

М. А. Марынова^{1,2}, К. Р. Таранцева¹, М. И. Яркинд¹

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СОРБЦИИ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕНИЦИЛЛИНОВ

Поступила в редакцию 13.08.2012. Принята к печати 13.01.2013.

Показана возможность извлечения биосинтетических пенициллинов из фильтратов культуральной жидкости методом молекулярной сорбции на неионогенном сорбенте Поролас Т. Определены сорбционные емкости для пенициллинов, термодинамические характеристики процесса сорбции из водного и водно-органического растворов.

Ключевые слова: биосинтетические пенициллины, молекулярная сорбция, Поролас Т.

Сточные воды производства биосинтетических антибиотиков характеризуются значительной степенью загрязненности, что обусловлено многостадийностью процесса и большой номенклатурой применяемого сырья [1, 2]. Наиболее опасными загрязнителями являются органические растворители, используемые на стадии экстракционного выделения пенициллинов из фильтратов культуральной жидкости.

Большое количество органических растворителей, используемых при производстве биосинтетических пенициллинов, указывает на несовершенство существующей в настоящее время технологической схемы получения этих препаратов [3, 4].

Препаративная хроматография привлекает особое внимание как метод выделения и очистки ценных биотехнологических продуктов химико-фармацевтической промышленности, поскольку в сравнении с экстракционными методами она обладает рядом преимуществ, таких как:

- эффективное концентрирование целевых продуктов, которое позволяет применять ее при работе с разбавленными растворами, получаемыми при биосинтезе;
- высокая избирательность и чувствительность сорбентов к структуре органических соединений;
- возможность получения концентрированных элюатов при десорбции веществ в мягких условиях, необходимых при работе с биологически активными соединениями;

● значительное уменьшение номенклатуры и объемов используемых органических растворителей, позволяющее снизить негативное воздействие технологического объекта на окружающую среду.

Известно, что затраты на получение биосинтетической субстанции растут обратно пропорционально логарифму концентрации целевого продукта в исходной смеси, т. е. существует корреляция между стоимостью очищенного продукта и его исходной концентрацией в культуральной жидкости [5]. Поэтому стадия выделения пенициллинов из разбавленных и сложных по составу растворов, получаемых при биосинтезе, существенно влияет на экономическую эффективность производства в целом.

Для выделения пенициллинов представляет интерес как ионообменная сорбция на анионитах, исследования по которой начались еще в 50-х годах прошлого столетия, так и молекулярная сорбция на макропористых неионогенных сорбентах, которая изучена в меньшей степени.

В данной работе изучена возможность применения макропористых неионогенных полимеров для выделения биосинтетических пенициллинов (бензил- и феноксиметилпеницилина) с целью создания альтернативной сорбционной технологии.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

При изучении процессов избирательной сорбции на ионитах антибиотиков, в частности пенициллинов, отмечено, что сорбция сложных органических ионов сопровождается возрастанием энтропии системы [6]. Это возрастание можно объяснить тем, что происходит не только ионное, но и гидрофобное взаимодействие орга-

¹ Пензенская государственная технологическая академия. 440039 Пенза, проезд Байдукова / ул. Гагарина, 1а/1.

² marynova-m.a@mail.ru, krtaar@bk.ru, yah@mail333.com

нических ионов с неионогенными группами сорбентов [6]. Показано, что в системе органический ион — ионит возникает ван-дер-ваальсово взаимодействие [6].

Согласно исследованиям [7 – 9] для сорбции пенициллинов из фильтратов культуральной жидкости можно использовать не только аниониты, но и катиониты. Предполагается, что связывание пенициллинов при этом происходит за счет образования водородной связи между пептидной группой пенициллинов и кислородом соответствующих кислотных групп сорбента, что подтверждается тем, что десорбцию можно осуществить 0,1 % (масса/объем) раствором мочевины, которая способна к образованию водородных связей и вытесняет пенициллины. Поэтому сорбцию в данном случае следует считать не ионной, а молекулярной. Этот метод сорбции не получил распространения из-за невысокой сорбционной емкости.

Из этого можно сделать вывод, что на ионитах наблюдается кооперативная многофакторная сорбция, и это позволяет предположить, что для сорбции пенициллинов возможен подбор селективного молекулярного сорбента.

