

УДК 541.135.541.64

ЭНАНТИОСПЕЦИФИЧНАЯ СОРБЦИЯ L-ЛИЗИНА МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННЫМИ СОРБЕНТАМИ НА ОСНОВЕ МЕТАКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ДИМЕТАКРИЛАТА ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

© 2019 г. И. В. Полякова^{1, *}, О. А. Писарев^{1, 2}

¹Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004, Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251, Россия

*e-mail: pol_irina_val@list.ru

Поступила в редакцию 25.05.2018 г.

После доработки 23.07.2018 г.

Принята к публикации 25.09.2018 г.

На основе метакриловой кислоты и диметакрилата этиленгликоля синтезированы полимерные сорбенты, импринтированные молекулами L-лизина. Проведено сравнительное изучение равновесия и кинетики сорбции этой аминокислоты синтезированными и контрольным сорбентами (неимпринтированным аналогом). Показано, что энантиоспецифичное разделение рацемической смеси D,L-лизина наиболее эффективно реализовывалось на полимерном сорбенте, синтезированном в присутствии 6 моль, % L-лизина, который сорбировал аминокислоту в поверхностном сорбционном слое на энергетически равноценных специфичных центрах связывания.

Ключевые слова: L-лизин, молекулярно импринтированные сорбенты, равновесие, кинетика и динамика сорбции, энантиоспецифичное разделение

DOI: 10.1134/S0555109919010136

Одной из главных задач разработки препаративных сорбционных процессов выделения и очистки целевых биологически активных веществ (БАВ) из продуктов микробиологического синтеза относится поиск новых высокоселективных сорбентов, на которых их сорбция реализуется с высокими равновесными сорбционными емкостями, быстрой кинетикой гетерогенного массообмена при полной ее обратимости и сохранением нативной структуры [1, 2].

Молекулярный импринтинг является современной методикой создания высокоселективных сорбентов. При этом сополимеризацию функционального и сшивающего мономеров осуществляют в присутствии молекулы целевого БАВ, выполняющей роль шаблона или темплата. После удаления темплата из полимерной сетки в матрицах молекулярно импринтированных сорбентов (МИС) формируются импринт-сайты со специфичным родством к целевому БАВ [3–5]. Таким образом, МИС представляют собой сорбенты, обладающие свойствами искусственных рецепторов к нему.

Энантиоспецифичное разделение рацемических смесей аминокислот, в частности D- и L-стереорегулярных форм лизинов, является актуальной задачей современной биотехнологии. К основному препятствию для широкого распространения прямого химического синтеза L-лизина относятся

трудности, возникающие при разделении смеси аминокислот, состоящей из D- и L-изомеров. Широко известен способ получения L-лизина, основанный на использовании фермента лактомазы для ферментативной конверсии рацемата D,L- α -амино- ϵ -капролактама в L-лизин. После проведения ферментативной реакции в реакционной среде наряду с L-лизином находится и рацемическая смесь D- и L-стереоизомерных форм аминокислоты, которая должна быть подвергнута разделению [6].

Цель работы – разработка метода энантиоспецифичного разделения рацемической смеси D- и L-лизинов с использованием полимерных сорбентов на основе метакриловой кислоты (МАК) и диметакрилата этиленгликоля (ДМЭГ), молекулярно импринтированных L-лизином (лизМИС), и изучение влияния физико-химических свойств сорбционной среды на равновесие, кинетику и динамику сорбции ими аминокислоты.

МЕТОДИКА

В работе использованы МАК (“Вектон”, Россия), ДМЭГ (“Acros Organics”, Бельгия), изопропиловый спирт (ИПС) (“Вектон”, Россия), L-лизин (“Sigma”, США), аскорбиновая кислота (АсК) (“Вектон”, Россия) и персульфат аммония (ПСА) (“Вектон”, Россия).

