

Extracția și transportul aminoacizilor cu caracter bazic prin membrane lichide

ALEXANDRA-CRISTINA BLAGA¹, ANCA-IRINA GALACTION², DAN CA³CAVAL^{1*}

¹ Universitatea Tehnică "Gh. Asachi" Iași, Facultatea de Inginerie Chimică, Dept. Inginerie Biochimică, Bdul. D. Mangeron, Nr. 71, 700050 Iași, România

² Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr.T. Popa" Iași, Facultatea de Bioinginerie Medicală, Dept. Biotehnologii Medicale, Str. Universității Nr. 16, 700115 Iași, România

This study is focused on facilitated extraction and transport through liquid membranes of some basic amino acids (L-arginine, L-lysine, L-histidine) with D2EHPA dissolved in dichloromethane. The results indicated the significant influences of the pH-gradient between the aqueous phases, carrier concentration and mixing intensity. The maximum mass flows and permeability factors of the amino acids through liquid membrane can be reached at the pH-value of the feed solution of 3, pH-value of the stripping solution of 1, D2EHPA concentration in solvent layer of 60 g/l, using an intense mixing of the two aqueous phases. By modifying the pH-gradient between the aqueous phases, the selective pertraction of the considered amino acids could be possible.

Keywords: pertraction, liquid membrane, amino acid, L-arginine, L-lysine, L-histidine, carrier, di-(2-ethylhexyl) phosphoric acid, mass flow, permeability factor

Biotehnologia a progresat considerabil în ultimii ani, reprezentând astăzi modalitatea principală de obținere a unor produși importanți pentru activitatea umană. În acest context, producția aminoacizilor, elementele structurale de bază ale peptidelor, proteinelor și enzimelor, constituie una dintre direcțiile prioritare de dezvoltare ale proceselor biotehnologice.

Aminoacizii pot fi obținuți prin biosinteză, prin hidroliza proteinelor sau prin extracție din surse naturale. Cele mai eficiente metode sunt primele două, însă separarea acestor compuși din lichidele de fermentație sau din hidrolizatele proteice este dificilă. În general, procedeele utilizate pentru separarea și purificarea aminoacizilor includ tehnicile cromatografice, absorbția/adsorbția, schimbul ionic, cristalizarea la punctul izoelectric [1]. Însă aceste tehnici sunt dificil de aplicat la scară industrială, ceea ce limitează producerea aminoacizilor și mărește costul tehnologiei respective.

Separarea aminoacizilor prin extracție lichid-lichid suscită din ce în ce mai mult atenția cercetătorilor în domeniu, procedeele oferind o alternativă viabilă pentru tehnicile aplicate curent în acest scop. Deoarece aminoacizii disociază în soluții apoase, formând specii ionice caracteristice în funcție de valoarea pH-ului, solubilitatea lor în solvenți organici este foarte redusă. Din acest motiv, extracția aminoacizilor este posibilă numai prin adăugarea în faza organică a unor extractanți din categoria derivaților organofosforici [1-5], a aminelor cu masă moleculară ridicată [6,7] sau a eterilor-coroană [1, 8, 9].

Extracția și transportul prin membrane lichide, tehnică denumită și pertracție, reprezintă o dezvoltare a extracției lichid-lichid, putând fi aplicată pentru separarea unei game largi de compuși obținuți prin biosinteză (antibiotice, acizi carboxilici, vitamine etc.). Pertracția poate fi, de asemenea, utilizată pentru separarea aminoacizilor, în acest sens folosindu-se membranele lichide obținute prin emulsionare [10-12] sau cele incluse în matrici polimere

poroase [13-15]. Stabilitatea acestor două tipuri de membrane lichide este relativ redusă, motiv pentru care s-a studiat posibilitatea separării aminoacizilor prin membrane lichide libere, care nu necesită adăugarea unor agenți tensioactivi pentru stabilizare sau includerea în suporturi solide poroase sau fibroase [1,16,17].