Особенность молекулярных сорбентов состоит в том, что их емкость увеличивается при возрастании концентрации солей в среде [10], а это особенно важно, так как посторонние электролиты, в значительных количествах содержащиеся в фильтратах культуральной жидкости, оказывают конкурирующее влияние на ионогенную сорбцию пенициллинов и ухудшают качество выделяемого целевого продукта [4].

К молекулярным сорбентам относятся синтетические полимерные неионогенные сорбенты, из которых наиболее распространены сорбенты на основе сополимеров стирола с дивинилбензолом (С-ДВБ). Вначале использование этих неионогенных сорбентов было предложено для цефалоспорина С, для которого экстракционное выделение невозможно [11, 12]. И хотя широкое использование неионогенных сорбентов для выделения цефалоспорина С можно считать предпосылкой для разработки подобных методов выделения близких по строению природных пенициллинов, до настоящего времени такие методы не нашли практического применения. Тем не менее существуют работы, в которых изучены процессы сорбции пенициллинов на неионогенных сорбентах.

Так, в работе [13] изучена возможность использования неионогенного сорбента Amberlite XAD-4 (С-ДВБ) в качестве неполярной неподвижной фазы для ВЭЖХ ряда пенициллинов. Произведен расчет коэффициентов емкости,

изучена их зависимость от рН подвижной фазы (они возрастают с уменьшением рН) и содержания органического растворителя в ней (уменьшаются с увеличением содержания метанола).

В работе [14] изучена сорбция из водных растворов феноксиметилпенициллина на трех неионогенных сорбентах — Amberlite XAD-16 (С-ДВБ), нитрированном Amberlite XAD-16 и Amberlite XAD-7 (полиметакрилат). Показано, что наибольшей сорбционной емкостью обладал Amberlite XAD-16. При изучении зависимости сорбционной емкости от рН найдено, что сорбционная емкость заметно увеличивается при уменьшении рН — по всей видимости, это связано с тем, что при понижении рН феноксиметилпенициллин переходит в гидрофобную форму (кислоту), которая и сорбируется на неионогенных сорбентах.

Максимальная сорбционная емкость Amberlite XAD-16 согласно работе [14] для феноксиметилпенициллина составила 0,135 г/г при рН 2,7 и максимальной равновесной концентрации 0,105 г/л, что существенно больше, чем найденная максимальная сорбционная емкость этого сорбента для цефалоспорина С — 0,006 г/г.

В работе [15] изучена сорбция нескольких аминокислот и бензилпенициллина на ряде сорбентов, включая неионогенные сорбенты серии XUS (сополимеры этилвинилбензола и ДВБ), один из которых был хлорметилирован. Однако при сорбции бензилпенициллина в этой работе использовали раствор с рН 7, что согласно работе [14] не является оптимальной величиной. Тем не менее для неионогенного сорбента XUS-40323 найденная максимальная сорбционная емкость для бензилпенициллина при 24 °С составила около 0,12 г/г при достаточно высокой равновесной концентрации, составляющей около 2,7 г/л. Для хлорметилированного сорбента XUS-43493 она была заметно выше — около 0,18 г/г при равновесной концентрации около 0,67 г/л.

В работе [16] изучена сорбция бензилпенициллина на сорбентах Amberlite XAD-4 и Amberlite XAD-16. Для обоих сорбентов максимальная сорбционная емкость для бензилпенициллина при 25 °С и нейтральном рН составила около 0,2 г/г при равновесной концентрации около 1,35 г/л. Сорбционная емкость для цефалоспорина С в этих условиях была заметно ниже — около 0,08 г/г при большей равновесной концентрации — около 5,8 г/л.