Таблица 1. Влияние концентрации темплата на физико-химические свойства полимерных сорбентов на основе МАК и ДМЭГ

Сорбент	K_H		K_H^{Na}/K_H^H	$d, \text{ г/см}^3$	$Q, \text{ мг-экв/г}$	pK_α	n
	Н-форма	Na-форма					
КС	4.0	10.0	2.5	0.71	8.6	6.3	1.7
лизМИС-3	5.0	11.7	2.3	0.71	9.0	6.4	1.5
лизМИС-6	5.4	14.4	2.7	0.70	8.8	6.3	1.4
лизМИС-9	4.9	19.8	4.0	0.69	9.1	6.3	1.2
лизМИС-12	4.4	24.5	5.6	0.69	9.2	6.2	1.2

Синтез полимерных сорбентов осуществляли методом радикальной сополимеризации МАК и ДМЭГ в среде 45%-ного ИПС при комнатной температуре. Концентрация сомономеров в реакционной смеси составляла 20% при соотношении МАК/ДМЭГ, равном 88 : 12 моль, %. Радикальную сополимеризацию инициировали окислительно-восстановительной системой ПСА-АсК в количестве 1 вес, % к массе сомономеров при соотношении ПСА/АсК, равном 1.5:1. Для синтеза лизМИСов в полимеризационную смесь вводили 3, 6, 9 и 12 моль, % L-лизина. Из синтезированных полимерных сеток темплаты аминокислоты вымывали 0.5 н. NaOH, водой, 0.5 н. HCl и далее снова водой до нейтрального pH.

Коэффициенты набухания (K_H), насыпную плотность ($d, \text{ г/см}^3$), полную обменную емкость (ПОЕ, мг-экв/г) и кажущуюся константу диссоциации (pK_α) сорбентов определяли по методикам, которые описаны в [7–9].

Величины pK_α и параметр кооперативности ионизации (n) находили из линеаризованной формы модифицированного уравнения Гендерсона-Гассельбаха:

$$pH = pK_\alpha - n \left(\lg \frac{1-\alpha}{\alpha} \right), \quad (1)$$

где n – характеризует изменение кажущейся константы диссоциации ионогенных групп с ростом их степени ионизации. Чем больше величина n отклоняется от 1, тем больше влияние ионизации каждой предыдущей карбоксильной группы на ионизацию последующей (кооперативный характер ионизации).

Равновесие и кинетику сорбции L-лизина исследовали статическим методом. Равновесную емкость сорбции рассчитывали следующим образом:

$$q_p = \frac{(C - C_p)V}{m}, \quad (2)$$

где q_p – равновесная емкость сорбции, мг/г; C и C_p – начальная и равновесная концентрация сорбтива (мг/мл), соответственно; V – объем раствора сорбтива (мл); m – масса сорбента (г).

Кинетику сорбции аминокислоты изучали путем анализа кинетических кривых зависимости степени насыщения сорбента сорбатом (F) от времени (t). F рассчитывали по формуле:

$$F = \frac{q_t}{q_p}, \quad (3)$$

где q_t – сорбционная емкость в момент времени t .

Среднее время сорбции, \bar{t} (мин), рассчитывали как площадь над кинетическими кривыми зависимости степени насыщения от времени сорбции:

$$\bar{t} = \int_0^1 t dF. \quad (4)$$

При сорбции в полном объеме сферической частицы величина \bar{D} рассчитывалась при помощи гомогенной модели Бойда [10]:

$$\bar{D} = \frac{r^2}{15\bar{t}}. \quad (5)$$

При сорбции в ограниченном сорбирующем слое кинетические характеристики сорбции могут быть рассчитаны при помощи модели “оболочка-ядро” [11]:

$$\bar{D} = \frac{(1 + 3\rho + 6\rho^2 + 5\rho^3) l^2}{(1 + \rho + \rho^2) 15\bar{t}}, \quad (6)$$

где l – толщина сорбционного слоя, см; ρ – безразмерный радиус несорбирующего “ядра”; $\rho = 1 - l/r$.

Динамику сорбции изучали на колонках размером $D \times H = 10 \times 50$ мм. Динамические кривые сорбции анализировали в координатах C_i vs. $(V_i - V_0)$, где C_i – концентрация аминокислоты на выходе из колонки (мг/мл), V_i и V_0 – объем элюента и свободный объем колонки (мл).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структура и физико-химические свойства синтезированных полимерных сорбентов на основе МАК и ДМЭГ зависели от количества введенных темплатов L-лизина (табл. 1).