Studiile anterioare ale colectivului au fost direcționate pe separarea unor aminoacizi cu caracter acid (acizii L-aspartic și L-glutamic) și neutru (L-cisteină, L-triptofan, L-glicină și L-alanină) prin extracție și transport prin membrane lichide libere constituite din diclormetan și acid di-(2-etilhexil) fosforic (D2EHPA) ca agent purtător [16,17]. Aceste experimente sunt continuate prin analiza pertracției unor aminoacizi cu caracter bazic (L-histidina, L-lizina și L-arginina) în condiții similare cu cele anterioare, în scopul stabilirii condițiilor optime de separare selectivă a aminoacizilor din lichidele de fermentație sau din hidrolizatele proteice utilizând această tehnică.

Partea experimentală

Cercetările experimentale s-au efectuat folosindu-se o instalație de pertracție originală care permite obținerea și menținerea cu ușurință a stratului de solvent între cele două soluții apoase [18]. Caracteristicile tehnice și funcționale ale echipamentului experimental au fost prezentate în detaliu în lucrările anterioare [16,19].

Soluțiile apoase au fost amestecate independent cu câte un agitator cu doua palete, turajia variind între 200 și 600 rpm. Pentru accelerarea fluxului masic prin membrana lichidă, aceasta a fost amestecată cu un agitator identic, cu o turajie constantă de 500 rpm.

Membrana lichidă a fost alcătuită din diclormetan în care a fost dizolvat agentul purtător D2EHPA. Concentrația agentului purtător a variat între 20 și 100 g/L.

Faza apoasă inițială a constat din soluții cu concentrația de 3 g/l ale aminoacizilor L-histidină, L-lizina, respectiv L-arginină. Faza apoasă finală a fost alcătuită din soluții de acid clorhidric de diferite valori ale pH-ului.

* email: dancasca@ch.tuiasi.ro

pH-ul fazei apoase inițiale a variat între 2 și 6, corectarea sa la valorile prestabilite în programul experimental realizându-se cu o soluție 4% acid sulfuric. pH-ul fazei apoase finale a fost cuprins între 1 și 5, fiind ajustat cu o soluție 4% acid clorhidric. În ambele cazuri, corectarea valorii pH-ului s-a efectuat pe baza indicațiilor unui pH-metru digital de tip Consort C831. În timpul experimentelor nu s-a observat modificarea pH-ului celor două faze apoase.

Evoluția procesului s-a urmărit prin intermediul fluxurilor masice inițiale și finale ale aminoacizilor și ai factorului de permeabilitate prin membrana lichidă. Fluxul masic inițial, n_i , reprezintă fluxul de solut transferat dinspre faza apoasă inițială spre stratul de solvent organic, iar fluxul masic final, n_f , denumit și flux masic total, reprezintă fluxul masic transferat dinspre solventul organic spre faza apoasă finală. Factorul de permeabilitate, P , reprezintă o măsură a capacității de transport a solutului prin membrana lichidă și se definește ca raportul dintre fluxul masic final și fluxul masic inițial [20].

Fluxurile masice ale aminoacizilor, respectiv factorii de permeabilitate, s-au calculat prin dozarea concentrației acestor compuși din soluția inițială și din rafinat și efectuarea bilanșului de masă al solutului în sistemul de extracție. Dozarea aminoacizilor s-a realizat prin tehnica HPLC, utilizându-se un cromatograf de tipul HP 1090.

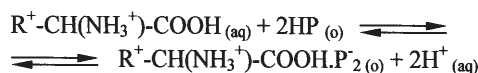
Rezultate și discuții

Extracția și transportul prin membrane lichide este influențată semnificativ de gradientul de pH dintre fazele apoase, de concentrația agentului purtător în membrană și de intensitatea amestecării celor trei faze. În cazul separării aminoacizilor, influența gradientului de pH este

amplificată de ionizarea acestor compuși în cele două soluții apoase și controlează eficiența extracției-reextracției, precum și viteza de transport prin membrana lichidă.

