

بررسی توزیع پذیری آنزیم آلفا آمیلاز در سیستم دوفازی آبی حاوی پلی اتیلن گلیکول و تری سدیم سیترات

مریم کریمی^a، نغمه حدیدی^{b*}، غلامرضا پازوکی^c، شیوا عبدالرحیمی^d

^a دانش‌آموخته کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران

^b استادیار بخش تحقیقات بالینی و میکروسکوپ الکترونی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^c دانشیار دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران

^d دانش‌آموخته دکترای مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۸/۳۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۴/۲۳

چکیده

مقدمه: یکی از راهکارهای جداسازی محصولات بیوتکنولوژی، استفاده از سیستم‌های دوفازی آبی به جای سیستم‌های رایج استخراج با حلال است. سیستم‌های دوفازی آبی روشی کاربردی برای جداسازی و تخلیص مخلوط بیومولکول‌ها بشمار می‌روند. از سیستم‌های دوفازی آبی می‌توان در تخلیص پروتئین از مجموعه بیومولکول‌های موجود در سوسپانسیون تخمیری استفاده کرد. هدف از تحقیق حاضر بررسی توزیع پذیری آنزیم آلفا آمیلاز در سیستم دوفازی آبی پلیمر-نمک است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش سیستم دوفازی آبی شامل پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی¹ ۱۰۰۰ g.mol⁻¹ و نمک تری سدیم سیترات که نمکی زیست سازگار است، برای توزیع آنزیم آلفا آمیلاز در نظر گرفته شد. در ابتدا جهت ارزیابی محدوده دوفازی از روش تیتراسیون نقطه ابری برای رسم منحنی بینودال استفاده شد. همچنین اثر پارامترهای عملیاتی از جمله غلظت پلیمر، نمک آلی و غلظت آنزیم به روش باکس-بنکن بر روی توزیع پذیری آنزیم ارزیابی گردید. نتایج بدست آمده برای ضریب توزیع پذیری حاصل از آزمایش‌ها، مورد بررسی آماری قرار گرفته و نتایج به صورت یک مدل درجه دوم ارائه گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از رسم منحنی بینودال محدوده دوفازی را برای سیستم دوفازی-آبی بر پایه پلیمر-نمک آلی نشان می‌دهد. یافته‌های پژوهش حاضر بر روی توزیع پذیری نشان داد که غلظت اجزای تشکیل دهنده سیستم دوفازی-آبی اثر معنی‌داری بر توزیع آنزیم آلفا آمیلاز دارند. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین ضریب توزیع آلفا آمیلاز در سیستم متشکل از پلی اتیلن گلیکول و نمک تری سدیم سیترات، مقدار ۲/۶۸۱ را به خود اختصاص می‌دهد. در شرایط بهینه توزیع پذیری آنزیم مورد بررسی در سیستم دوفازی-آبی ۳/۱۰۲ تخمین زده شده است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که غلظت پلیمر، نمک آلی تری سدیم سیترات و آنزیم آلفا آمیلاز بر روی توزیع پذیری بسیار اثرگذار هستند. بنابراین در شرایط بهینه سیستم دوفازی-آبی پلیمر-نمک آلی سیستم مناسبی برای تخلیص آنزیم است.

واژه‌های کلیدی: آلفا آمیلاز، پلی اتیلن گلیکول، تری سدیم سیترات، توزیع پذیری، سیستم دوفازی آبی

مقدمه

آمیلازها از جمله آنزیم‌های پرکاربرد صنعتی هستند که بیش از یک چهارم بازار جهانی آنزیم را به خود اختصاص می‌دهند و در صنایع نساجی، داروسازی، صنایع غذایی مانند شیرین‌سازی و فرآوری نشاسته استفاده می‌شوند (Kammoun *et al.*, 2008). آمیلازها ساختاری پروتئینی دارند و به سه زیر گروه آلفا آمیلاز (α -Amylase)، بتا آمیلاز (β -Amylase) و گاما آمیلاز (γ -Amylase) تقسیم‌بندی می‌شوند. آمیلازها تنها آنزیم‌هایی هستند که توسط گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها دارند.