Данные факты свидетельствуют, что природные пенициллины сорбируются на неионогенных сорбентах лучше, чем цефалоспорин С. Поскольку неионогенные сорбенты использу-

ются в промышленности для выделения цефалоспоринов С, представляет интерес исследовать возможность их применения для выделения пенициллинов, рассматривая молекулярную сорбцию на макропористых неионогенных сорбентах в качестве технологического приема, позволяющего проводить безэкстракционное выделение пенициллинов из фильтратов культуральной жидкости. Поэтому задачей настоящих исследований являлся поиск эффективно-го неионогенного сорбента для создания промышленной технологии выделения бензил- и феноксиметилпенициллинов, основанной на методе препаративной хроматографии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сорбционные свойства неионогенного макропористого сорбента оценивали с использованием полимерного гранульного материала, полученного сополимеризацией стирола и дивинилбензола (Поролас Т), характеристики которого соответствовали ТУ 002.91–89. Для подготовки сорбента к работе его загружали в стеклянную колонну диаметром 55 мм. Через слой сорбента со скоростью 4–5 мл/мин пропускали ацетон в количестве, необходимом для полного удаления из слоя сорбента веществ, вызывающих появление опалесценции в смеси вода–ацетон. Ацетон отмывали дистиллированной водой в количестве 300 мл. Далее через слой сорбента пропускали 100 мл 2% (по массе) раствора гидроксида натрия, выдерживали под щелочью 8 ч, отмывали водой до pH 10,5–11,0 на выходе из колонны. Затем через колонну последовательно пропускали 100 мл 2% (по массе) раствора серной кислоты и воду до pH 5,0–5,5.

Вначале эксперименты проводили на модельных растворах калиевых солей пенициллинов в воде. Затем оценивали изменение селективности исследуемого образца сорбента при проведении процесса с использованием фильтратов культуральной жидкости, полученных в условиях действующего химико-фармацевтического производства, в которых присутствуют балластные примеси разнообразной природы.

Изотермы сорбции строили общепринятым методом. Для получения достоверных результатов ставили 5 параллельных экспериментов. Состояние равновесия считали достигнутым, когда значения концентрации пенициллинов во внешнем растворе не изменялись в нескольких последовательно отбираемых пробах, что свидетельствовало о наступлении равновесия в системе адсорбент–адсорбат.

Концентрацию исследуемого вещества во внешнем растворе определяли поляриметриче-

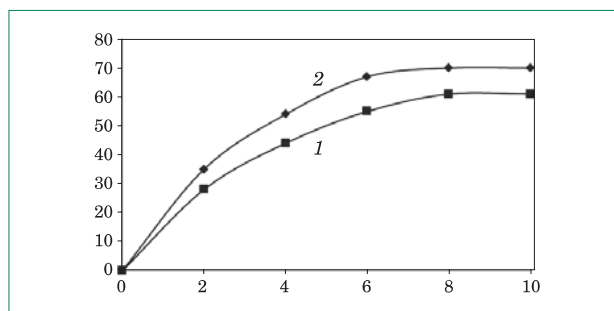


Рис. 1. Изотермы сорбции пенициллинов из водных растворов при 20 °C на сорбенте Поролас Т: 1 — бензилпенициллин; 2 — феноксиметилпенициллин; по оси абсцисс — равновесная концентрация в растворе, мг/мл; по оси ординат — равновесная емкость сорбента, мг/мл.

ским методом с использованием калибровочного графика.

Количество адсорбированного вещества (A) определяли по формуле:

$$A = \frac{(c_0 - c_1)V_p}{V_a}, \quad (1)$$

где A — количество адсорбированного вещества, приходящееся на 1 мл адсорбента, мг; c_0 и c_1 — концентрации раствора до и после контакта с адсорбентом соответственно, мг/мл; V_a — объем адсорбента, мл; V_p — объем раствора, из которого идет сорбция, мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены изотермы сорбции пенициллинов на сорбенте Поролас Т, из которых видно, что исследуемые вещества имеют значительное сродство к сорбенту Поролас Т. Равновесная сорбционная емкость этого сорбента по бензилпенициллину составляла 60 мг/мл, по феноксиметилпенициллину — 70 мг/мл.

По форме изотерм сорбции можно сделать вывод, что сорбция пенициллинов на сорбенте Поролас Т проходит по мономолекулярному механизму, описываемому уравнением Ленгмюра:

$$a = a_\infty \frac{Kc_s}{1 + Kc_s}, \quad (2)$$

где a — величина адсорбции при равновесной концентрации адсорбата, моль/г; a_∞ — поверхностная концентрация адсорбтива при полном мономолекулярном покрытии сорбента, моль/г; K — константа равновесия; c_s — равновесная концентрация.