Astfel, din figura 1 se constată că fluxurile masice ale tuturor aminoacizilor studiați cresc cu creșterea pH-ului fazei apoase inițiale, pH_i , ating un maxim pentru $pH_i = 3$, scăzând apoi.

Această variație este consecința mecanismului extracției reactive a aminoacizilor, care se bazează pe o reacție de schimb ionic cu D2EHPA la interfața de separare dintre faza apoasă inițială și stratul de diclormetan, proces controlat de pH-ul soluției apoase. Conform mecanismului stabilit anterior [4], agentul purtător reacționează numai cu aminoacizii existenți în soluția apoasă sub formă cationică, deci la un pH mai mic decât pH-ul punctului izoelectric. În aceste condiții, reacția interfacială dintre aminoacizii cu caracter bazic și D2EHPA (simbolizat HP) poate fi descrisă de următoarea expresie generală:



(R^+ - radicalul aminoacidului în formă cationică).

Existența unui maxim al fluxurilor masice inițiale este rezultatul a două fenomene contrare care se produc odată cu creșterea valorii pH: creșterea concentrației formei active a agentului purtător, capabilă să reacționeze cu aminoacizii (un pH prea acid conduce la protonarea D2EHPA, acesta pierzându-și reactivitatea [4]), respectiv reducerea cantității totale de aminoacizi în formă cationică

