание аминокислот в элюате при различных значениях величины рН исходного фугата

N опыта	рН исходного фугата	Концентрация аминокислот в элюате, г/л*							
		гисти-дин	лизин	глицин	аланин	валин	изолей-цин	лейцин	глутами-Новая к-та
1	1,2	31,7	19,0	13,1	0,33	2,3	0,14	0,36	1,9
2	1,5	31,3	18,6	12,6	0,36	2,4	0,13	0,45	1,15
3	2,3	31,0	18,5	7,2	0,35	2,1	0,15	0,4	0,8
4	2,8	30,6	18,2	0,06	0,01	0,03	0,02	0,013	0,012
5	4,1	15,6	17,7	0,03	0,02	0,015	0,01	0,02	0,01

* Объем элюата во всех опытах составлял 1050 мл.

Изменения величины рН выходящей из смолы жидкости (в фракциях) при различных значениях рН исходного фугата приведены на рис. 3.

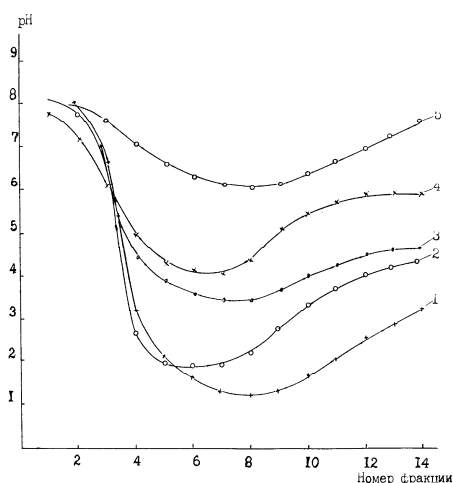


Рис. 3. Зависимость значения pH выходящей из смолы жидкости от значения pH исходного фугата. 1 - pH 1,2; 2 - pH 1,5; 3 - pH 2,3; 4 - pH 2,8; 5 - pH 4,1.

Как видно из рис. 3 и данных таблицы, для разделения гистидина от нейтральных и кислых аминокислот оптимальным является рН исходного фугата 2,8, что отличается от литературных данных [5-6]. При этом рН равновесного раствора (рис.3) в основном находится в интервале от 4,5 до 6. Из таблицы следует, что на стадии сорбции удастся отделить от гистидина и лизина до 95% сопутствующих нейтральных и кислых аминокислот.

В процессе сорбции удается одновременно отделить гистидин от основного количества неорганических солей и окрашенных компонентов. Количество неорганических солей в полученном аммиачном элюате, по сравнению с его исходным количеством, уменьшается в 10-11 раз, а окрашенных компонентов – в 3,5-4,0 раза.

При значениях pH исходного фугата 1,2; 1,5 и 2,3 на смоле КУ-2-8 в NH_4^+ форме одновременно сорбируются как гистидин, так и нейтральные аминокислоты (табл., оп. 1-3). В случае pH фугата 4,1 (оп. 5) во время сорбции наряду с "проскоком" нейтральных аминокислот происходит "проскок" гистидина (до 50% от исходного количества).

Исследование показало, что если вакуум-упариванием до значения СВ раствора 48-50% и изотермической кристаллизацией гистидин полностью очищается от остаточных нейтральных аминокислот и глутаминовой кислоты, то водной или водно-спиртовой перекристаллизацией его не удастся отделить от лизина.