Для определения значений констант уравнения Ленгмюра его преобразовывают, получая линейную зависимость c_s/a от c_s :

$$\frac{c_s}{a} = \frac{c_s}{a_\infty} + \frac{1}{a_\infty K}. \quad (3)$$

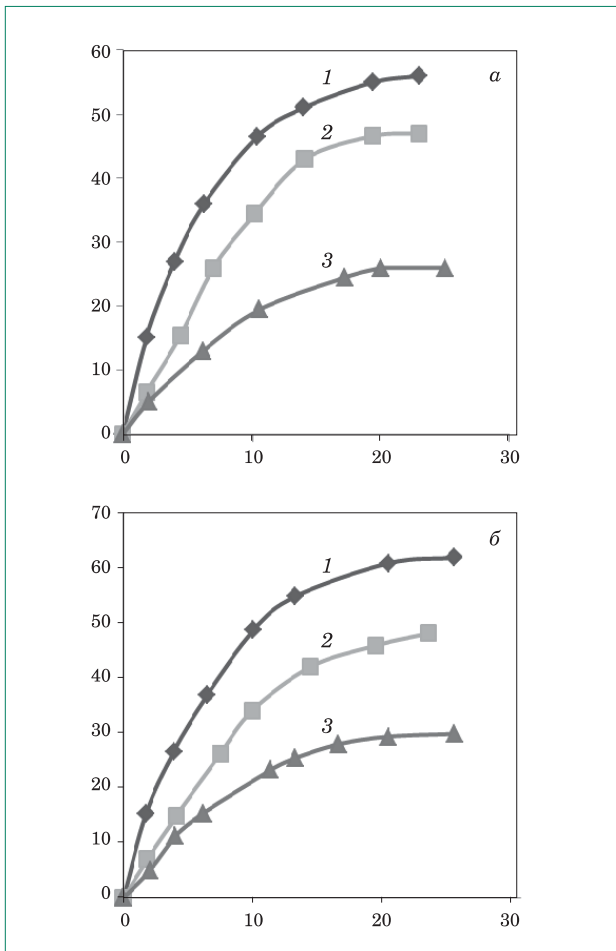


Рис. 2. Влияние состава внешнего раствора на равновесное распределение бензилпенициллина (а) и феноксиметилпенициллина (б) между фазами 5 % (1), 10 % (2) и 30 % (3) (по объему) раствора изопропилового спирта и сорбента Поролас Т; по оси абсцисс — равновесная концентрация в фазе сорбента, мг/мл; по оси ординат — равновесная концентрация в фазе раствора, мг/мл.

Для определения термодинамических параметров сорбционного процесса снимали изотермы сорбции калиевых солей бензил- и феноксиметилпенициллина из водного раствора при 283 К, 293 К и 303 К. Затем с помощью линейной формы уравнения Ленгмюра производили расчет констант сорбционного равновесия, которые представлены в табл. 1.

Таблица 1. Константы сорбционного равновесия пенициллинов из водного раствора на сорбенте Поролас Т

Температура, К	Бензилпенициллин	Феноксиметилпенициллин
283	8140 ± 500	12000 ± 1000
293	3340 ± 200	9000 ± 400
303	2330 ± 200	8500 ± 500

На их основе были рассчитаны термодинамические функции процесса сорбции на исследуемом сорбенте — изменение энергии Гиббса (ΔG), энтальпии (ΔH) и энтропии ($T\Delta S$). Значения термодинамических функций представлены в табл. 2, из данных которой следует, что в изучаемой системе молекулярный адсорбент — адсорбат самопроизвольно протекает процесс сорбции целевых веществ. Вклад энтальпийной составляющей в избирательность сорбции выше, чем энтропийной, что позволяет сделать вывод о достаточно сильном дисперсионном взаимодействии исследуемых БАВ с полимерной матрицей сорбента, причем избирательность сорбции феноксиметилпенициллина выше, чем бензилпенициллина.

Влияние органического растворителя на сорбционные свойства. Для эффективного процесса десорбции необходимо ослабить гидрофобное взаимодействие сорбированных соединений с полимерной матрицей сорбента. Добиться этого можно добавлением во внешний раствор органического растворителя. С этой целью изучали влияние массовой доли изопропилового спирта на равновесное распределение пенициллинов между фазой водно-органического раствора и фазой сорбента. Эксперименты проводили с модельными растворами в статических условиях (рис. 2).