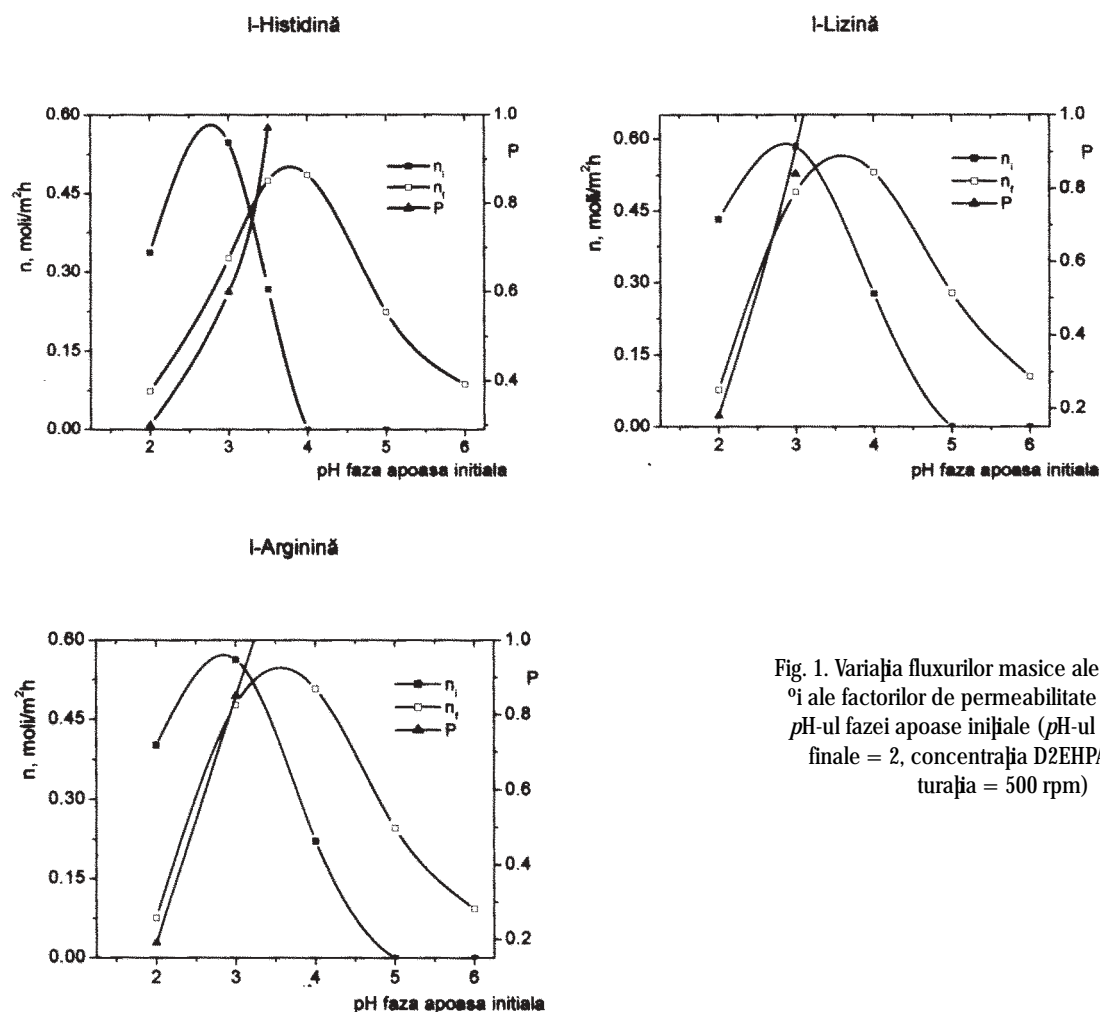


Fig. 1. Variația fluxurilor masice ale aminoacizilor și ale factorilor de permeabilitate în funcție de pH-ul fazei apoase inițiale (pH-ul fazei apoase finale = 2, concentrația D2EHPA = 40 g/L, turația = 500 rpm)

