

# Ters Misel Sistemi ile L-Aspartik Asit Ekstraksiyonu

## Extraction of L-Aspartic Acid with Reverse Micelle System

Özlem AYDOĞAN \*, Emine BAYRAKTAR ve Ülkü MEHMETOĞLU

Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 06100, Ankara

Geliş Tarihi/Received : 05.05.2008, Kabul Tarihi/Accepted : 27.03.2009

### ÖZET

Bu çalışmanın amacı, hidrofilik bir amino asit olan L-aspartik asitin ekstraksiyonunu ters misel sistemiyle incelemektir. Son yıllarda, amino asitlerin fermentasyonla üretimi giderek önem kazanmaktadır. Bu amino asitler, sulu çözeltilerinde seyreltik olarak bulunurlar ve üretim ortamlarında fazla bulunan substrat, inorganik tuzlar ve yan ürünlerden ayrılması gerekmektedir. Günümüzde ters misel ekstraksiyonu ile amino asitlerin, üretim ortamından ayrılması üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada, ters misel fazı; yüzey aktif madde olarak, aliquid-336, eş yüzey aktif madde olarak, 1-dekanol ve apolar çözücü olarak izooktan içermektedir. Deneyler 150 rpm karıştırma hızında, 30 °C'da, 60 dakika süre ile eşit hacimde ters misel ve sulu fazlar ile gerçekleştirilmiştir. L-aspartik asit derişimi sıvı kromatografi (HPLC) ile analizlenmiştir. Ekstraksiyon verimi, pH ve aliquid-336 derişiminin artmasıyla ve başlangıç amino asit derişiminin azalmasıyla artmıştır. Maksimum ekstraksiyon verimi (% 68) pH 12'de, yüzey aktif madde derişimi 200 mM'da ve başlangıç amino asit derişimi 5 mM'da elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler :** *L-aspartik asit, Amino asit, Ters misel, Ekstraksiyon, Aliquat-336.*

### ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the extraction L-aspartic acid which is a hydrophobic amino acid with reverse micelle system. Production of amino acids by fermentation has been more important in recent years. These amino acids are obtained in dilute aqueous solutions and have to be separated from excess substrate, inorganic salts and by-products. Recently, separation of amino acids from fermentation media by reverse micelle extraction has received a great deal of attention. In this study, reverse micelle phase includes aliquid-336 as a surfactant, 1-decanol as a co-surfactant and isooctane as an apolar solvent. Experiments were performed at 150 rpm stirring rate, at 30 °C, for 30 min extraction time with equal volumes of reverse micelle and aqueous phases. Concentration of L-aspartic acid was analyzed by liquid chromatography (HPLC). The extraction yield increased with increasing pH and aliquid-336 concentration and with decreasing initial amino acid concentration. Maximum ekstraksiyon yield (68 %) was obtained at pH of 12, surfactant concentration of 200 mM and an initial amino acid concentration of 5 mM.

**Keywords :** *L-aspartic acid, Amino acid, Reverse micelle, Extraction, Aliquat-336.*

### 1. GİRİŞ

Amino asitler, proteinlerin yapı taşlarıdır ve canlı organizmalarda özel dokuların yenilenmesi, büyüme, kas yapımı gibi biyofiziksel fonksiyonların kontrol edilmesinde bilgi taşıma kapasitelerine sahiptir. Ayrıca amino asitler ve türevlerinin, farmasötik, kozmetik, gıda ve tarım alanlarında geniş kullanım alanları vardır. Bu geniş kullanım

alanlarından dolayı dünyada yıllık amino asit talebi % 5 ile 10 arasında artmaktadır (Kirk ve Othmer, 1992).

L-aspartik asit, esansiyel olmayan, asidik karakterli bir amino asittir. Sitrik asit çevriminde diğer amino asitler ve biyokimyasal maddelerin sentezlenmesinde rol oynar. Canlılık, güç ve kuvvet verdiği için yorgunluğa iyi gelir (Pamuk, 2000). Gıda

\* Yazışılan yazar/Corresponding author. E-posta adresi/E-mail adress: ozlem.aydogan@eng.ankara.edu.tr (Ö. Aydoğan)

sanayiinde çok yaygın kullanılan ve düşük kalorili bir tatlandırıcı olan aspartamın girdi maddelerinden biridir. Aspartama olan talebin fazla olması L-aspartik asitin dünya piyasasındaki ticari değerini artırmıştır (Kirk ve Othmer, 1992).