Из литературы известно, что очистку раствора гистидина от основных аминокислот осуществляют сорбцией на карбоксильном катионите КБ-4П-2 [6]. Проведенные опыты позволили предположить, что при использовании катионита КБ-4П-2 в солевой форме в результате гидролиза функциональных групп смолы происходит изменение величины pH равновесного раствора, вследствие чего процесс разделения гистидина от лизина из аммиачного элюата протекает не полностью [12]. В случае применения катионита в H^+ -форме при величине pH исходного аммиачного элюата 7,6 показатели разделения гистидина от лизина ухудшаются, что, по-видимому, обусловлено уменьшением степени ионизации ионогенной группы смолы КБ-4П-2 [13]. Поэтому для отделения гистидина от лизина из аммиачного элюата применяли сорбционный способ на сульфокатионите КУ-2-8 в NH_4^+ форме. Поскольку величина изоэлектрической точки лизина значительно отличается от изоэлектрической точки гистидина, при определенных значениях pH, как видно из рис. 2, лизин в растворе будет находиться в катионной форме, а гистидин – в цвиттер-ионной. Учитывая сказанное, величину pH упаренного (до СВ-10,5%) элюата гистидина доводили соляной кислотой до 7,5-7,7 и раствор пропускали через колонку, заполненную смолой КУ-2-8. В указанных условиях лизин сорбировался смолой, а гистидин оказывался в выходящей из смолы жидкости.

Изменения величин СВ и pH в выходящей из смолы жидкости в процессе сорбции приведены на рис.4.

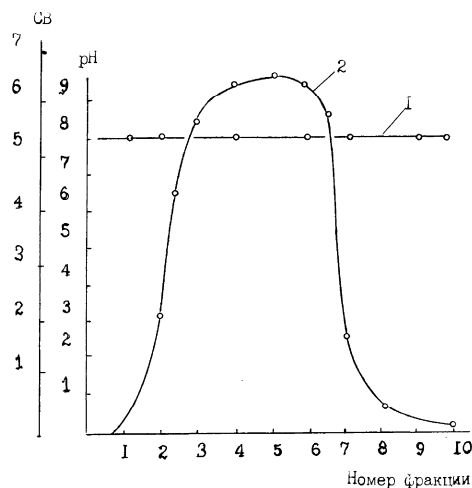


Рис. 4. Изменения значения pH (1) и СВ (2) в выходящей из смолы жидкости в процессе разделения гистидина от лизина.

Как видно из рис. 4, при сорбции практически не происходит изменения величины pH выходящей из колонки жидкости, что указывает на постоянство ионной формы (лизин-катионная и гистидин-цвиттер-ионная) аминокислот в процессе сорбции. Основное количество гистидина обнаруживается в 5 фракциях, что составляет 1,8 объема раствора от одного объема смолы. Емкость смолы по лизину составляла 64,3 мг/мл. Собранные фракции раствора гистидина объединяли, а смолу после водной промывки подвергали аммиачному элюированию. Содержание лизина и гистидина в элюате составляло 45,2 и 0,3 г/л, соответственно.

Из собранного раствора гистидина после подтитровки, обесцвечивания, ультрафильтрации, вакуум-упаривания, кристаллизации, перекристаллизации и сушки получали чистые кристаллы гидрохлорида гистидина гидрата. Содержание моногидрохлорида гистидина моногидрата в полученном продукте -99,5%; $[\alpha]^{25}_D = +9,8$ (C=11; 6N HCl). Выход гидрохлорида гистидина моногидрата составляет 65% от его начального количества в исходном фугате.

Таким образом, разработан эффективный способ выделения и очистки гидрохлорида гистидина моногидрата из многокомпонентного ферментационного раствора с низким содержанием в нем целевого продукта.

Авторы выражают благодарность Р.А. Брутяну за участие в обсуждении результатов работы.

ՖԵՐՄԵՆՏԱՑԻՈՆ ՀԵՂՈՒԿԻՑ ՀԻՍԹԻԴԻՆԻ ՄՈՆՈՀԻԴՐՈՔԼՈՐԻԴԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ ԵՎ ՄԱՔՐՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍԸ

Ա. Ե. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Կ. Ի. ԵՂՅԱՆ և Ա. Ս. ՄԱՂՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է ֆերմենտացիոն հեղուկի ֆուգատից NH_4^+ -ձևի սուլֆոկատիոնիտով հիսթիդինի սորբցիայի պրոցեսը: Ելնելով լուծույթի pH-ից կախված ամինաթթուների իոնային վիճակի կորերի բաշխումից որոշվել է ելային և հավասարակշռային լուծույթների այն օպտիմալ pH-ի արժեքը, որի դեպքում սորբցիոն եղանակով նատիվ լուծույթից հիսթիդինը և լիզինը հնարավոր է բաժանել ուղեկցող չեզոք և թթու ամինաթթուներից: Այդ պրոցեսում հիմնային ամինաթթուները մաքրվում են նաև ֆերմենտացիոն հեղուկում պարունակվող գունավոր բաղադրամասերի և անօրգանական աղերի հիմնական քանակից: Ուսումնասիրվել է ամոնյակային էյուատից աղային ձևի սուլֆոկատիոնիտով հիսթիդինից լիզինի բաժանման պրոցեսը և որոշվել սորբցիոն պրոցեսի օպտիմալ պարամետրերը: Նկարագրված են լիզինից մաքրված ամիակային էյուատից հիսթիդինի հիդրոքլորիդի մաքուր բյուրեղների ստացման տեխնոլոգիական էտապները: Ստացված տվյալների հիման վրա մշակվել է ֆերմենտացիոն հեղուկից հիսթիդինի մոնոհիդրոքլորիդի անջատման և մաքրման արդյունավետ եղանակ:

**ISOLATION OF HISTIDINE HYDROCHLORIDE FROM
FERMENTATION BROTH**

A. E. AGHAJANYAN, K. I. EGIAN and A. S. SAGHIYAN

The process of histidine sorption from the fermentation broth – fugate on sulfocationite resin KU-2-8 in its NH_4^+ form has been investigated. The optimum pH value range of both initial and equilibrium solutions have been determined those allow to separate histidine and lysin from the accompaning neutral and glutamic acid by the sorption method. The most of inorganic salts and colour components are removea from the solution of the final product at the histidine purification stage. The optimum parameters of the separation of histidine from lysine in ammonium-eluate on sulfocationite have been determinated. The thechnological steps of the histidine hydrochloride producing from the lysine solution have been described. An effective method of isolation and purification of histidine monohydrochloride from the fermentation broth have been elaborated.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Садовникова М.С., Беликов В.М. // Успехи химии, 1978, т. 47, №2, с. 357.
- [2] Арутюнян Дж.Г., Мурадян А.К., Карабеков Б.П. А.с. СССР №4726389, 1990 (ДСП).
- [3] Sano, Kouposuke, Tsuchida, Takayasu. US Patent №4388405, 1983 (ДСП).
- [4] Kotani, Yukinobu, Kina, US Patent №4725541, 1988 (ДСП).
- [5] Позднякова Т.М., Шолин А.Ф., Новикова В.Л. Тезисы докладов IV Всесоюзной конференции "Аминокислоты для сельского хозяйства, пищевой промышленности, медицины и научных исследований", Ереван, 1988, с. 124.
- [6] Давыдова О.Е., Павленко Н.И. Материалы конференции "Микробиологический и ферментативный синтез аминокислот", Пушкино, 1980, с. 55.
- [7] Волжинский А.И., Константинов В.А. Регенерация ионитов. Л., Химия, 1990, с. 238
- [8] Лурье А.А. Хроматографические материалы (справочник). М., Химия, 1978, с. 437
- [9] Савицкая Е.М., Яхонтова Л.Ф., Ныс П.С. Ионный обмен / Под ред. М.М. Сенявина, М., Наука, 1981, с. 229.
- [10] Либинсон Г.С. Сорбция органических соединений ионитами. М., Наука, 1979, с. 125
- [11] Сокол Е.Г., Куваева З.И., Солдатов В.С. // ЖФХ, 2000, т. 74, №8, с. 1474.
- [12] Шатаева Л.К., Кузнецова Н.Н., Елькин Г.Э. Карбоксильные катиониты в биологии. Л., Наука, 1979, с. 285.
- [13] Капуцкий Ф.Н., Юрштович Т.Л., Старобинец Г.Л., Бычковский П.Н., Борщевская Т.И. // ЖФХ, 2000, т. 74, №2, с. 277.