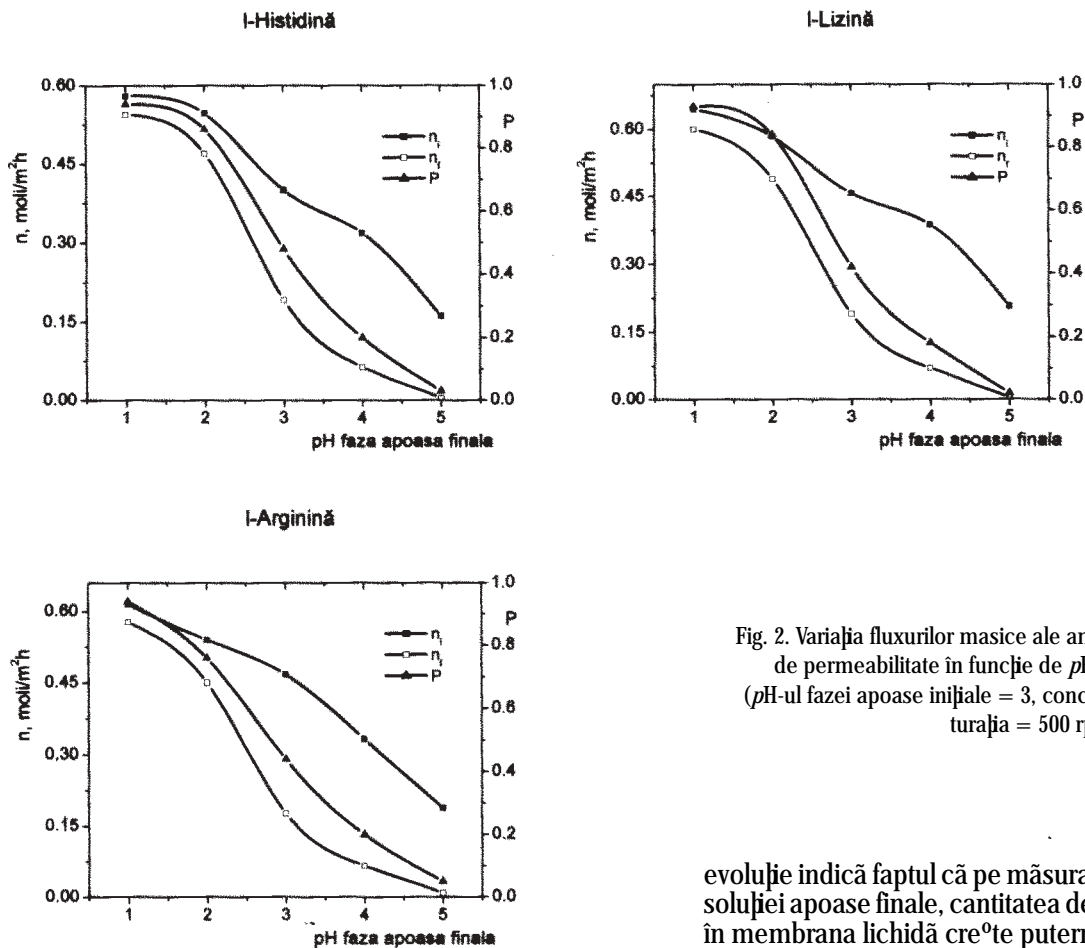


Fig. 2. Variația fluxurilor masice ale aminoacizilor și ale factorilor de permeabilitate în funcție de pH -ul fazei apoase finale (pH -ul fazei apoase inițiale = 3, concentrația D2EHPA = 40 g/L, turația = 500 rpm)

din faza apoasă. Creșterea suplimentară a pH -ului soluției apoase inițiale conduce inițial la apariția speciilor ionice ale aminoacizilor de tipul dication-anionilor, apoi a amfionilor, specii care nu sunt extrase în membrana organică. Din acest motiv, spre deosebire de aminoacizii cu caracter acid sau neutru, pertracția aminoacizilor bazici devine imposibilă chiar la valori ale pH -ului fazei apoase inițiale mult mai mici decât cele corespunzătoare punctelor izoelectrice (l-histidină: $pH_{iz} = 7,6$ [21], $n_i = 0$ pentru $pH_i = 4$; l-lizina: $pH_{iz} = 9,7$ [21], $n_i = 0$ pentru $pH_i = 5$; l-arginină: $pH_{iz} = 10,8$ [21], $n_i = 0$ pentru $pH_i = 5$).

Similar pertracției celorlalți aminoacizi studiați anterior [16,17], fluxurile masice finale ale aminoacizilor bazici cresc inițial cu pH , datorită acumulării acestora în membrana lichidă, și ating nivelul maxim pentru $pH_i = 4$. Aproximarea pH -ului de domeniul neutru determină reducerea fluxurilor masice, datorită inversării sensului gradientului de pH dintre soluțiile apoase, sens care controlează direcția de transfer a solutului prin membrana lichidă.

Factorul de permeabilitate are o evoluție particulară odată cu modificarea pH -ului fazei apoase inițiale, acest parametru crescând puternic odată cu apropierea de domeniul neutru de pH . Astfel, pentru $pH_i > 3$, P devine mai mare decât 1, ceea ce indică faptul că fluxul masic final depășește fluxul masic inițial. Acest fenomen se datorează reextracției cantităților suplimentare de aminoacizi acumulate în membrana lichidă în condițiile în care factorul de permeabilitate era subunitar.

Creșterea valorii pH -ului fazei apoase finale, pH_f , determină reducerea semnificativă a fluxurilor masice inițiale și finale ale celor trei aminoacizi studiați, aceeași variație fiind înregistrată și pentru factorul de permeabilitate (fig. 2). Valoarea maximă a factorului de permeabilitate, peste 0,9, se atinge pentru $pH_i = 1$. Această

evoluție indică faptul că pe măsura creșterii valorii pH -ului soluției apoase finale, cantitatea de aminoacizi acumulată în membrana lichidă crește puternic.

Un alt factor determinant al eficienței pertracției îl reprezintă concentrația agentului purtător în stratul de solvent organic. Conform rezultatelor experimentale prezentate grafic în figura 3, se constată intensificarea accentuată a fluxurilor masice ale aminoacizilor odată cu creșterea concentrației D2EHPA în diclorometan.

Creșterea fluxurilor masice este consecința, pe de o parte, a creșterii concentrației unuia dintre participanții la reacția chimică care se desfășoară la interfața de separare dintre faza apoasă inițială și solvent, iar pe de altă parte a acumulării în stratul organic a produsului interfacial.