Значения n в лизМИСх снижались по сравнению с неимпринтированным контрольным сорбентом (КС) и по мере роста концентрации темплатов в ряду лизМИСов. Следовательно, снижалось влияние ионизации карбоксильных групп на ионизацию последующих в матрицах сорбентов. В качестве характеристики структурной устойчивости КС и лизМИСов было выбрано отношение коэффициентов набухания сорбентов в натриевой форме к их коэффициентам набухания в водородной форме. Наименьшая структурная устойчивость наблюдалась для лизМИС-9 и лизМИС-12. Далее эти сорбенты не исследовались, так как большая разница в коэффициентах их набухания в натриевой и водородной формах исключала их применение в колоночных препаративных сорбционных процессах.

L-лизин является полиамфолитом и содержит в своей структуре две аминогруппы ($pK_{\alpha 1} = 9.12$; $pK_{\alpha 2} = 10.53$) и одну карбоксильную группу ($pK_{\alpha} = 2.18$). Изoeлектрическая точка лизина $pI = 9.82$ [12].

Сорбционные емкости КС по L-лизину значительно снижались с ростом ионной силы. Это, по-видимому, было обусловлено преобладающим вкладом ион-ионных взаимодействий в неспецифичную сорбцию аминокислоты (рис. 1а). Рост абсолютных величин сорбционных емкостей в области высоких значений pH был обусловлен сильными ион-ионными взаимодействиями между полностью заряженными кислотными карбоксильными группами КС и сильноосновными ϵ -аминогруппами лизина.

При сорбции на лизМИСх, особенно на лизМИС-6, величина сорбционной емкости практически не зависела от pH и ионной силы (рис. 1б, в). Это указывало на присутствие в молекулярно импринтированных матрицах совокупности сорбционных центров (импринт-сайтов), которые специфично связывали аминокислоту за счет неионных взаимодействий.

В ферментативном методе синтеза L-лизина продукты гидролиза D,L- α -амино- ϵ -капролактама в виде рацемической смеси D,L-аминокислот получают при pH 8.0–8.5 и ионной силе 0.2 М [6]. В связи с этим изотермы равновесной сорбции были изучены при pH 8.3 и $I = 0.2$ М.

Характер изотерм сорбции аминокислоты на КС и МИС различался. Неспецифичная сорбция L-лизина на КС осуществлялась на энергетически неоднородных сорбционных центрах (рис. 2, 1). Уже на лизМИС-3 наблюдалась тенденция к “гомогенизации” сорбционных центров, а на лизМИС-6 изотерма сорбции аминокислоты соответствовала выпуклой изотерме сорбции по независимым центрам (изотерме Ленгмюра, рис. 2, 2, 3). Это свидетельствовало о термодинамически выгодном распределении L-лизина на равноценных

