

УДК 543.54:547.973.633.88

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В ТЕСТИРОВАНИИ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ЛИЗИНА¹

Н.Г. Габрук
И.И. Олейникова
А.В. Метелев

Белгородский государственный
национальный
исследовательский
университет

Россия, 308015, Белгород,
ул. Победы, 85

E-mail: Gabruk@bsu.edu.ru;
Oleynikova@bsu.edu.ru

Проведено хроматографическое определение лизина в культуральной жидкости после ферментации *Corynebacterium glutamicum*. Установлено, что ВЭЖХ является надежным методом в тестировании культуральной жидкости микробиологического синтеза лизина. Оптимизированы условия хроматографирования и получены сходимые результаты по определению чистоты стандартного образца лизина. Для проведения хроматографического анализа отработана пробоподготовка культуральной жидкости и установлена кратность разбавления исходного образца. Методом обращено-фазовой (ОФ) ВЭЖХ определены оптимальные условия проведения хроматографического анализа разбавленной биомассы и содержание лизина в культуральной жидкости.

Ключевые слова: лизин, культуральная жидкость, ОФ ВЭЖХ, условия хроматографирования.

Введение

Культуральные среды микробиологического производства лизина представляют из себя смесь питательных и ростовых веществ, продуктов биосинтеза, продуктов распада и низкомолекулярных примесей [1]. Они могут содержать, помимо лизина, в своём составе другие аминокислоты, а также минеральные примеси такие как азот, фосфор, калий [2].

Задачей исследования было установить возможность тестирования культуральной жидкости методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ).

Экспериментальная часть

Объектом исследования выбрана культуральная жидкость микробиологического синтеза лизина после ферментации *Corynebacterium glutamicum*. Для тестирования использовали ГСО аминокислот фирмы Agilent. Пересчет проводили на L-лизин моногидрохлорид кристаллический – α, ϵ -диаминокапроновую кислоту, оптически активную левовращающую форму.

Лизин как аминокислота с заряженной боковой цепью высокополярна, что затрудняет ее выделение из смеси других аминокислот. Вторая проблема в определении содержания лизина связана с низким коэффициентом экстинкции карбоксильных групп в ультрафиолетовой области спектра [3]. В связи с этим, была проведена предколониальная модификация лизина, позволяющая получить производное с более высоким коэффициентом поглощения [4].

Хроматографическое определение лизина проводили на приборе Agilent 1100 Series HPLC. Методика фирмы Agilent "Sensitive and Reliable Amino Acid Analysis in Protein Hydrolysates using the Agilent 1100 Series HPLC" была адаптирована ввиду отсутствия и труднодоступности ключевых компонентов подвижной фазы: метанола и тетрагидрофурана.

¹ Работа выполнена в рамках Субподрядного договора № 80/10 (от 27 августа 2010 г), по договору № 13.Г.25.31.0069 от 22.10.10. «Разработка промышленной технологии крупнотоннажного производства лизина и побочных продуктов на основе глубокой переработки зерна и кадровое обеспечение производства».



Замену растворителям подбирали, основываясь на теории групп селективности органических растворителей и треугольника Снайдера. Исходя из этих соображений, метанол был заменен на схожий по свойствам изопропанол, а тетрагидрофуран на N,N – диметилацетамид.

Порядок получения производных аминокислот по реакции с ортофталевым альдегидом и 9-флуоренилметилхлороформатом остался неизменным.

Условия хроматографирования: подвижная фаза – ацетат натрия, диметилацетамид (фаза А), ацетат натрия, ацетонитрил, изопропанол (фаза Б), колонка Hypersil ODS 5 мкм * 20см, УФ-детектор.

Предварительно были сняты хроматограммы стандартных смесей аминокислот различной концентрации. Установлено, что оптимальная концентрация аминокислот равна 1 nmol/μl, хроматограмма которой приведена на рисунке 1. Время удерживания лизина составляет 12 мин.

