



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008134584/10, 27.08.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.08.2008

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.08.2008

(43) Дата публикации заявки: 10.03.2010 Бюл. № 7

(45) Опубликовано: 20.06.2013 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SU 1578196 A1, 15.07.1990. SU 1740419 A1, 15.06.1992. SU 698980 A1, 25.11.1979. CZ 9202341 A3, 17.02.1993. EP 0337440 A2, 18.10.1989.

Адрес для переписки:

121108, Москва, ул. Олеко Дундича, 45,
корп.2, кв.53, Э.М. Тер-Саркисяну

(72) Автор(ы):

**Тер-Саркисян Эрик Мушекович (RU),
Кисиль Наталия Николаевна (RU),
Тер-Саркисян Вадим Эрикович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

Тер-Саркисян Эрик Мушекович (RU)

(54) СПОСОБ ИОНООБМЕННОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИЗИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Предложен способ ионообменного выделения лизина из культуральной жидкости. Отделяют биомассу путем микрофльтрации. Осветляют нативный раствор. Осветленный раствор обессоливают, пропуская через ионообменную систему из 10 одинаковых колонн с соотношением высоты к диаметру 0,8, соединенных в последовательности: анионит в ОН-форме - катионит в Н⁺-форме, со скоростью 2-2,5 объема раствора на объем

системы. Обессоленный раствор пропускают через колонну с анионитом в ОН-форме. Образующийся раствор лизина-основания пропускают через колонну с катионитом. Осуществляют элюцию лизина с катионита 3-5н, предпочтительнее 4н, раствором щелочи. В полученный концентрированный элюат лизина барботируют газообразный хлористый водород, вызывая одновременно нейтрализацию и кристаллизацию лизина. Способ позволяет обойтись в технологическом процессе без операций выпарки, что приводит к экономии энергосатрат. 1 з.п. ф-лы, 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12P 13/08 (2006.01)
C07C 227/40 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2008134584/10, 27.08.2008**

(24) Effective date for property rights:
27.08.2008

Priority:

(22) Date of filing: **27.08.2008**

(43) Application published: **10.03.2010 Bull. 7**

(45) Date of publication: **20.06.2013 Bull. 17**

Mail address:

**121108, Moskva, ul. Oleko Dundicha, 45, korp.2,
kv.53, Eh.M. Ter-Sarkisjanu**

(72) Inventor(s):

**Ter-Sarkisjan Ehrik Mushekovich (RU),
Kisil' Natalija Nikolaevna (RU),
Ter-Sarkisjan Vadim Ehrikovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

Ter-Sarkisjan Ehrik Mushekovich (RU)

(54) METHOD OF ION-EXCHANGE ISOLATION OF LYSINE

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: biomass is isolated by microfiltration. The native solution is clarified. The clarified solution is desalted by passing through the ion-exchange system of 10 identical columns with a height to diameter ratio of 0.8, which are connected in the sequence: anion exchanger in OH-form - cation exchanger in H⁺-form, at a rate of 2-2.5 of solution volume per volume of the system. The desalted solution is passed through the column with

the anion exchanger in OH-form. The resulting solution of lysine-base is passed through the column with the cation exchanger. Elution of lysine with cation exchanger 3-5N is carried out, preferably 4N, with alkali liquor. The gaseous hydrogen chloride is bubbled to the resulting concentrated lysine eluate, causing simultaneously neutralisation and crystallisation of lysine.

EFFECT: method enables to eliminate the need of evaporation in the technological, which results in power consumption economy.

2 cl, 1 ex

Изобретение относится к области микробиологической промышленности и касается производства кристаллического λ -лизина. Лизин используется в качестве кормовой добавки для улучшения усвояемости зерновых белков, в которых не хватает 30-35% лизина для полноценного белкового синтеза в организме птицы и свиней. В настоящее время в мире производится более 900 тыс.т кристаллического лизина для кормовых целей и 15 тыс.т высокоочищенного лизина для пищевых и медицинских целей.