Далее произвели расчет констант сорбционного равновесия пенициллинов при внесении во внешний раствор различных концентраций изопропилового спирта (табл. 3). Выявлено резкое снижение избирательности сорбции пенициллинов сорбентом Поролас Т при внесении органического растворителя в фазу внешнего раствора. Увеличение доли органического растворителя в фазе внешнего раствора снижает различие термодинамических состояний пенициллинов в полимерной и жидкой фазах.

Данный факт является основой для подбора состава элюента при извлечении целевых продуктов из фазы макропористого неионогенного сорбента.

Таблица 2. Термодинамические характеристики процесса сорбции пенициллинов на сорбенте Поролас Т (в кДж/моль)

Сорбируемое вещество	$-\Delta G$	$-\Delta H$	$T\Delta S$
Бензилпенициллин	19,6 ± 0,2	13,2 ± 0,3	6,4 ± 0,5
Феноксиметилпенициллин	22,2 ± 0,2	13,5 ± 0,3	8,7 ± 0,5

Оценка селективности сорбента Поролас Т применительно к промышленным фильтрам культуральной жидкости. Эффективность применяемого сорбционного процесса определяется возможностью избирательной сорбции целевых продуктов в присутствии посторонних веществ без снижения основных сорбционных характеристик. С этой целью сравнивали кривые десорбции для сорбента Поролас Т. При этом процесс сорбции — десорбции осуществляли в динамических условиях, сорбцию проводили с использованием модельных растворов и промышленных фильтратов культуральной жидкости пенициллинов (рис. 3). Для бензил- и феноксиметилпенициллина получены практически идентичные профили.

Из представленных на рис. 3 данных следует, что при работе с фильтрами культуральной жидкости значительно снижается емкость сорбента по сравнению с модельными растворами. Выход на стадии десорбции из модельного раствора составляет около 80 %, а из фильтратов культуральной жидкости — почти в 1,5 раза меньше. Причем повышение концентрации органического растворителя в элюенте способствовало увеличению выхода целевого продукта, но при этом ухудшалось качество элюента по такому показателю, как цветность.

Из элюатов, полученных из фильтратов культуральной жидкости, ферментативным гидролизом получена 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК) — ядро молекулы пенициллинов, модификацией которого получают полусинтетические антибиотики пенициллинового ряда. Однако эта 6-АПК не соответствовала установленным требованиям из-за наличия значительных количеств балластных примесей. Следовательно, необходима дальнейшая оптимизация условий проведения процесса, поиск более селективного сорбента, дополнительная очистка фильтратов культуральной жидкости перед сорбцией.

Таблица 3. Влияние состава внешнего раствора на равновесное распределение пенициллинов между фазами раствора и сорбента Поролас Т при 293 К

Объемная доля изопропилового спирта, %	Константа сорбционного равновесия	
	бензил-пенициллин	феноксиметил-пенициллин
5	3200 ± 100	5900 ± 300
10	2200 ± 100	3400 ± 100
30	1800 ± 100	2800 ± 200

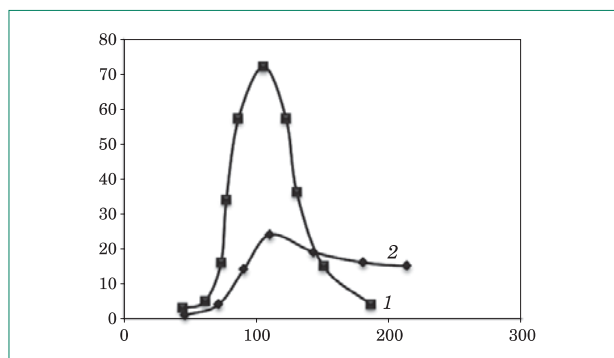


Рис. 3. Профили десорбции пенициллинов с Поролас Т 30 % раствором изопропилового спирта: 1 — модельный раствор; 2 — фильтрат культуральной жидкости; по оси абсцисс — объем элюата, мл; по оси ординат — массовая концентрация пенициллина в элюате, мг/мл.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы равновесные характеристики сорбции бензил- и феноксиметилпенициллина из водных и водно-изопропанольных растворов на неионогенном сорбенте Поролас Т. Установлено, что равновесная емкость сорбента (из водных модельных растворов) по бензилпенициллину составляет около 60 мг/мл, по феноксиметилпенициллину — около 70 мг/мл.