L-aspartik asit, fumarik asit ve amonyaktan 1958'den beri, kesikli ve sürekli sistemde, enzimatik veya mikrobiyal biyotransformasyonla üretilmektedir (Chibata v.d., 1974; Tosa v.d., 1974; Sato v.d., 1979; Fusee v.d., 1981; Chao v.d., 2000; Aydoğan v.d., 2007). Enzimatik yöntem oldukça hızlı ve basittir. Ancak mikroorganizmadan ekstrakte edilen enzim tutuklandığında, kararlılığının endüstriyel uygulamalar için yeterli olmadığı belirtilmiştir (Chibata v.d., 1974). L-aspartik asitin sürekli endüstriyel üretimi tutuklanmış *Escherichia coli* hücreleriyle 1973 yılından beri Tanabe Seiyaku Co. Ltd. (Japonya) tarafından yapılmaktadır (Sato v.d., 1993). Glutamik asit, lizin, treonin, lösin ve diğer birçok amino asit de fermentasyonla üretilmektedir. Bu amino asitler, sulu çözeltilerinde seyreltik olarak elde edilirler ve üretim ortamlarında dönüşmeden kalan substrat, inorganik tuzlar ve yan ürünlerden ayrılması gerekmektedir. Ayırma, genellikle deriştirme ve kristalizasyon gibi adımları içermektedir ve üretim masraflarının % 50'si kadar olabilmektedir (Eyal ve Bressler, 1993).

Amino asitleri ayırma yöntemlerinden sıvı-sıvı ekstraksiyonu, çözeltiler seyreltik olduğundan uygun olmamaktadır. Klasik iyon değıştırme ve diğer yöntemler ise önemli yatırım gerektirmektedir (Boyadzhiev ve Atanassova, 1991). Son yıllarda ters misel sistemler, amino asitleri ve proteinleri, seyreltik çözeltilerinden ayırmakta sıkça kullanılan ve diğer yöntemlere alternatif bir ayırma yöntemi olarak dikkat çekmektedir. Ters misel sistemler, seçicilik, esneklik, az işlem basamakları içermesi ve düşük enerji tüketimi gibi avantajlara sahip olduğundan özellikle biyokimyasal proseslerde tercih edilen bir ayırma prosesidir (Thien ve Hatton, 1988).

Apolar bir çözücü içinde, nanometre büyüklüğünde dağılmış yüzey aktif madde küreciklerine ters misel denir. Bu küresel yapıların içi sulu mikro havuz içerir ve polar olan amino asit, enzim, protein gibi maddeleri çözer. Bu sulu mikro havuz biyoaktif maddelerin denatüre olmadan çözünmesine ve doğal yapısını korumasına izin verir. Ters misel sistemlerle ayırma, yüklü bileşikler haline gelebilen maddeler için daha uygundur. Bu yöntemle ayırmada, elektrostatik kuvvetler etkindir ve ayırmayı yüzey aktif maddeler sağlarlar (Krei

ve Hustedt, 1992). Yüzey aktif maddeler, anyonik, katyonik ve non-iyonik tipte olabilmektedirler. Yüzey aktif maddenin seçimi, ayırmak istenen amino asit veya proteinin özellikleri dikkate alınarak yapılmaktadır. Amino asitler veya proteinler izoelektrik noktalarından düşük pH' larda katyonik, yüksek pH' larda anyonik, izoelektrik noktalarında ise nötral özellik göstermektedir. Amino asitler, Aerosol OT (AOT) gibi anyonik yüzey aktif maddelerle düşük pH' larda ayrılırken, aliquidat-336 gibi katyonik yüzey aktif maddelerle yüksek pH' larda ayrılırlar. Bazı yüzey aktif maddeler (aliquidat-336, dodmac vb.) kararlı bir ters misel sistemi oluşturabilmek için eş yüzey aktif maddeye (hekzanol, 1-dekanol vb.) ihtiyaç duymaktadır. Eş yüzey aktif maddeler, amino asitlerin veya proteinlerin ters misel fazına ilgisini artırırken, sistemin kararlılığını sağlamaktadırlar (Boyadzhiev ve Atanassova, 1991; Ichikawa, 1992; Hossain, 2000).