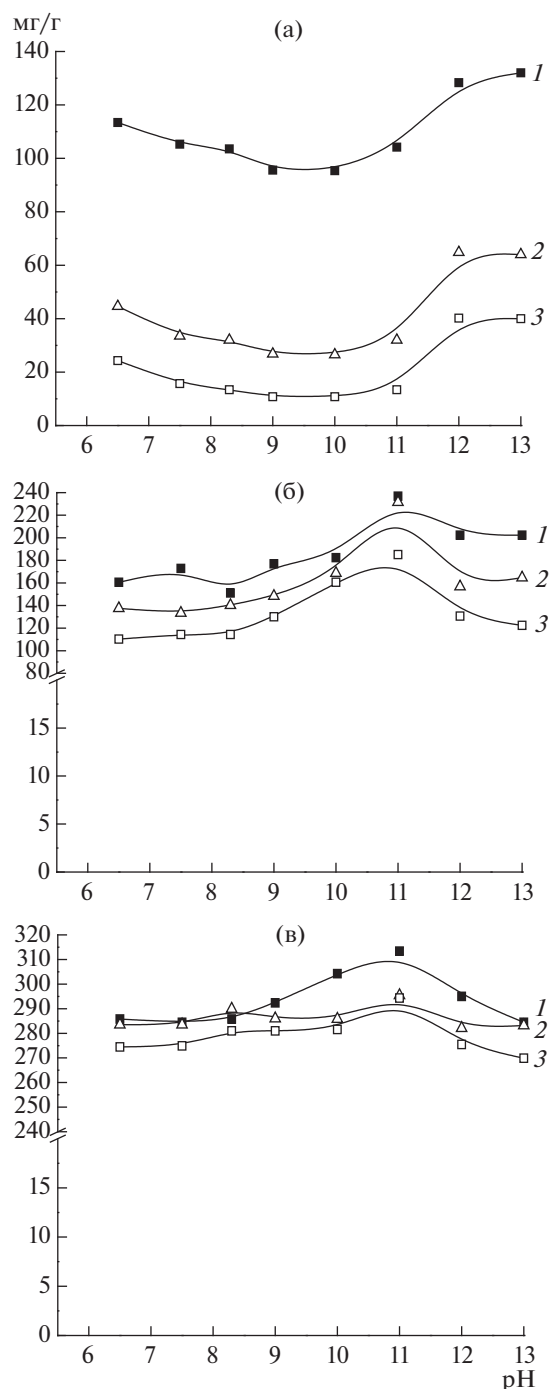


Рис. 1. Влияние pH и ионной силы на сорбционную емкость по L-лизину (0.2 мг/мл) КС (а), лизМИС-3 (б) и лизМИС-6 (в). 1 – 0.1, 2 – 0.2, 3 – 0.4 М ацетат натрия.

сорбционных центрах, которыми в матрице лизМИС-6 могут быть “полости”, комплементарные к аминокислоте.

Изучение кинетических характеристик сорбции также было проведено при pH 8.3 и 0.2 М ионной силе.

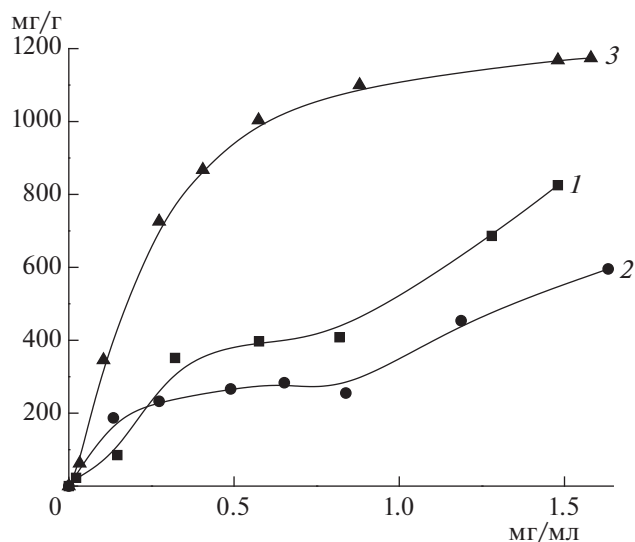


Рис. 2. Изотермы равновесной сорбции L-лизина на КС (1), лизМИС-3 (2) и лизМИС-6 (3).

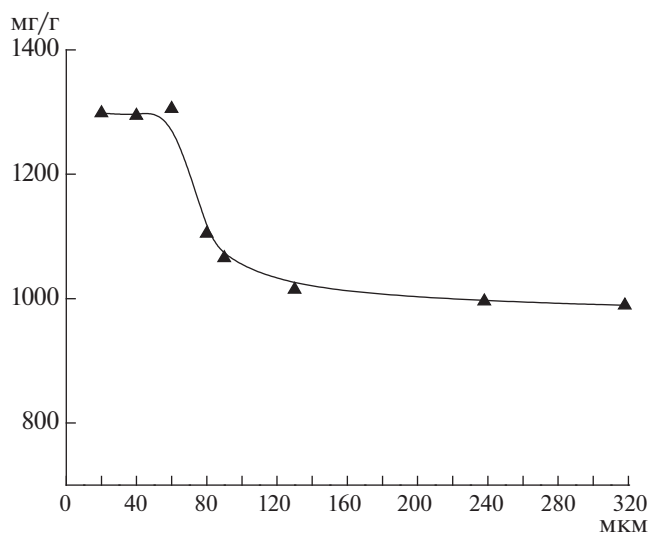


Рис. 3. Влияние диаметра частиц лизМИС-6 на сорбционную емкость по L-лизину при сорбции из 0.2 М ацетата натрия, рН 8.3.