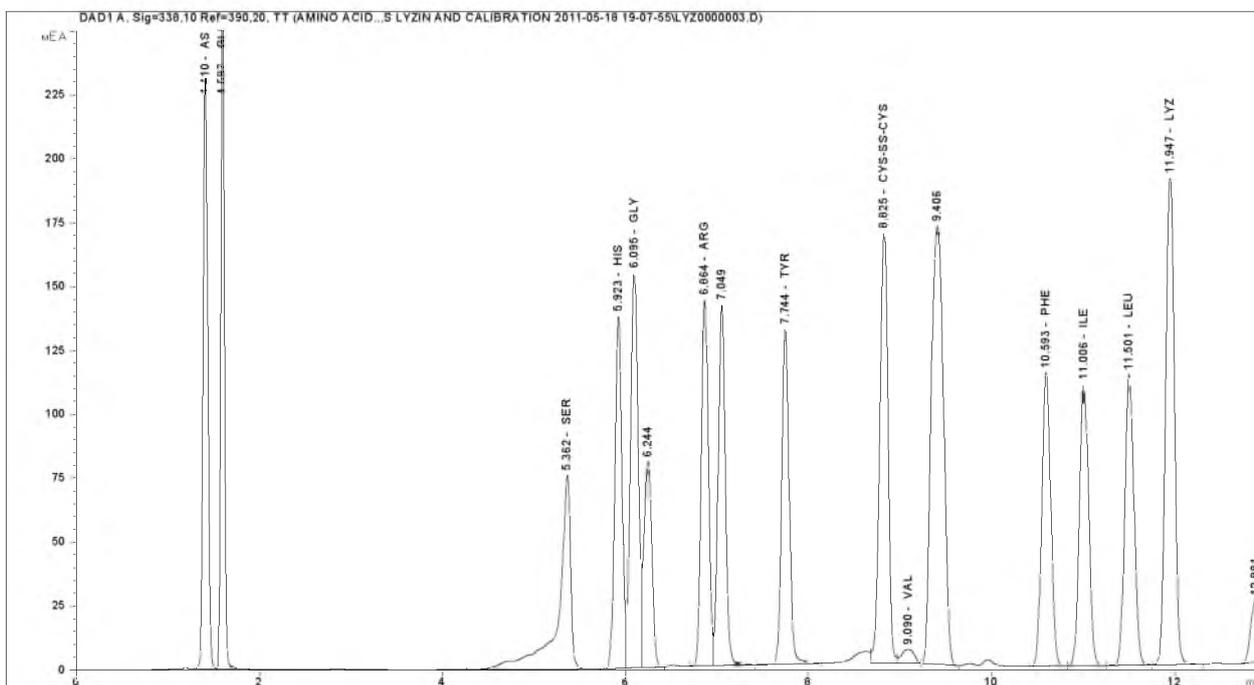


Рис. 1. Хроматограмма стандартной смеси аминокислот с концентрацией 1 nmol/μl

Для определения чистоты кристаллического лизина хлорида проведено хроматографирование раствора $c=1$ nmol/μl и построен градуировочный график (рис. 2). Время удерживания лизина хлорида аналогично и составляет 12 мин.

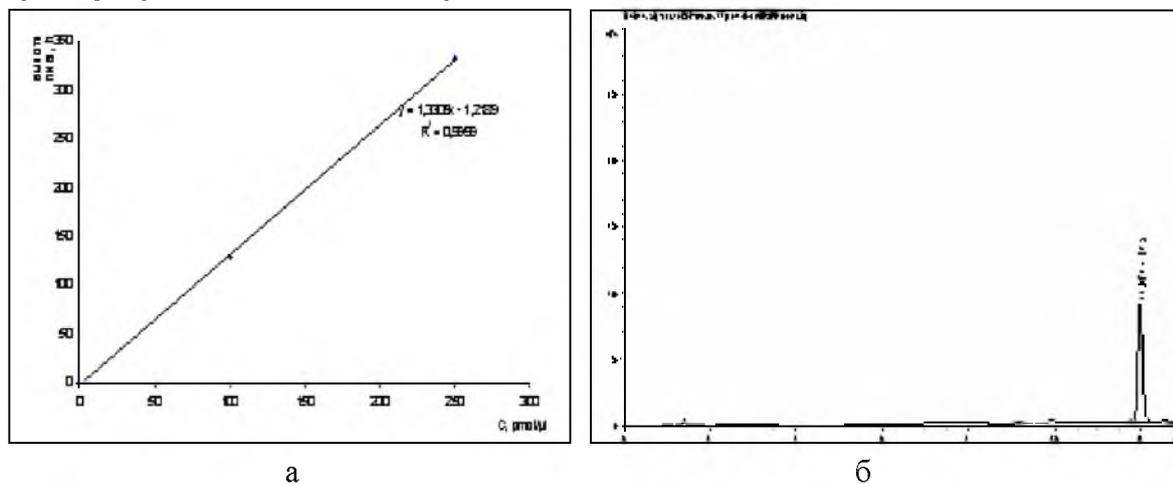


Рис. 2. Градуировочный график (а) и хроматограмма раствора лизина хлорида (б)

Для установления кратности разбавления исходного образца культуральной жидкости готовили растворы в соотношении 1:50, 1:500, 1:1000, 1:3000. Степень разбавления контролировали методом спектрофотометрии на спектрофотометре Specord 210 PLUS в кварцевых кюветках $l=1$ см в диапазоне 190-400 нм. На основании спектров и теоретического расчета концентрации лизина пробу разбавляли в 2500 раз.

Концентрацию лизина в культуральной жидкости определяли по адаптированной методике с предварительной дериватизацией ортофталевым альдегидом и 9-флуоренилметилхлороформатом. Перед отбором пробу гомогенизировали. Отбирали 5-10 см³ суспензии, помещали в центрифужную пробирку и центрифугировали в течение 15 минут при 6000 тыс. оборотах. Надосадочную жидкость сливали и фильтровали через мембранный фильтр Владипор с диаметром пор 45 мкм. В результате пробоподготовки получали прозрачную жидкость (рис.3).