Впервые кристаллический лизин стали производить в 60-х годах прошлого века японские фирмы Аджиномото Ко и Киова Хакко. Технология включала ферментативный биосинтез лизина сепарирование биомассы, подкисление нативного раствора серной кислотой, сорбцию лизина в виде двухзарядного иона на неподвижном слое сульфостирольного катионита элюцию лизина аммиаком, удаление избыточного аммиака путем вакуум-выпарки, подкисления лизина концентрированной HCl, кристаллизацию лизина, центрифугирование и сушку.

Основным недостатком этого способа было использование больших количеств катионита, воды и теплоэнергии при выпарке элюата. Эти недостатки устранены в способе выделения лизина, предложенной бельгийской инжиниринговой компанией Chemviron Carbon (www.chemvironcarbon.com). Данный способ внедрен на заводах основных производителей лизина Аджиномото Ко, Киова Хакко (Япония), ADM (США) и C J (Южная Корея). Способ предусматривает непрерывно работающую ионообменную систему (ISEP) из 30-ти ионообменных колонн, соединенных последовательно в виде замкнутого круга, в которой культуральная жидкость, вода и элюент движутся навстречу движущемуся иониту.

Ионообменные колонны механическим способом перемещаются по часовой стрелке по кругу в виде карусели и тем самым попадают под подачу и сток обрабатываемых жидкостей.

В установке ионообмена имеются 4 зоны воздействия:

- зона промывки;
- зона адсорбции;
- зона споласкивания;
- зона элюирования продукта.

Все остальные стадии производственного процесса: отделение биомассы, подкисление нативного раствора перед сорбцией, аммиачная элюция - осветление элюата, вакуум-выпарка элюата, кристаллизация лизина, центрифугирование кристаллов и сушка не отличаются от ранее используемого способа.

Несмотря на то, что система ISEP сокращает количество катионита в 17 раз по сравнению с неподвижным слоем смолы. У данного метода есть недостатки. Прежде всего, это отсутствие избирательности обмена и хроматографии веществ, благодаря чему лизин, катионы и пигменты идут одним фронтом, и весь пигмент попадает в элюат. Для удаления пигмента используют большое количество активированного угля. Но даже при этом раствор лизина упаривают только до концентрации 50%.

В этом случае можно получить более крупные кристаллы, чем при концентрации лизина 65%, даже в сильно окрашенном растворе, однако кристаллизуется только половина лизина, а лизин, остающийся в маточнике, возвращается в технологический процесс. Таким образом, компактная ионообменная установка не делает лизин чище и дешевле.

Другая технологическая концепция отражена в авторских свидетельствах СССР №677501, №1112779 и Патента РФ №1578196. Она состоит в том, что подкисленный

до pH 1,5 нативный раствор, содержащий лизин L^{2+} , пропускают через колонны с катеонитом в Na^+ - форме, с половины колонн лизин элюируют щелочью и элюат пропускают через вторую половину колонн. При этом количество лизина на колоннах

удваивается по уравнению $L^{2+} + L^{\pm} = 2L^+$

- L^{2+} - сорб.

- L^{\pm} - эл.

- $2L^+$ - сорб.

В этом процессе пигментные вещества проходят вместе со стоками и не сорбируются на смоле.

Отличие щелочной элюции от аммиачной состоит в том, что щелочь элюирует лизин эквивалентно и элюат лизина имеет pH, соответствующий изоэлектрической точке лизина, т.е. 9,7. При этом значении pH, которое не меняется в течение всего процесса элюции, пигмент не десорбируется и элюат остается чистым.