Alura dependenței dintre factorii de permeabilitate și concentrația agentului purtător este diferită de cea menționată anterior, factorul de permeabilitate crescând inițial până la o concentrație a D2EHPA de 60 g/L, peste această valoare reducându-se. Evoluția acestui parametru sugerează o influență mai redusă a concentrației agentului purtător asupra fluxurilor masice finale ale aminoacizilor, comparativ cu influența sa asupra fluxurilor masice inițiale. Fenomenul s-ar putea explica printr-o rezistență cinetică superioară în cazul reextracției aminoacizilor din faza organică în faza apoasă finală, datorită faptului că la reacția interfacială pe care se bazează reextracția nu participă aminoacizii în stare liberă, ci sub formă de complex cu D2EHPA.

Astfel, similar aminoacizilor cu caracter acid sau neutru, în condițiile experimentale date, sistemul de pertracție atinge capacitatea maximă de transport a aminoacizilor bazici la o concentrație a agentului purtător de 60 g/L.

În cazul tuturor aminoacizilor considerați, mărirea turației fazelor apoase induce intensificarea fluxurilor masice inițiale și finale, evoluție înregistrată și de factorii de permeabilitate (fig. 4).

Alura dependențelor obținute sugerează faptul că procesul de separare prin pertracție poate fi controlat fie

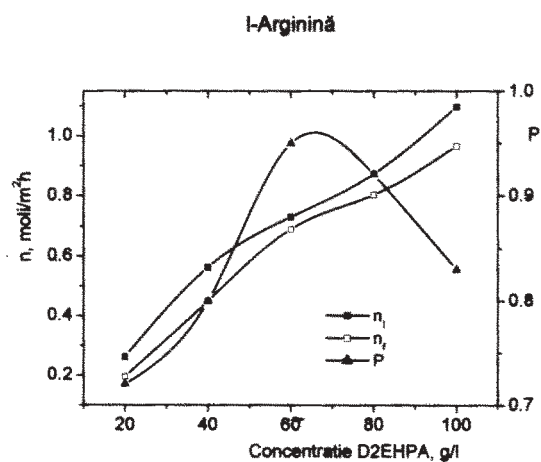
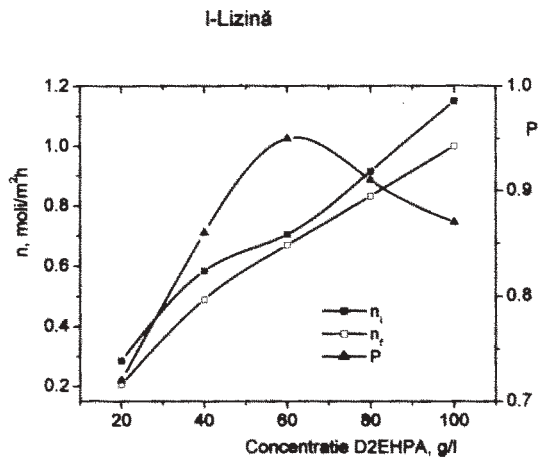
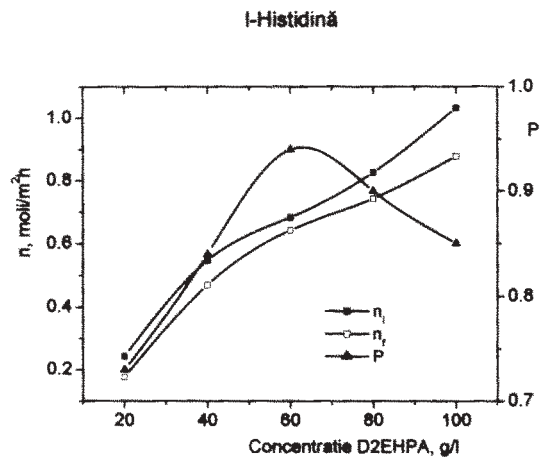