Luisi v.d., (1979), triptofanın, katyonik bir yüzey aktif madde olan aliquidat-336 ile ekstraksiyonuna elektrostatik etkileşimlerin etkisini incelemiştir. Yüksek pH değerlerinde negatif yüke sahip triptofanın % 90' unı ekstrakte etmişlerdir. Triptofan nötral halde iken aliquidat-336 ile arasındaki elektrostatik etkileşimler azaldığından dolayı % 10'unun ekstrakte edildiğini belirtmişlerdir. Nishiki v.d., (2000), AOT/izooktan ters misel sisteminde fenilalanin ekstraksiyonunu pH 1.4-2.3 aralığında incelemiştir. AOT anyonik bir yüzey aktif madde olduğundan, pH'nın 1.4'e azalmasıyla pozitif yükle yüklenen fenilalaninin, ekstraksiyon verimi artmıştır. Sulu fazdaki başlangıç fenilalanin derişimi azaldığında ve ters misel fazındaki AOT derişimi arttığında ekstraksiyonun arttığını belirtmişlerdir. Liu v.d., (2004), fermentasyonla üretilen nattokinaz enziminin AOT/izooktan sisteminde ayrılmasını incelemiştir. Ekstraksiyonun, elektrostatik etkileşimlerle yürüdüğü ve dengeye ulaşma süresinin 8 dakika olduğunu belirtmişlerdir. İncelenen pH aralığında ortamın pH' sı 5'den 9'a çıkarıldığında ekstraksiyonun azaldığı ve AOT derişimi arttıkça enzim kazanımının arttığı belirtilmiştir. Maksimum ekstraksiyon verimine (% 50), pH 5'te ulaşmışlardır. Boyadzhiev ve Atanassova (1991) L-lisinin sulu seyreltik çözeltilerinden, anyonik bir yüzey aktif madde olan di-2etilhekzilfosforik asit (D2EHPA) ve apolar çözücü olarak n-dekan kullanarak ayrılmasını incelemiştir. Lisinin, katyonik formda olduğu pH 8.95 (pK<sub>1</sub>) değerinde, D2EHPA ile ayrılmasının uygun olduğunu belirtmişlerdir. Cardo-

so v.d., (1999), aliquid-336/hekzanol/n-heptan ters misel sisteminde hidrofilik, az hidrofobik ve hidrofobik yapıya sahip olan amino asitlerden sırasıyla L-aspartik asit, fenilalanin ve triptofanın ekstraksiyonunu incelemişlerdir. Ekstraksiyona, yük ve amino asit türünün etkisini incelemek amacıyla, ortam pH'sını değiştirerek amino asitlerin net yükünü 0'dan -1'e değiştirmişler ve L-aspartik asit için % 0'dan % 2'ye, fenilalanin için % 4'den % 45'e ve triptofan için % 20'den % 80'e artış olduğunu belirtmişlerdir. Aydoğan ve ark. (2007), L-aspartik asit üretimini *Escherichia coli* (ATCC 11303) mikroorganizmasını kullanarak biyotransformasyonla gerçekleştirmiş ve üretim ortamındaki L-aspartik asitin, aliquid-336/1-dekanol/izooktan ters misel sistemiyle ekstraksiyonunu incelemişlerdir. Mikro enjeksiyon ile ters misel fazına hapsedilen L-aspartik asiti % 55 verimle elde etmişlerdir. Dövyap v.d., (2006), sulu fazdaki L-isolösinin, aliquid-336/1-dekanol/izooktan ters misel sistemi ile ayrılmasını incelemişlerdir. Sulu fazda 5 mM L-isolösinin derişimi için pH 12'de 100 rpm karıştırma hızında, 200 mM aliquid-336 derişiminde % 82 ekstraksiyon verimine ulaşmışlardır.

Bu çalışmada, hidrofilik yapıda bir amino asit olan L-aspartik asitin, yeni bir ayırma yöntemi olan ters misel sistemlerle ekstraksiyonu incelenmiştir. Burada, yüzey aktif madde olarak; aliquid-336, eş yüzey aktif madde olarak; 1-dekanol ve apolar çözücü olarak; izooktandan oluşan organik faz kullanılmış ve L-aspartik asit ekstraksiyonunu etkileyen parametreler incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen bilgiler, hidrofilik yapıdaki tüm amino asit, enzim ve proteinlerin saflaştırılması için bilgi kaynağı olacaktır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2. 1. Kimyasallar

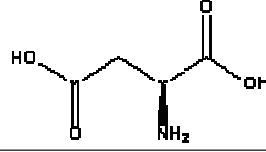
Bu çalışmada kullanılan, model amino asit, L-aspartik asit (A-9256) ve yüzey aktif madde, aliquid-336 (A-20,561-3) Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)'den, eş yüzey aktif madde, 1-dekanol (M-803463), apolar çözücü, izooktan (M-104727) ve sulu fazın pH'sını ayarlamakta kullanılan NaOH

(M-106462) Merck (Darmstadt, Germany)'den satın alınmıştır.