Для десорбции лизина аммиаком необходим значительный избыток элюента, pH элюата достигает 12-12,5 и вместе с лизином десорбируется пигмент. Процесс перезарядки лизина на колонне позволяет получить вдвое более концентрированный элюат лизина, а следовательно, сократить количество выпариваемой воды. В предлагаемом изобретении используется щелочная элюция и неподвижный слой катионита, поэтому наиболее близким прототипом является способ, описанный в Патенте РФ №1578196. Способ включает следующие операции. Культуральную жидкость по окончании ферментации фильтруют на установке микрофльтрации на керамических мембранах с размером пор 100 кДа. Фильтрат подкисляют до pH 1,5 азотной кислотой и пропускают через шесть колонн с катионитом $Ku-2 \times 8$ в H^+ -форме до их полного насыщения. Через три колонны пропускают раствор щелочи, дозированной так, что ее количество в г-экв. соответствует 95% обменной емкости смолы в колонне. Элюат с каждой колонны с pH 10,2 пропускают через насыщенную лизином колонну. В этом процессе перезарядки лизина на смоле pH фильтрата с колонн находится на уровне 5-7. Лизин в фильтрате отсутствует. Колонны с лизином элюируют раствором щелочи, количество которой в г-экв. составляет 105% от обменной емкости смолы в колонне. Элюат с трех колонн объединяют и под вакуумом отпаривают некоторое количество аммиака, сорбированного на смоле вместе с лизином. Затем лизин нейтрализуют концентрированной HCl, осветляют на микропористом иносорбенте ИА-4, доупаривают раствор лизина до концентрации 65%, кристаллизуют при температуре 15-18°C, центрифугируют на фильтрующей центрифуге при 5000 об/мин и сушат на сушилке во взвешенном слое. Маточник от кристаллизации возвращают в процесс на стадии осветления. Концентрат биомассы высушивают на распылительной сушилке. Конечный продукт представляет собой белый порошок с содержанием лизина монохлоргидрата 98,5-98,7%. Продукт можно использовать в пищевых условиях в качестве добавок в хлеб, макаронные изделия и другие продукты. Выход продукта - 85-88%.

Недостатком этого способа является большое количество катеонита, необходимость упаривания большого количества воды и многостадийность. Целью настоящего изобретения является усовершенствование ионообменной технологии и устранение этих недостатков. Это достигается тем, что после микрофльтрации культуральной жидкости фильтрат обессоливают с помощью специальной ионообменной колонны, состоящей из десяти слоев ионита, которые могут вращаться относительно друг друга. В одном положении слой катеонита чередуется со слоем

анионита. Пропуская раствор со скоростью 2 объема на общий объем колонны, из раствора лизина удаляют все неорганические соли. При регенерации слои катеонита и анионита, заключенные в цилиндрические емкости, вращаются относительно друг друга на 90°С и переходят в другое положение. При этом слой катеонита оказывается под слоем катеонита, а слой анионита под слоем анионита, т.е. практически образуются две колонны. Слои катионита регенерируют 2н HNO₃, а слои анионита - раствором щелочи. После промывки водой слои снова перемещают в исходное состояние.

Обессоленный раствор пропускают через колонну с осветляющей смолой ИА-4 в Cl⁻-форме. Осветленный раствор пропускают через колонну с анионом ЭДЕ - 10п, на которой сорбируется анион, связанный с лизином (HSO₄⁻ или Cl⁻). Таким образом получают цвиттер-ион лизина Л±. Пропуская обесцвеченный раствор цвиттер-иона через колонну с катионом Ку-2×8 в H⁺-форме, смолу полностью переводят в лизиновую форму. По сравнению с сорбцией цвиттер-иона лизина, идущей по уравнению: Л±+H⁺R→ЛH⁺R, сорбция на катионите двухзарядного лизина из подкисленного нативного раствора требует в 2,7 раза больше смолы. Другое преимущество данного способа состоит в том, что пропуская через колонну, насыщенную лизином, 4н раствор щелочи, подогретый до 50°С, получают элюат лизина с концентрацией до 70% лизина основания. Кристаллизацию осуществляют, подавая в раствор газообразный HCl или концентрированный раствор HCl. После центрифугирования и сушки кристаллов получают белый негигроскопический порошок с содержанием основного вещества более 98,5%.