Fig. 3. Variația fluxurilor masice ale aminoacizilor și ale factorilor de permeabilitate în funcție de concentrația agentului purtător (pH -ul fazei apoase inițiale = 3, pH -ul fazei apoase finale = 2, turajia = 500 rpm)

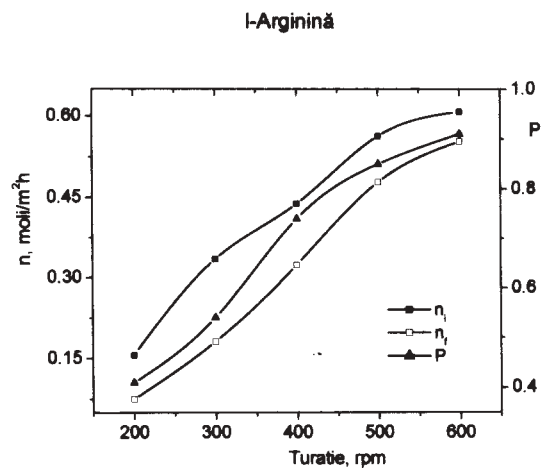
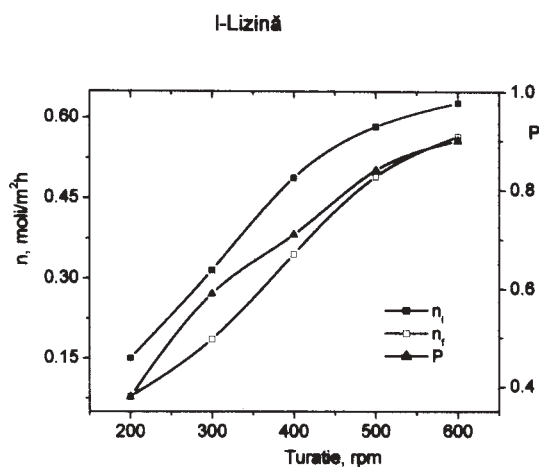
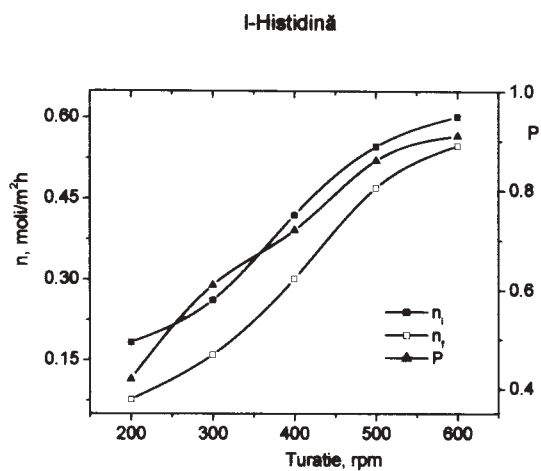


Fig. 4. Variația fluxurilor masice ale aminoacizilor și ale factorilor de permeabilitate în funcție de intensitatea amestecării fazelor apoase (pH -ul fazei apoase inițiale = 3, pH -ul fazei apoase finale = 2, concentrația D2EHPA = 40 g/L)

difuzional, fie cinetic. Astfel, până la o turație de 500 rpm, creșterea fluxurilor masice cu turația este mai importantă, datorită reducerii rezistențelor datorate difuziei aminoacizilor prin straturile limită formate în soluțiile apoase în vecinătatea celor două interfețe. Peste 500 rpm, influența intensității amestecării se diminuează, din cauza accentuării rezistenței de natură cinetică.

Influența pozitivă a creșterii turației asupra factorilor de permeabilitate este rezultatul unui efect mai puternic asupra fluxurilor masice finale, datorită unei rezistențe mărite opuse difuziei prin stratul limită format în faza apoasă finală.

Concluzii

Studiile referitoare la separarea unor aminoacizi cu caracter bazic (l-histidina, l-lizina și l-arginina) prin pertracție facilitată cu D2EHPA dizolvat într-o membrană lichidă liberă au evidențiat rolul major al gradientului de pH dintre fazele apoase, al concentrației agentului purtător și al intensității amestecării soluțiilor apoase.