برای تولید آنزیم‌ها در مقیاس تجاری دو روش عمده وجود دارد که تخمیر معلق^۱ و تخمیر حالت جامد^۲ نام دارند. روش معلق نسبت به روش حالت جامد دارای مزیت‌هایی از جمله میزان تولید بیشتر در یک دوره زمانی، گردش بهتر اکسیژن در سیستم، حجم تولید بالا و نیاز به تجهیزات ساده‌تر می‌باشد (Subramaniyam & Vimala, 2012).

محلول‌های زیستی تولید شده توسط فرمانتاسیون معمولاً بصورت محلول در آب هستند و غلظت نسبتاً کمی دارند. غلظت این مواد در محلول‌های فرمانتاسیون معمولاً با چند مرحله جداسازی افزایش می‌یابد.

یکی از روش‌های جداسازی که در سال‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است وارد کردن محلول حاصل از فرمانتاسیون به سیستم دوفازی آبی است. سیستم‌های دوفازی آبی به علت هزینه کم، زمان کوتاه و بازدهی بالا مورد توجه بسیاری هستند (Khayati *et al.*, 2015; Xiea *et al.*, 2006; Kavakçioğlu & Tarhan, 2013). این سیستم‌ها قابلیت افزایش مقیاس و کمترین اثر تخریبی بر روی پروتئین‌ها را دارد (Keating & Cacace, 2013). توزیع‌پذیری یک بیومولکول در سیستم دوفازی آبی تابع پارامترهای متعددی از جمله دما، نوع و غلظت اجزای تشکیل‌دهنده سیستم، pH و غیره می‌باشد (Karkas & Önal, 2012). تحقیقات بسیاری بر میزان توزیع آنزیم آلفا آمیلاز در سیستم‌های دوفازی آبی انجام گرفته است (Shahriari *et al.*, 2010; Shahriari *et al.*, 2012).

سیستم دوفازی پلیمر (پلی اتیلن گلایکول) و نمک به

دلیل مزایایی مانند گرانبودی کم (در مقایسه با سیستم‌های پلیمر-پلیمر) و هزینه ناچیز (در مقایسه با پلیمرهایی مانند پلی پروپیلن گلایکول و دکستران) استفاده شد. استفاده از پلیمرهایی که دارای گرانبودی بالا می‌باشند موجب کاهش شدید فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در فاز غنی از پلیمر می‌شود (Oztuk, 2001). به کارگیری نمک‌های آلی از لحاظ زیست محیطی بسیار حائز اهمیت است. نمک‌هایی مانند فسفات و سولفات نیز باید از فازها بازیابی شوند، زیرا که میزان بار در پساب را افزایش می‌دهند. لذا فرآیندی که در آن یک مرحله بیشتر برای بازیابی نمک معدنی استفاده شود، تا از این ترکیب استفاده مجدد شود، از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست. این امر موجب گردید تا انگیزه برای توسعه سیستم دوفازی-آبی بر پایه نمک آلی افزایش یابد. استفاده از نمک‌های آلی نیازی به تصفیه پساب ندارد زیرا که نمک‌های آلی می‌توانند به آسانی تجزیه‌زیستی شوند و مشکل زیست محیطی ایجاد نمی‌کنند. این ترکیبات سمی نیستند و می‌توانند به راحتی در واحد تصفیه بیولوژیکی پساب آزاد شوند. به دلیل مزیت‌های فراوان نمک‌های آلی جایگزینی نمک‌های معدنی با این ترکیب بسیار موثر است و از لحاظ علمی از ارزش بالایی برخوردار است. در مطالعه جامع انجام‌شده توسط Han و همکاران (2010) قدرت نمک‌زدایی نمک‌های آلی سیترات سدیم، یا سدیم تارتارات یا سدیم استات در دمای ۲۹۸/۱۵ K بررسی شده است. آنان قدرت نمک‌زدایی نمک سیترات سدیم را از سایر نمک‌های آلی مورد بررسی بیشتر گزارش کردند. همچنین Shahriari و همکاران (2012) گزارش کردند که آنیون‌هایی با چگالی بار بیشتر، شدیدتر آب‌پوشی می‌شوند و در نتیجه قدرت نمک‌زدایی بیشتر تری دارند. بنابراین هرچه قدرت نمک‌زدایی نمک بیشتر باشد، مقدار نمک لازم برای تشکیل سیستم دوفازی-آبی کمتر و منطقه دوفازی نمودار وسیع‌تر است. لازم به ذکر است که ملاک انتخاب نمک آلی تری سدیم سیترات علاوه بر قدرت نمک‌زدایی بالاتر حفظ ماهیت پروتئینی، فعالیت و جایگاه فعال آنزیمی بوده است (Tianwei *et al.*, 2002). در مطالعه اخیر انجام شده توسط Dehnavi و همکاران (۲۰۱۵) حفظ فعالیت آنزیم در سیستم دوفازی-آبی پلیمر-