Радиус поверхностного сорбирующего слоя для расчета по модели “оболочка–ядро” был экспериментально установлен из зависимостей сорбционных емкостей от диаметра частиц и оказался равным 30 мкм (рис. 3).

По мере измельчения сорбентов их кинетические свойства улучшались (табл. 2). На фракции частиц с наиболее мелким размером ($d_p = 75$ мкм) значения \bar{D} , рассчитанные по модели Бойда и “оболочка–ядро”, практически совпадали. Наиболее высокие значения \bar{D} достигались на лизМИС-6. При этом они имели одинаковый порядок величин для всех размеров частиц сорбента. Это свидетельствовало о распределении аминокислоты

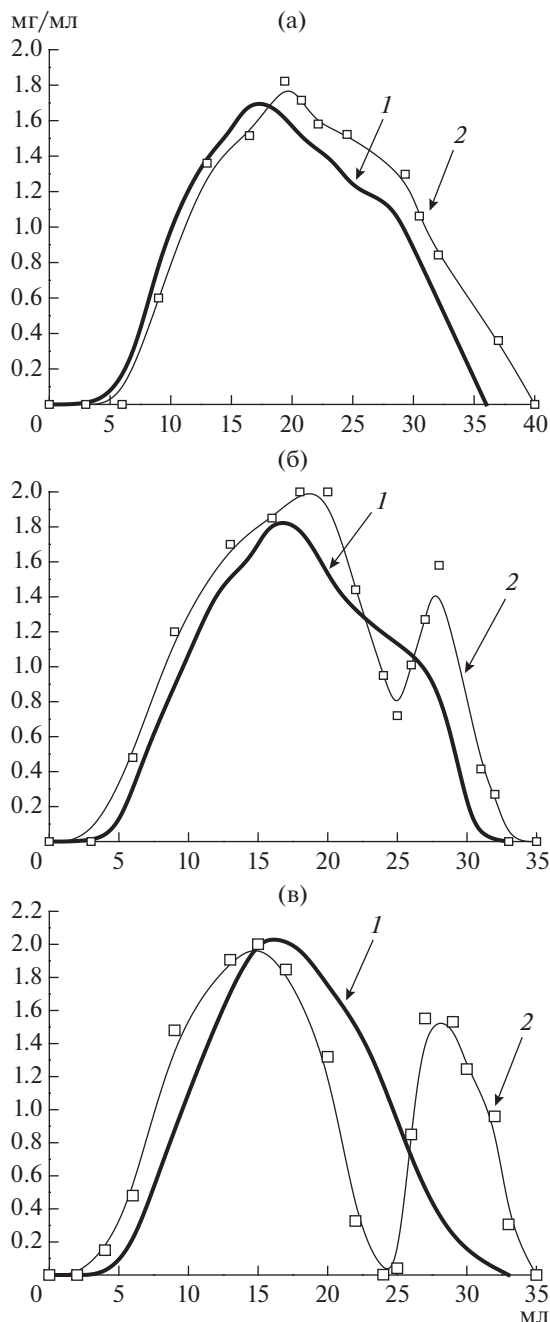


Рис. 4. Специфичная сорбция L-лизина (1) и энантиоспецифичное разделение рацемической смеси D,L-лизина (2) (1 мг/мл в 0.2 М ацетате натрия, рН 8.3) на КС (а), лизМИС-3 (б) и лизМИС-6 (в) после десорбции 0.4 М ацетатом натрия, рН 11.7.

преимущественно на легко “доступных” импринт-сайтах в поверхностно сорбирующем слое.