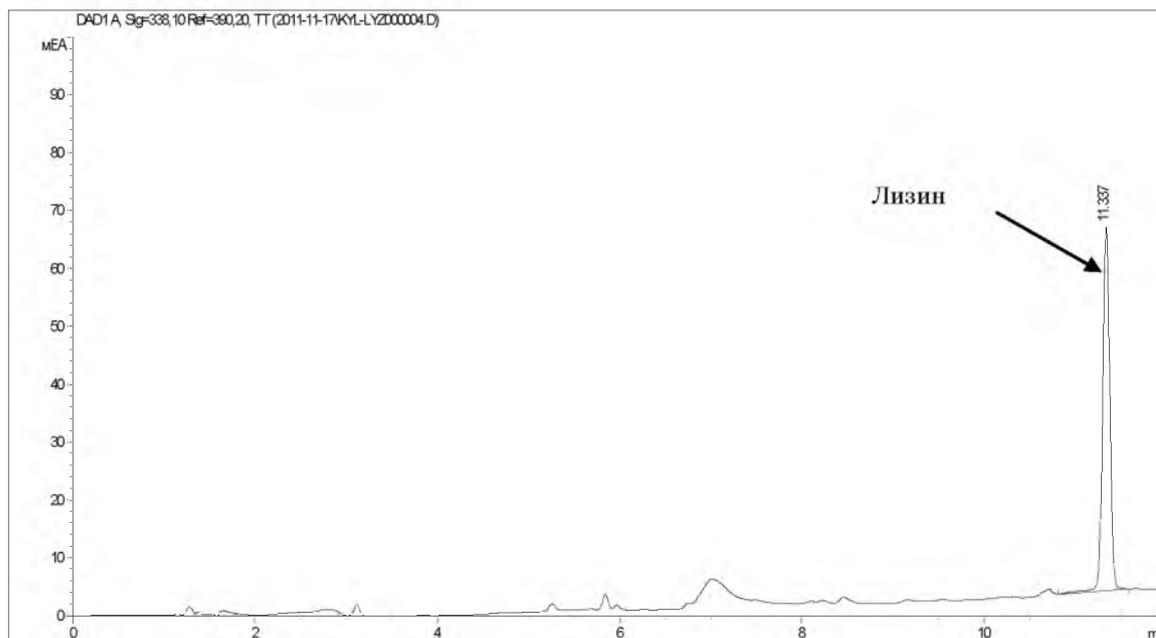


Рис. 3. Хроматограмма культуральной жидкости после ферментации *Corynebacterium glutamicum*

Время выхода лизина хорошо коррелирует со временем стандартной смеси аминокислот, что подтверждает наличие лизина в культуральной жидкости, а также других аминокислот в следовых количествах (менее 0.01 mmol/l).

По данным хроматограмм стандартов аминокислот 250 и 1000 pmol/μl была построена градуировочная зависимость в координатах «концентрация лизина» - «высота пика». Концентрация лизина, рассчитанная по градуировочной зависимости с учетом разбавления, составила 94.74 г/дм³, в пересчете на лизина хлорид концентрация составила 118.35 г/дм³.

Заключение

Установлено, что метод ОФ ВЭЖХ может быть использован в тестировании культуральной жидкости микробиологического синтеза лизина. Оптимизированы условия хроматографирования и получены сходимые результаты по определению чистоты стандартного образца лизина. Отработана пробоподготовка культуральной жидкости для проведения хроматографического анализа и установлена кратность разбавления исходного образца. Степень разбавления контролировали методом спектрофотометрии.

Список литературы

1. Аузан, С.И. Биохимические изменения состава кормового концентрата лизина в зависимости от условий культивирования *Brevibacterium* штамм: автореф. канд. дисс. – Рига, 1970. – С 3.

2. Бобрешова О.В. Разработка малоотходных мембранно-сорбционных технологий очистки и концентрирования L-аминокислот для пищевой промышленности и медицины: Отчет НИР НТП Министерства образования РФ (203.05.001). – Воронеж: ВГУ, 2002. – 104 с.

3. ВЭЖХ в биохимии / Бауэр Г., Энгельгард Х., Хеншен А., и др. Под ред. А. Хеншен и др. – М.: Мир, 1988. – 688 с.

4. Гуляк Е.В. Достижения и перспективы химической науки: материалы 17 Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. – Казань, 2003. – С. 73.

HIGHLY EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HELIC) IN TESTING OF THE LIQUID ENVIRONMENT OF MICROBIOLOGICAL SYNTHESIS OF THE LYSINE

Н.Г. Габрук
И.И. Олейникова
А.В. Метелев

Belgorod State National Research University

Pobedy St., 85, Belgorod, 308015, Russia

*E-mail: Gabruk@bsu.edu.ru;
Oleynikova@bsu.edu.ru*

Definition of the concentration of a lysine in liquids is the problem of this research. Have been established that HELC is a reliable method for testing of the liquid environment which a lysine have been synthesis. The conditions of chromatography are optimized and results by definition of cleanliness of the standard sample of a lysine are received. Preparation of environment liquids for analysis have been carrying out. Limit of diluting of the initial environment liquids is established. The method turned-phase HELC defines the optimum conditions of analysis of the diluted biomass. The concentration of lysine in environment liquids has been defined.

Key words: lysine, environment liquid, highly effective liquid chromatography, turned-phase HELC, conditions of chromatography.