¹ Submerged Fermentation (SmF)² Solid State Fermentation (SSF)

از آب دوبار تقطیر استفاده شده است. آنزیم مورد استفاده، آنزیم آلفا آمیلاز (EC ۳/۲/۱/۱) باسیلوس سابستیلیس با جرم مولکولی ۵۷/۶ kDa و خلوص ۹۹٪ از نمایندگی شرکت Sigma-Aldrich جهت سنجش میزان توزیع پذیری تهیه شد.

– رسم منحنی بینودال

برای رسم منحنی بینودال از روش تیتراسیون نقطه ابری در دمای 25°C استفاده شد. در این روش ابتدا محلول پایه و شفاف از نمک تری سدیم سیترات با درصد وزنی ۳۰٪ تهیه گردید. سپس با استفاده از بورت محلول غلیظ و شفاف PEG1000 (۵۰٪ وزنی) قطره قطره به محلول نمک در حال اختلاط افزوده شد. عبور نور از سامانه پلیمر + نمک + آب و شفافیت آن نشان دهنده سیستم تک فازی و کدر شدن آن نشان دهنده تشکیل سیستم دو فازی خواهد بود؛ بنابراین هنگامی که اولین قطره از پلیمر محلول را کدر نماید، عمل اضافه کردن را قطع نموده و حجم اضافه شده یادداشت می شود. سپس برای تعیین نقطه بعدی روی منحنی بینودال، به محلول کدر درون بشر مقدار ناچیزی آب دو بار تقطیر شده به صورت قطره قطره اضافه می شود تا به حالت شفاف و تک فازی درآید. حجم دقیق آب اضافه شده یادداشت می شود. دوباره عمل اضافه کردن محلول پلیمر را ادامه می دهیم تا محلول درون بشر کدر گردد و به همین صورت نقاط بعدی نیز به دست خواهد آمد. از روی حجم های یادداشت شده می توان با استفاده از چگالی محلول های آبی پلیمر، درصد وزنی مقدار پلیمر اضافه شده را محاسبه نمود. در نهایت منحنی بینودال تجربی بدست آمده باید با معادله سه پارامتری زیر به خوبی انطباق یابد (Merchuk et al., 1998):

$$Y = A \exp(BX^{0.5} - CX^3) \quad (1)$$

نمک معدنی مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه با انجام تست های تکمیلی از قبیل CD و FTIR ساختار دوم و سوم آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. آن ها در این پژوهش به این نتیجه رسیدند که فعالیت آنزیم در حین جداسازی حفظ می شود و ساختار دوم و سوم آنزیم در این سیستم مخدوش نمی شود. بر اساس پژوهش Dehnavi، انتظار می رود که سیستم پیشنهادی در این پروژه نیز فعالیت آنزیم را حفظ کند. سیستم پیشنهادی پلیمر- نمک آلی شرایط ملایم تری نسبت به نمک معدنی برای جداسازی آنزیم ارائه می دهد بنابراین حفظ فعالیت آنزیم انتظار می رود.

هدف از بررسی سیستم دوفازی آبی به دست آوردن شرایطی بهینه برای افزایش توزیع پذیری و جداسازی زیست مولکول ها می باشد. نوع اجزای تشکیل دهنده سیستم، غلظت و وزن مولکولی اجزای فازها، اختلاف وزن مولکولی بین اجزای متناظر بین دو فاز، بافر نمک ها و اندازه مواد زیستی از عوامل موثر بر روی میزان توزیع پذیری زیست مولکول ها در سیستم های دوفازی آبی می باشند (خیاطی و علیزاده، ۱۳۹۳). در این پژوهش با استفاده از سیستم دوفازی آبی متشکل از پلیمر پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی 1000 g.mol^{-1} و نمک آلی تری سیترات سدیم میزان توزیع پذیری آلفا آمیلاز در سیستم دوفازی آبی سنجیده می شود. همچنین تأثیر غلظت اجزاء تشکیل دهنده سیستم دوفازی شامل پلیمر و نمک بر توزیع پذیری آنزیم مورد بررسی قرار می گیرد.