### 2. 2. L-Aspartik Asit Ekstraksiyonu

L-aspartik asit esansiyel olmayan, hidrofilik yapıda, asidik karakterli bir amino asittir. Yapısında bir amin, iki karboksilik asit grubu bulunur. L-aspartik asitin özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

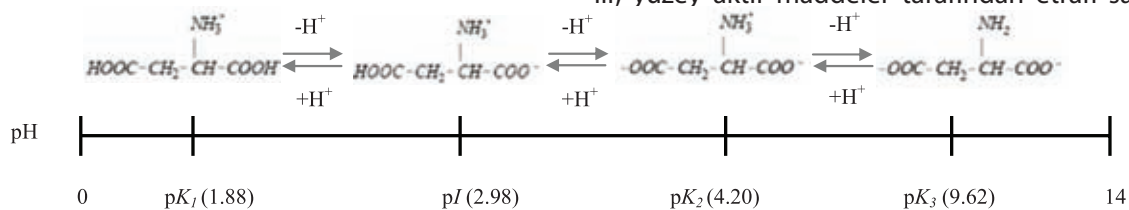
**Tablo 1. L-Aspartik asitin özellikleri (Kirk, ve Othmer, 1992).**

Sistemik adı	2-aminobütandioik asit
Açık Formülü	
Kapalı Formülü	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>
Görünümü	Beyaz Kristal
Molekül Ağırlığı	133.1 g/mol
Erime Noktası	271 °C
İzoelektrik Nokta	2.98
pK <sub>1</sub>	1.88
pK <sub>2</sub>	4.20
pK <sub>3</sub>	9.62

Sulu fazda bulunan L-aspartik asitin ekstraksiyonu için, ters misel sistemi olarak aliquid-336/1-dekanol/izooktan kullanılmıştır. Aliquid-336, yüzey aktif madde, 1-dekanol, eş yüzey aktif madde ve izooktan, apolar çözücüdür. Sulu faz, L-aspartik asitin belli derişimlerde hazırlanan çözeltisi olup, pH'ı 10 N NaOH ile ayarlanmıştır.

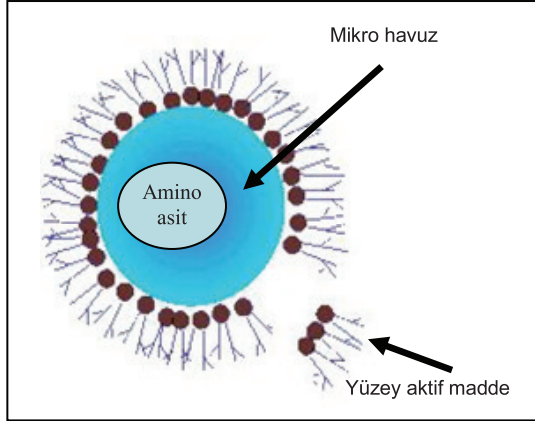
Ters misellerle ekstraksiyonda yürütücü kuvvet, L-aspartik asit ile yüzey aktif madde arasındaki elektrostatik etkileşimlerdir. Aliquid-336, katyonik yapıda bir yüzey aktif madde olduğundan, sulu fazdaki L-aspartik asit'in ekstrakte olabilmesi için anyonik yapıda olması gerekmektedir. Sulu fazdaki L-aspartik asit'in net yükünün pH'ya bağlılığı Şekil 1'de gösterilmiştir (Garcia v.d., 1999).

Şekil 1'den görüldüğü gibi L-aspartik asit, pK<sub>3</sub> (9.62)'den sonra tamamen negatif yükü yüklenmekte ve yüzey aktif madde ile arasındaki etkileşimler en kuvvetli olarak bu değerden sonra olmaktadır. Sulu fazdaki L-aspartik asit, elektrostatik etkileşimlerle su-organik faz ara yüzeyine gelir, yüzey aktif maddeler tarafından etrafı sarılır



**Şekil 1. L-aspartik asit yükünün pH'ya bağlılığı.**

ve ters misel küreciklerinin mikro havuzunda çözünür böylece ters misel fazına ekstrakte edilmiş olur (Şekil 2).



Şekil 2. Ters misel sistemi diyagramı.

Ters misel ile L-aspartik asit' in ekstraksiyonu, amino asitin negatif yüklü olduğu pH değerlerinde ( $pH > pK_3$ ), sulu faz (SF= 20 mL) ve ters misel fazı (TF= 20 mL) içeren, 100 ml hacimli erlenlerde, 30 °C (T) sıcaklıkta, 150 rpm (N) karıştırma hızında orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon sonunda karışım, 9500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve fazlar ayrılmıştır. Sulu fazın pH' sı pH metre ile ölçülmüş ve denge pH' sı, ekstraksiyon öncesi pH değeri ile aynı bulunmuştur. Sulu fazda kalan L-aspartik asit derişimi HPLC analizi ile ters misel fazındaki L-aspartik asit derişimi ise kütle dengesinden belirlenmiştir. Ekstraksiyon verimi (Y) ve dağılıma katsayısı ( $K_D$ ) aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