Данные по равновесию и кинетики сорбции были использованы для разработки динамического сорбционного метода разделения рацемической смеси D,L-лизина. На КС концентрационные профили были практически идентичны для L-лизина и D,L-лизина (рис. 4а). На лизМИС

Таблица 2. Кинетические характеристики сорбции L-лизина КС и лизМИС (рН 8.3, I = 0.2 М)

Сорбент	d_p , мкм	\bar{t} , мин	$\bar{D} \times 10^8$, см ² /сек	
			модель Бойда	модель “оболочка-ядро”
КС	130	63.2	0.06	0.04
	90	6.9	0.32	0.28
	75	1.1	1.42	1.38
лизМИС-3	130	8.6	0.43	0.97
	90	4.3	0.52	0.45
	75	1.3	1.21	1.17
лизМИС-6	130	2.5	1.47	1.02
	90	1.2	1.88	1.65
	75	0.7	3.23	3.17

наблюдалось разделение концентрационного профиля при сорбции D,L-лизина (рис. 4б, в). При этом наиболее эффективное (практически до нулевой линии) разделение осуществлялось на лизМИС-6.

Таким образом, результаты исследования свидетельствовали о том, что импринтинг сополимеров МАК-ДМЭГ молекулами L-лизина приводил к получению полимерных сорбентов, которые обладали сорбционными центрами, способными осу-

ществлять аффинноподобное связывание аминокислоты и ее энантиоселективное молекулярное узнавание.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. *Pisarev O.A., Polyakova I.V.* Preparative Methods of Biologically Active Substances Fractionation. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing, 2013. 169 p.
2. *Pisarev O.A., Polyakova I.V.* // Trends in Chromatogr. 2013. V. 7. № 1. P. 85–106.
3. *Spivak D.A., Shea K.I.* // J. Mol. Recognit. 2012. V. 25. № 2. P. 320–382.
4. *Cheong W.J., Yang S.H., Ali F.* // J. Sep. Sci. 2013. V. 36. № 2. P. 609–628.
5. *Chen L., Wang X., Lu W., Wu X., Li J.* // Chem. Soc. Rev. 2016. V. 45. № 11. P. 2137–2211.
6. *Mann J.* Chemical Aspects of Biosynthesis. Oxford: University Press, 1998. 256 p.
7. *Soldatov V.S., Sosinovich Z.I., Korshunova T.A., Mironova T.V.* // React. Funct. Polym. 2004. V. 58. № 1. P. 3–12.
8. *Полянский Н.Г., Горбунов Г.В., Полянская Н.Л.* Методы исследования ионитов. М.: Химия, 1976. 206 с.
9. *Ежова Н.М., Гаркушина И.С., Писарев О.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 6. С. 635–639.
10. *Boyd G.E., Adamson A.W., Myers L.S.* // J. Am. Chem. Soc. 1949. V. 67. № 9. P. 2836–2848.
11. *Polyakova I.V., Pisarev O.A.* // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1092. № 1. P. 135–141.
12. *Якубке Х.-Д., Ешкайт Х.* Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1985. 455 с.

Enantiospecific Sorption of L-Lysin by Molecularly Imprinted Sorbents Based on Methacrylic Acid and Ethyleneglycol Dimethacrylate

I. V. Polyakova^{a,*} and O. A. Pisarev^{a,b}

^aInstitute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg, 199004 Russia

^bSt. Petersburg Polytechnic University of Peter the Great, St. Petersburg, 195251 Russia

*e-mail: pol_irina_val@list.ru

Received May 25, 2018

Revised July 23, 2018

Accepted September 25, 2018

Based on methacrylic acid and ethylene glycol dimethacrylate, polymeric sorbents, imprinted with L-lysine molecules, have been synthesized. A comparative study of the equilibrium and kinetics of sorption of the amino acid by the synthesized sorbents and control sorbent (an unimprinted analog) have been carried out. It was shown that the enantiospecific separation of the racemic mixture of D,L-lysine was most effectively realized on the polymeric sorbent synthesized in the presence of 6 mol % of L-lysine, which sorbed the amino acid in the surface sorption layer at energy-equivalent specific binding sites.

Keywords: L-lysine, molecularly imprinted sorbents, enantiospecific separation, equilibrium, kinetics and dynamics of sorption