مواد و روش ها

– مواد

جزئیات خواص پلیمر و نمک آلی مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. جهت انجام آزمایش ها

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی مورد استفاده با فرمول شیمیایی و مخفف های آن

ماده	فرمول شیمیایی	جرم مولی (g mol ⁻¹)	منبع	ساختار شیمیایی	خلوص	مخفف
پلی اتیلن گلیکول	$\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$	۱۰۰۰	Merck millipore		$\geq 99\%$	PEG1000
تری سدیم سیترات-۵،۵-هیدرات	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 5,5 \text{H}_2\text{O}$	۳۵۷/۱۶	Merck millipore		$\geq 99\%$	Na3Citrate

جدول ۲- محدوده و سطوح تجربی در استخراج آلفا آمیلاز در سیستم دوفازی-آبی بر پایه ی PEG1000-تری سدیم-سیترات

فاکتور مستقل	واحد	سطوح		
		-۱	۰	+۱
غلظت PEG1000 (X_1)	درصد وزنی	۱۸	۲۲	۲۶
غلظت تری سدیم سیترات (X_2)	درصد وزنی	۱۴	۱۸	۲۲
غلظت آلفا آمیلاز (X_3)	درصد وزنی	۰/۲	۰/۴	۰/۶

نکته مهم علت انتخاب این مقادیر برای پارامترهای مستقل است. جهت انتخاب این مقادیر از منحنی های بینودال از پیش رسم شده استفاده می شود. با توجه به منحنی های بینودال مقدار پلیمر و نمک آلی به نحوی انتخاب می شود که محلول دوفازی- آبی تشکیل شود. همچنین جهت تعیین مقدار آنزیم آلفا آمیلاز افزوده شده از مطالعه Haghtalab و همکاران (۲۰۰۳) استفاده شد.

ابتدا خوراکی با درصد وزنی پلیمر و نمک آلی مطابق با جدول طراحی آزمایش (جدول ۳) درون بشر ۵۰ میلی لیتری تهیه شده و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی هم زده می شود. سپس مقداری از این محلول (حدود ۱۵ گرم) به لوله فالکن منتقل شده تا به عنوان محلول شاهد هنگام خواندن غلظت آنزیم استفاده شود. به محلول باقی مانده در بشر مقدار مناسب آنزیم آلفا آمیلاز اضافه شده به نحوی که غلظت آنزیم در محلول منطبق با جدول طراحی آزمایش گردد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه توسط همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس محلول به یک دکانتور با حجم ۵۰ میلی لیتر وارد شد. در نهایت، دکانتور و لوله فالکن به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور (Memmert, Germany) با دمای 25°C قرار داده شد. پس از برقراری تعادل، دو فاز مجزا و شفاف تشکیل شده و باید از هم تفکیک شوند. فازهای درون دکانتور با تنظیم شیر خروجی از یکدیگر جدا می شوند. میزان غلظت آلفا آمیلاز در هر فاز با استفاده از اسپکتروفوتومتر (M501, Camspec, England) تعیین می شود. لازم به ذکر است که بیشینه جذب آلفا آمیلاز در طول موج ۲۸۳ nm است که از طریق اسکن محلول رقیق آب و آلفا آمیلاز

که در آن A, B و C پارامترهایی هستند که با رگرسیون داده ها حاصل می شوند.