Примеры осуществления изобретения

Пример 1

400 л культуральной жидкости с концентрацией лизина 100 г/л и биомассы 45 г/л, полученной путем биосинтеза культуры *Brevibacterium* на среде, содержащей глюкозный сироп, сернокислый аммоний, калий гидрофосфат, витамины и микроэлементы, подвергают микрофльтрации на установке с полимерной мембраной с порами 100 кДа. Концентрат биомассы разбавляют водой (100 л) и продолжают микрофльтрацию до концентрации биомассы 25%. Получают 80 л концентрата, содержащего 18 кг сухой биомассы и 2 кг лизина. Концентрат высушивают на распылительной сушилке производительностью 10 л/час по испаренной влаге. Получают 20 кг протеина, содержащего 10% лизина. Продукт представляет собой полноценную кормовую белковую добавку. 420 л пермеата пропускают через обессоливающую ионообменную систему, состоящую из десяти двухлитровых колонн диаметром 15 см, высотой 12 см, загруженных анионом ЭДЕ - 10п в H⁻-форме и катионом Ку-2×20 в H⁺-форме. Колонны соединены последовательно: Анионит-Катионит. Скорость раствора составляет 2-2,5 объемов на объем системы, т.е. 40-45 л/час. Раствор вытесняют с колонн водой с той же скоростью. Получают 440 л раствора с pH 6,8 светло-коричневого цвета, не содержащего неорганических солей. Обессоленный раствор пропускают через колонну, загруженную 50 л осветляющей микропористой смолы ИА-4, со скоростью 40 л/час. Раствор вытесняют с колонны водой с той же скоростью. Сульфат лизина превращают в цвиттер-ион, пропуская раствор лизина через колонну со смолой ЭДЕ - 10п в H⁻-форме диаметром 25 см, высотой 200 см и объемом 100 л. Скорость раствора в колонне составляет 75 л/час. Раствор вытесняют с колонны водой с той же скоростью. Получают 530 л бесцветного прозрачного раствора с pH 9,8. Сорбция цвиттер-иона лизина на катионите Ку-2×8 в

H⁺-форме происходит по механизму хемосорбции и идет с выделением энергии.

Благодаря этому лизин заполняет все обменные места на смоле, т.е. емкость смолы по лизину фактически равна теоретической, 5,1 мг-экв/г. Лизин элюируют с катеонита с помощью 4н раствора NaOH, подогретого до 50°C. Скорость элюента составляет 30 л/час. В процессе элюции раствор подают сверху, чтобы не размывать фронт элюции. Снизу колонны выходит вязкий светло-желтый раствор лизина основания. Всего после вытеснения щелочи с колонны деионизованной водой собирают 55 л элюата.

Газообразный хлористый водород получают в стеклянном реакторе объемом 100 л, постепенно приливая в 30 л концентрированной HCl концентрированную H₂SO₄.

Кристаллизацию лизина осуществляют в стеклянном реакторе объемом 100 л.

Аппарат снабжен барбатером, соединенным полиэтиленовым шлангом с источником хлористого водорода. При барботаже HCl при перемешивании начинается

кристаллизация лизинмоноклоргидрата. Суспензия белых кристаллов становится вязкой, а pH смеси достигает 5,2. Концентрация лизина в суспензии составляет 64%.

Суспензию центрифугируют на капроновой ткани при 5000 об/мин. 41,7 кг сырых кристаллов лизина с влажностью 18% сушат на сушилке во взвешенном слое при температуре входящего воздуха 110°C. 16 л маточника, содержащего 7 кг лизина, возвращают в процесс на стадии пропускания раствора через анионит. Выход сухих кристаллов лизинамоноклоргидрата составляет 34,2 кг, или 86%. Качество порошка полностью соответствует сертификату на пищевой лизин.

Преимущество данного процесса перед действующими производствами состоит в том, что в нем используется мало воды и отсутствуют процессы выпарки, которые требуют больших энергетических затрат.

Формула изобретения

1. Способ ионообменного выделения лизина из культуральной жидкости,

включающий отделение биомассы путем микрофльтрации, осветление нативного раствора, сорбцию лизина на сульфополистирольном катионите, элюцию лизина раствором щелочи, кристаллизацию лизина, центрифугирование кристаллов и сушку, отличающийся тем, что перед сорбцией на катионите раствор обессоливают,

пропуская через ионообменную систему из 10 одинаковых колонн с отношением высоты к диаметру 0,8, соединенных в последовательности: анионит в OH⁻-форме - катионит в H⁺-форме, со скоростью 2-2,5 объема раствора на объем системы;

обессоленный раствор пропускают через колонну с анионитом в OH⁻-форме, образующийся раствор лизина-основания пропускают через колонну с катионитом и в концентрированный элюат лизина барботируют газообразный хлористый водород, вызывая одновременно нейтрализацию и кристаллизацию лизина.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что для элюции лизина с катионита используют 3-5н, предпочтительнее 4н, раствор щелочи.