2. Определены механизм, константы и термодинамические характеристики сорбции пенициллинов на сорбенте Поролас Т. Показано, что процесс в основном определяется энтальпийной составляющей энергии Гиббса.

3. Показано, что при сорбции пенициллинов из фильтратов культуральной жидкости на сорбенте Поролас Т и последующей десорбции не удается достигнуть такой степени очистки, которая позволяет получить из пенициллинов качественную 6-АПК.

4. Показана необходимость дальнейшей оптимизации условий проведения процесса, поиска более селективного сорбента, проведения дополнительной очистки фильтратов культуральной жидкости перед сорбцией для того, чтобы уменьшить конкурирующее влияние балластных веществ и улучшить качественные характеристики получаемой 6-АПК.

СПИСОК ССЫЛОК

1. Таранцева К. Р., Фирсова Н. В. / Защита металлов. 2006. Т. 42. № 2. С. 204 – 209.
2. Таранцева К. Р., Фирсова Н. В., Марынова М. А. / Известия ПГПУ им. В. Г. Белинского. 2011. № 25. С. 592 – 596.
3. Зелинский Ю. Г., Шемерянкин Б. В., Шмаков Н. М. Выделение и очистка веществ в хим-

- фармпромышленности. — М.: Медицина, 1982. — 240 с.
4. Марынова М. А. Снижение загрязненности сточных вод химико-фармацевтических производств сорбционным выделением β-лактамов / Дис. канд. техн. наук. — Пенза: ПГТА, 2012.
 5. Черкасов А. Н., Пасечник В. А. Мембраны и сорбенты в биотехнологии. — Л.: Химия, 1991. — 240 с.
 6. Самсонов Г. В. / Ионный обмен / Под ред. Сенявина М. М. — М.: Наука, 1981. С. 126 – 136.
 7. Самсонов Г. В., Веденеева В. В., Селезнева А. А. / Докл. АН СССР. 1959. Т. 125. № 3. С. 591 – 594.
 8. Самсонов Г. В. Сорбция и хроматография антибиотиков. — М.-Л.: изд-во АН СССР, 1960. — 175 с.
 9. Самсонов Г. В., Селезнева А. А., Ван И. / Тр. ЛХФИ. 1962. Вып. 15. С. 101 – 104.
 10. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии. — М.: Колосс, 2004. — 296 с.
 11. Voser W. Process for the recovery of hydrophilic antibiotics / United States Patent #3725400, 1973.
 12. Voser W., Weiss K. / J. Chromatogr. 1980. V. 201. P. 287 – 292.
 13. Salto F., Prieto J. G. / J. Pharm. Sci. 1981. V. 70. P. 994 – 998.
 14. Chaubal M. V., Payne G. F., Reynolds C. H., Albright R. L. / Biotechnol. Bioeng. 1995. V. 47. P. 215 – 226.
 15. Grzegorzczak D. S., Carta G. / Chem. Eng. Sci. 1996. V. 51. P. 807 – 817.
 16. Lee J. W., Shim W. G., Yang W. C., Moon H. / J. Chem. Technol. Biotechnol. 2004. V. 79. P. 413 – 420.

USE OF MOLECULAR SORPTION FOR RECOVERY OF BIOSYNTHETIC PENICILLINS

М. А. Marynova^{1,2}, К. Р. Tarantseva¹, М. И. Yakhkind¹

¹ Penza State Technological Academy. 440039, Penza, Baydukova/Gagarina, 1a/11

² marynova-m.a@mail.ru, krtar@bk.ru, yah@mail333.com

The possibility of biosynthetic penicillins recovery from culture broth filtrates by molecular sorption method on nonionic sorbent Porolas T was shown. The sorptive capacities of the penicillins, thermodynamic characteristics of the sorption process from water and water-organic solutions were determined.

Keywords: biosynthetic penicillins, molecular sorption, Porolas T.