بررسی اثر پارامترهای عملیاتی بر روی توزیع پذیری آلفا آمیلاز

توزیع پذیری آلفا آمیلاز در سیستم دوفازی آبی، محلول نمک تری سیترات سدیم با محلول PEG1000 مطالعه گردید. روش های معمول مطالعه یک فرآیند، علاوه بر وقت گیر بودن و نیاز به تعداد آزمایش های زیاد، اثر ترکیبی پارامترهای موثر بر فرآیند را نمی دهند. یعنی روش های معمول، که شامل ثابت نگه داشتن همه پارامترها در یک سطح و بررسی اثر یک پارامتر است، اثر ترکیبی پارامترها را بر روی پاسخ سیستم بررسی نمی کند. با توجه به محدودیت های روش های معمول و کلاسیک به کارگیری روش های آماری در طراحی آزمایش از اهمیت ویژه ای برخوردار است. هدف اصلی طراحی آزمایش، برنامه ریزی آزمایش هایی است که اثر عوامل مشخصی را بر روی پاسخ سیستم مورد مطالعه قرار داده و همچنین عوامل تاثیرگذار را با دقت مناسبی تخمین بزند. برای بررسی سیستماتیک اثر پارامترهای عملیاتی بر روی توزیع پذیری آنزیم در سیستم دوفازی- آبی PEG1000- تری سدیم سیترات، از روش باکس-بنکن^۱ استفاده شد. در این مطالعه پارامترهای مستقل مورد بررسی عبارتند از:

(۱) X_1 ، درصد وزنی پلیمر در خوراک

(۲) X_2 ، درصد وزنی نمک آلی در خوراک

(۳) X_3 ، درصد وزنی آنزیم آلفا آمیلاز افزوده شده

و در مقابل ضریب توزیع پذیری آنزیم آلفا آمیلاز به عنوان پاسخ غیرمستقل سیستم می باشد. ضریب توزیع پذیری این ترکیب در سیستم از رابطه زیر به دست می آید:

$$K_{\alpha\text{-amylase}} = \frac{[\alpha\text{-amylase}]_{top}}{[\alpha\text{-amylase}]_{bot}} \quad (2)$$

که در آن $[\alpha\text{-amylase}]_{top}$ غلظت آنزیم در فاز بالایی (غنی از پلیمر) و $[\alpha\text{-amylase}]_{bot}$ غلظت آنزیم در فاز پایینی (غنی از نمک آلی) است. در جدول ۲ مقادیر کد شده و کد نشده هر یک از این عوامل مستقل ارائه شده است.

¹ Box-behnken

سیستم‌های دوفازی آبی بر پایه پلیمر بررسی گردید. جدول ۴ شامل داده‌های تعادلی مربوط به سیستم دوفازی-آبی شامل تری‌سدیم سیترات و PEG1000 است. شکل ۱ منحنی بینودال این سیستم را نشان می‌دهد.

با استفاده از رگرسیون نتایج تجربی مقادیر پارامترهای A، B و C برای معادله ۱ به ترتیب ۲/۰۶۳، ۵/۸۶۸- و ۶۶/۴۳- به دست آمده‌اند. پارامتر ضریب همبستگی (R^2) به عنوان معیاری جهت ارزیابی انطباق داده‌های تجربی و مدل می‌باشد. در این مطالعه، مقدار $R^2 = 0.995$ نزدیک به ۱ بوده و نمایانگر انطباق بین داده‌های تجربی و مدل سه پارامتری مرچوک است.

جدول ۴- داده‌های درصد وزنی نمودار فازی سامانه‌های دوفازی آبی PEG1000 (۱)-تری‌سدیم سیترات (۲) در

دمای 25 °C

$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$
۴۴/۴۴	۶/۱۳	۱۴/۲۴	۱۶/۴۹
۴۰/۳۶	۷/۵	۱۲/۷۵	۱۷/۲۷
۳۷/۵۶	۸/۲۲	۱۰/۶۸	۱۸/۵۳
۳۴/۴۵	۸/۹۸	۹/۳۷	۱۹/۲۵
۳۰/۷	۹/۹	۸/۵۶	۱۹/۸۶
۲۸/۰۷	۱۰/۸۸	۷/۳۷	۲۰/۶۴
۲۵/۰۲	۱۱/۹۲	۶/۵	۲۱/۹۶
۲۲/۱۶	۱۳/۱۷	۵/۵	۲۲/۴۴
۲۰/۶۲	۱۳/۹۴	۵/۴۴	۲۳/۳۲
۱۷/۷۷	۱۴/۹۲	۴/۷۵	۲۴/۱۸
۱۵/۸۲	۱۵/۸۳	۴/۶۱	۲۴/۵۵

به دست آمده است. برای تعیین غلظت آلفا آمیلاز در هر فاز از همان محلول بدون آنزیم به عنوان محلول شاهد استفاده شد (Gomes et al., 2009).