% Ekstraksiyon verimi (Y)

$$Y = \frac{C_{Lo} - C_L}{C_{Lo}} \times 100$$

$$\text{Dağılıma katsayısı } (K_D) = \frac{C_{Lo} - C_L}{C_L}$$

Burada;

$C_{Lo}$  : Başlangıçta sulu fazdaki L-aspartik asit derişimi (mM),

$C_L$  : Ekstraksiyon sonunda sulu fazdaki L-aspartik asit derişimi (mM),

### 2. 3. Analiz

Ekstraksiyon sonucu sulu fazda kalan L-aspartik asit derişimi HPLC ile analizlenmiştir. Örnekler, OPA Labeling yöntemi ile ön türevlendirilmiştir (Roth, 1971). Bu yöntemle göre pH sı 9.5'e ayarlanan 90 mL sodyum tetraborat tamponu (0.05 M), 1.5 mL o-ftalaldehit (10 mg/mL etanol) çözeltisi ve 1.5 mL 2-merkaptotanol (5 µL/mL etanol) çözeltisi ile karıştırılır. Bu tampon çözelti oda sı-

caklığında 2 saat kararlı kalabilmektedir. 100 µL L-aspartik asit çözeltisi, 3 mL tampon çözelti ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 3 dakika türevlendirildikten sonra Tablo 2'de verilen koşullarda analizlenmiştir.

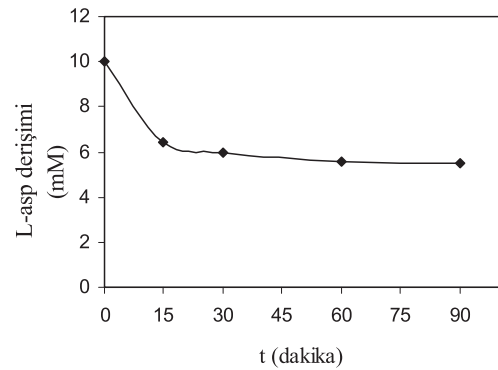
Tablo 2. HPLC analiz koşulları.

Cihaz	Thermo Finnigan Spectra
Kolon	Nucleosil C18
Kolon sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Çözücü Sistemi	A: Methanol B: Tetrahidrofuran(% 0.005 v/v) – Metanol(% 0.095 v/v) – 0.1 M Sodyum Asetat( % 0.9 v/v)
Akış hızı	1 mL/dak
Dedektör	UV
Dalga boyu	340 nm

## 3. SONUÇLAR

### 3. 1. Ekstraksiyon Süresinin Belirlenmesi

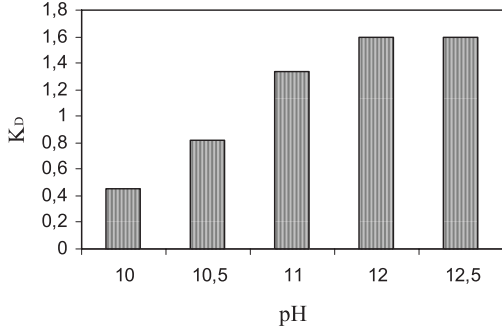
Ters misel sistemlerinde ekstraksiyonun dengeye ulaşma süresi belirlenmelidir. Aliquat-336/1-dekanol/izooktan ters misel sisteminde L-aspartik asitin, dengeye ulaşma süresi incelenmiştir. Sulu fazdan alınan örnekler analizlenmiş ve 15 dakikadan sonra L-aspartik asit derişiminde önemli bir azalma olmadığı belirlenmiştir. Şekil 3'den görüldüğü gibi L-aspartik asit için dengeye ulaşma süresinin 15 dakika olduğu bulunmuştur.



Şekil 3. L-aspartik asit derişiminin zamanla değişimi (T=30 °C, pH=10.5, N=150 rpm, TF= 200 mM aliquat-336, % 20 v/v 1-dekanol, izooktan).

### 3. 2. Ekstraksiyona pH Etkisi

Ters misellerle ekstraksiyonda yürütücü kuvvet, elektrostatik etkileşimler olduğundan ortam pH' sı ekstraksiyon verimini ve dağılıma katsayısını oldukça fazla etkilemektedir. Aliquat-336, katyonik bir yüzey aktif madde olduğundan, L-aspartik asitin, zıt yüke sahip olduğu yüksek pH larda (bkz. Şekil 1) deneyler gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 4. pH'nın dağılma katsayısına etkisi** ( $C_{L_0} = 10$  mM,  $T=30$  °C,  $N=150$  rpm,  $TF=200$  mM Aliquat-336, % 20 v/v 1-dekanol, izooktan).