Eficiența maximă a procesului, respectiv valorile maxime ale fluxurilor masice și ale factorilor de permeabilitate, se atinge pentru un pH = 3 al fazei apoase inițiale, pH = 1 al fazei apoase finale, 60 g/L D2EHPA în membrana lichidă, în condițiile unei amestecări intense a soluțiilor apoase.

Prin modificarea pH-ului soluției apoase inițiale este posibilă separarea selectivă a acestor aminoacizi. Astfel, la pH_i = 4 sunt extrase și transportate prin membrana lichidă doar l-lizina și l-arginina, fluxul masic al l-histidinei fiind 0.

Bibliografie

1.CA^aCAVAL, D., ONISCU, C., GALACTION, A.I., Inginerie biochimică și biotehnologie. 3. Procese de separare, Performantica, Iași, 2004, p. 100

- 2.KELLY, N.A., LUKHEZO, M., REUBEN, B.G., DUNNE, L.J., VERRALL, M.S., J. Chem. Technol. Biotechnol., **72**, 1998, p. 347
- 3.LIU, Y.S., DAI, Y.Y., WANG, H.D., Sep. Sci. Technol., **34**, 1999, p. 2165
- 4.CA^aCAVAL, D., ONISCU, C., GALACTION, A.I., Biochem. Eng. J., **7**, 2001, p. 171
- 5.LIN, S.H., CHEN, C.N., JUANG, R.S., J. Chem. Technol. Biotechnol., **81**, 2006, p. 406
- 6.REHM, H.J., REED, G., Biotechnology, **3**, VCH, Weinheim, 1993, p. 576
- 7.SCHUEGERL, K., Solvent Extraction in Biotechnology, Springer, Berlin, 1994, p. 111
- 8.DEBLAY, P., MINIER, M., RENON, H., Biotechnol. Bioeng., **35**, 1990, p. 123
- 9.LUCA, C., MUTIAC, L., CONSTANTINESCU, T., Rev. Roum. Chim., **35**, 1990, p. 467
- 10.TERAMOTO, M., YAMASHIRO, T., INONE, A., YAMAMOTO, A., MATSUYAMO, H., MIYAKE, Y., J. Membr. Sci., **58**, 1991, p. 11
- 11.HONG, S.A., CHOI, H.J., NAM, S.W., J. Membr. Sci., **70**, 1992, p. 225
- 12.EYAL, A.M., BRESSLER, E., Biotechnol. Bioeng., **41**, 1993, p. 287
- 13.CARDOSO, M.M., VIEGAS, R.M.C., CRESPO, J.P.S.G., J. Membr. Sci., **156**, 1999, p. 303
- 14.HOSSAIN, M.M., Sep. Purif. Technol., **42**, 2005, p. 227
- 15.SAIKIA, B., DUTTA, N.N., DASS, N.N., J. Membr. Sci., **225**, 2005, p. 1
- 16.BLAGA, A.C., GALACTION, A.I., CA^aCAVAL, D., Roum. Biotechnol. Lett., **11**, 2006, in press
- 17.BLAGA, A.C., GALACTION, A.I., CA^aCAVAL, D., FOLESCU, E., Roum. Biotechnol. Lett., **11**, 2006, in press
- 18.CA^aCAVAL, D., ONISCU, C., Brevet RO 119690 B1/2005
- 19.CA^aCAVAL, D., GALACTION, A.I., NICUȚĂ, N., Rev. Chim. (București), **57**, nr. 3, 2006, p. 297
- 20.CA^aCAVAL, D., ONISCU, C., CA^aCAVAL, C., Biochem. Eng. J., **5**, 2000, p. 45
- 21.LEHNINGER, A.L., Biochemistry, vol. 1, Worth, New York, 1975, p. 85

Intrat în redacție: 11.09.2006