Şekil 4'den görüldüğü gibi pH arttıkça,  $K_D$  değeri yaklaşık 3.5 kat artmıştır. Ortam pH'ı arttıkça, L-aspartik asit'in negatif net yükü artar ve pH 12'de en yüksek değeri olan -2'ye ulaşır (Garcia v.d., 1999). Bundan dolayı pH 12'ye kadar dağılma katsayısı artmış, daha sonra net yükteki değişim sabitlenince dağılma katsayısında artış görülmemiştir. Literatürdeki çalışmalardan da görüldüğü gibi hedef madde ile yüzey aktif madde arasındaki net yük farkı arttıkça ekstraksiyon verimi artmaktadır (Boyadzhiev ve Atanassova, 1991; Luisi v.d., 1979; Nishiki v.d., 2000; Cardoso v.d., 1999; Dövyap v.d., 2006). Bu çalışmada 10 mM başlangıç amino asit derişimi için, Aliquat-336/1-dekanol/izooktan sisteminde pH 12'de ekstraksiyon verimi % 62, dağılma katsayısı 1.60 elde edilmiştir.

### 3. 3. Ekstraksiyona Başlangıç L-aspartik Asit Derişiminin Etkisi

Fermentasyonla üretilen L-aspartik asit ve diğer bir çok amino asit, sulu çözeltilerinde seyreltik olarak elde edilirler. Bu yüzden ters misel sistemleri seyreltik çözeltilerden biyoaktif maddelerin ayrılmasında etkili bir yöntemdir (Garcia v.d., 1999). Tablo 3'den, L-aspartik asit derişiminin artmasıyla dağılma katsayısının ve ekstraksiyon veriminin azaldığı görülmektedir.

**Tablo 3. Ekstraksiyona başlangıç L-aspartik asit derişiminin etkisi** ( $pH=12$ ,  $T=30$  °C,  $N=150$  rpm,  $TF=200$  mM Aliquat-336, % 20 v/v 1-dekanol, izooktan).

$C_{L_0}$ , mM	$K_D$	% Y
5	2.04	68
8	1.82	65
10	1.60	62
20	1.24	55
200	0.26	21

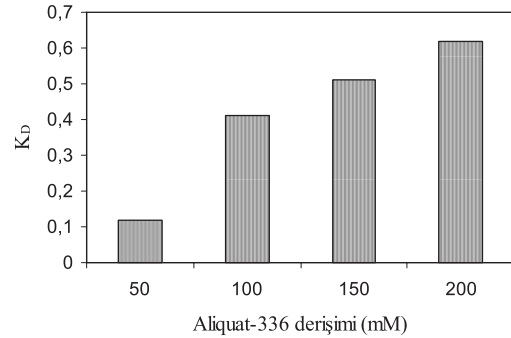
Ters misel fazındaki yüzey aktif maddeler amino asit moleküllerini içlerine hapsederek doygunlu-

ğa ulaşmaktadır dolayısıyla başlangıç L-aspartik asit derişiminin artmasıyla dağılma katsayısı ve ekstraksiyon verimi azalmıştır. En yüksek dağılma katsayısı ve ekstraksiyon verimi, 5 mM amino asit derişiminde sırasıyla 2.04 ve % 68 bulunmuştur. Literatürdeki diğer çalışmalar da düşük amino asit derişimlerinde (5-10 mM) gerçekleştirilmiştir (Boyadzhiev ve Atanassova, 1991; Luisi v.d., 1979; Nishiki v.d., 2000; Dövyap v.d., 2006). Buradan ters misel sistemlerin seyreltik sistemler için daha uygun olduğu görülmektedir.

### 3. 4. Ekstraksiyona Yüzey Aktif Madde Derişiminin Etkisi

Ters misel sistemlerde ayırmayı sağlayan yüzey aktif madde derişiminin artması ekstraksiyon verimini artırmaktadır. Aliquat-336 derişiminin ekstraksiyona etkisini incelemek için 50, 100, 150 ve 200 mM derişimlerinde deneyler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 5'den görüldüğü gibi ters misel fazındaki yüzey aktif madde derişiminin artması ara yüzeydeki ters misellerin sayısını artırdığından organik faza ekstrakte olan L-aspartik asit miktarı artmıştır. Burada Aliquat-336 derişimi 50 mM'dan 200 mM arttıkça, dağılma katsayısı yaklaşık 5 kat artmıştır.



**Şekil 5. Yüzey aktif madde derişiminin dağılma katsayısına etkisi** ( $C_{L_0}=20$  mM,  $T=30$  °C,  $pH=10.5$ ,  $N=150$  rpm,  $TF=$ Aliquat-336, % 20 v/v 1-dekanol, izooktan).

## 4. TARTIŞMA

Amino asitler proteinlerin yapı taşlarıdır ve canlı organizmalarda özel biyofiziksel fonksiyonların kontrol edilmesinde bilgi taşıma kapasitelerine sahiptirler. Ayrıca gıda, tıp ve farmasötik alanlarında geniş kullanım alanları vardır. Amino asitler kimyasal sentez, enzimatik veya fermentasyonla üretilmektedir. Fermentasyonla üretimlerinde amino asitler ekonomik olarak elde edilmektedir ve son yıllarda, doğal olarak üretime talebin artmasından dolayı, fermentasyonla üretim giderek önem kazanmaktadır (Kirk ve Othmer, 1992).

Ancak fermentasyonla üretimde amino asitler sulu çözeltilerinde seyreltik olarak elde edilirler. Bu yüzden amino asitlerin ve diğer biyoaktif maddelerin (enzim, protein, DNA vb.) fermentasyon ortamından ayrılması ve saflaştırılması için ters misel sistemi kullanımı konvansiyonel proseslere alternatif olarak gelişmektedir (Aydoğan v.d., 2007; Goto v.d., 1997).

Bu çalışmada, farmasötik kimya, deterjan, gıda sanayiinde ve tarımda geniş kullanım alanına sahip bir amino asit olan L-aspartik asitin, alikuat-336/1-dekanol/izooktan ters misel sistemi ile ayrılması gerçekleştirilmiştir. Ters misel sistemi olarak katyonik özellik gösteren, bir yüzey aktif madde (aliquat-336) seçilmiştir. Ters misellerle ayırma, elektrostatik kuvvetlerle gerçekleşmektedir. Literatürde, amino asitlerin veya enzimlerin net yükleri, yüzey aktif madde ile zıt yüke sahip olduğunda ekstraksiyonun gerçekleştiği belirtilmiştir (Garcia v.d., 1999). Aliquat-336 daima pozitif yük taşıdığı için, L-aspartik asitin sulu çözeltideki iyonik dengelerinden yararlanarak (bkz Şekil 1), yapısındaki protonları tamamen kaybettiği ve negatif yüke sahip olduğ u pH değerlerinde çalışılmıştır. L-aspartik asitin bu yüzey aktif madde ile ekstrakte edilebilmesi için en uygun pH değerinin 12 olduğ u bulunmuştur. Cardoso v.d., (1999), alikuat-336/hekzanol/n-heptan sisteminde pH 12'de 150 mM başlangıç derişimindeki L-aspartik asitin % 20 sini ekstrakte edebilmişlerdir. Literatürdeki, ters misel sistemler, daha çok seyreltik sis-

temlere uygulandığından (Boyadzhiev ve Atanassova,, 1991; Luisi v.d., 1979; Nishiki v.d., 2000; Dövyap v.d., 2006) Cardoso vd. ekstraksiyon verimini düşük bulmuşlardır. Bu çalışmada da başlangıç L-aspartik asit derişiminin ekstraksiyona etkisi incelenmiş ve amino asit derişimi arttığında, dağılma katsayısının azaldığı ve 5 mM L-aspartik asit derişiminde 2.04 iken, 200 mM derişiminde ise 0.26 olduğ u bulunmuştur. L-aspartik asit için ekstraksiyon denge süresi, Cardoso v.d., (1999) nin çalışmalarındaki gibi 15 dakika bulunmuştur. Ters misel fazındaki yüzey aktif madde derişiminin artması, ters misellerin sayısını arttırdığından ekstraksiyon verimini ve dağılma katsayısını artırmaktadır. Yüzey aktif madde derişiminin 4 kat artması dağılma katsayısında 5 kat artışa neden olmuştur.

Sonuç olarak, 200 mM alikuat-336/1-dekanol (% 20 v/v)/izooktan ters misel sistemi ile pH 12'de 5 mM başlangıç amino asit derişiminde % 68 ekstraksiyon verimine ulaşılmıştır. L-aspartik asit için alikuat-336/1-dekanol/izooktan ters misel sisteminde elde edilen bu bilgiler hidrofilik yapıdaki diğer biyoaktif maddelerin seyreltik çözeltilerinden kazanılmasına yardımcı olacaktır.

## 5. TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı mali yönden destekleyen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü' ne (41-nolu proje) teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Aydoğan, Ö., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü., Parlaktuna, M. and Mehmetoğlu, T. 2007. Production of L-aspartic acid by biotransformation and recovery using reverse micelle and gas hydrate methods, Biocatalysis and Biotransformation. 25 (5), 365-372.
- Boyadzhiev, L. and Atanassova, I. 1991. Recovery of L-lysine from dilute water solutions by Liquid Pertraction, Biotechnol. Bioeng. (38), 1059-1064.
- Cardoso, M. M., Barradas, M. J., Kroner, K. H. and Crespo, J. G. 1999. Amino acid solubilization in cationic reversed micelles: factors affecting amino acid and water transfer, J. Chem. Technol. Biotechnol. (74), 801-811.
- Chao, Y.P., Lo, T.E. and Luo, N.S. 2000. Selective Production of L-aspartic acid and l-phenylalanine by coupling reactions of aspartase and aminotransferase in *Escherichia coli*, Enzyme and Microbial Technology. (27), 19-25.
- Chibata, I., Tosa, T. and Sato, T. 1974. Immobilized aspartase-containing microbial cells: Preparation and Enzymatic Properties, Applied Microbiology. (27), 878-885.
- Dövyap, Z., Bayraktar, E. and Mehmetoğlu, Ü. 2006. Amino acid extraction and mass transfer rate in the reverse micelle system, enzyme and Microbial Technology. (38), 557-562.
- Eyal, A. M. and Bressler, E. 1993. Industrial Separation of carboxylic and amino acids by liquid membranes: Applicability. Process Considerations, and Potential Advantages, Biotechnol Bioeng. (41), 287-295.
- Fusee, M.C., Swann, W.E. and Calton, G.J. 1981. Immobilization of *Escherichia coli* Cells Containing aspartase activity with polyurethane and its application for L-aspartic Acid Production. Applied and Environmental Microbiology. (42), 672-676.

- Garcia, A.A., Bonen, M.R., Vick, J.R., Sadaka, M. and Vuppu, A. 1999. Bioseparation Process Science. Blackwell Science, Inc.
- Goto, M., Ishikawa, Y., Ono, T., Nakashio, F. and Hatton, T.A. 1997. Extraction and activity of chymotrypsin using AOT-DOLPA mixed micellar systems, *Biotechnol. Prog.* (14), 729-734.
- Hossain, M. M. 2000. Mass transfer studies of amino acids and dipeptides in AOT-oleyl alcohol solution using a hollow fiber module. *Separation and Purification Technology.* (189), 71-83.
- Ichikawa, S., Imai, M. and Shimizu, M. 1992. Solubilizing Water Involved in Protein Extraction Using Reverse Micelles, *Biotechnol. Bioeng.* (39), 20-26.
- Kirk, R.E. and Othmer, D.F. 1992. *Encyclopedia of Chemical Technology*, New York: Wiley. Cilt 2.
- Krei, G.A. and Hustedt, H. 1992. Extraction of enzymes by reverse micelles, *Chem. Eng.Sci.* 47 (1), 99-111.
- Liu, J.G., Xing, J.M., Shen, R., Yang, C.L. and Liu, H.Z. 2004. Reverse micelles extraction of nattokinase from fermentation broth, *Biochemical Engineering Journal.* (21), 273-278.
- Luisi, P.L., Bonner F.J., Pelligrini, A., Wiget, P. and Wolf, R. 1979. Micellar solubilization of proteins in aprotic solvents and their spectroscopic characterisation. *Helv Chim Acta.* (62), 740-753.
- Nishiki, T., Nakamura, K. and Kato, D. 2000. Forward and backward extraction rates of amino Acid in Reversed Micellar Extraction". *Biochemical Engineering Journal.* (4), 189-195.
- Pamuk, F. 2000. *Biyokimya*, Gazi Kitabevi, Ankara.
- Roth, M. 1971. Fluorescence Reaction For Amino Acids, *Analytical Chemistry.* (43), 880-882.
- Sato, T., Nishida, Y., Tosa, T. and Chibata, I. 1979. Immobilization of escherichia coli cells containing aspartase activity with  $\kappa$ -carrageenan enzymic Properties and Application for L-aspartic Acid Production. *Biochimica et Biophysica Acta.* (570), 179-186.
- Sato, T. and Tosa, T. 1993. Production of L-Aspartic Acid. In: Tanaka A, Tosa T, Kobayashi T, editors. *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts.* Marcel Dekker, Inc New York. 15-24.
- Thien, M.P. and Hatton, T.A. 1988. Liquid emulsion membranes and their applications in biochemical processing. *Separation Science and Technology.* 23 (8-9) 819-853.
- Tosa, T., Sato, T., Mori, T. and Chibata, I. 1974. Basic studies for continuous production of L-aspartic acid by immobilized *Escherichia coli* Cells. *Applied Microbiology.* (27), 886-889.