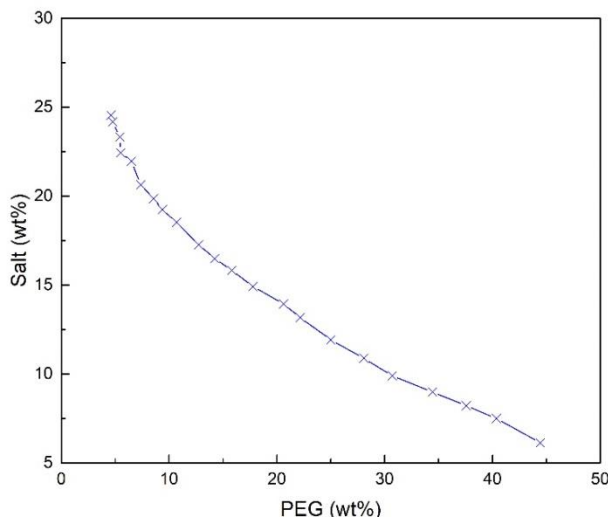
جدول ۳- غلظت‌های خوراک سیستم دوفازی آبی

Run#	X_1	X_2	X_3	$K_{\alpha\text{-amylase}}$	
				تجربی	تخمینی
۱	۱۸	۱۴	۰/۴	۰/۸۰۳	۰/۹۳۱
۲	۲۶	۱۴	۰/۴	۲/۱۸۶	۲/۱۵۰
۳	۱۸	۲۲	۰/۴	۰/۶۴۶	۰/۶۸۱
۴	۲۶	۲۲	۰/۴	۰/۸۰۸	۰/۶۷۹
۵	۱۸	۱۸	۰/۲	۱/۶۵۳	۱/۵۵۴
۶	۲۶	۱۸	۰/۲	۰/۷۵۳	۰/۸۱۸
۷	۱۸	۱۸	۰/۶	۰/۳۱۳	۰/۲۴۸
۸	۲۶	۱۸	۰/۶	۲/۱۰۳	۲/۲۰۱
۹	۲۲	۱۴	۰/۲	۱/۱۲۴	۱/۰۹۴
۱۰	۲۲	۲۲	۰/۲	۱/۱۴۴	۱/۲۰۷
۱۱	۲۲	۱۴	۰/۶	۲/۱۷۰	۲/۱۰۷
۱۲	۲۲	۲۲	۰/۶	۰/۲۴۳	۰/۲۷۲
۱۳	۲۲	۱۸	۰/۴	۱/۸۶۵	۱/۷۱۹
۱۴	۲۲	۱۸	۰/۴	۱/۶۲۳	۱/۷۱۹
۱۵	۲۲	۱۸	۰/۴	۱/۶۶۹	۱/۷۱۹

یافته‌ها

- منحنی بینودال

همان گونه که در بخش مواد و روش‌ها ذکر شد، داده‌های مربوط به منحنی بینودال (مرز ناحیه تک فاز و دوفاز) با استفاده از روش تیتراسیون نقطه ابری، برای



شکل ۱ - منحنی فازی بر مبنای دو جزء در سیستم دوفازی-آبی PEG1000+نمک‌آلی تری‌سدیم سیترات در دمای 25 °C و فشار اتمسفری

برهمکنش‌های آب گریز پروتئین‌ها و فاز پلیمری تأثیر می‌گذارد. افزایش غلظت نمک تا حدی می‌تواند موجب کاهش حجم آزاد موجود در فاز نمکی شده و باعث حرکت پروتئین‌ها به سمت فاز پلیمری شود. در غلظت‌های بالای نمک خاصیت نمک‌زدایی آن می‌تواند موجب رسوب‌دهی پروتئین‌ها در فصل مشترک دو فاز گردد، لذا میزان جداسازی و درصد استخراج بیومولکول هدف کاهش می‌یابد. از آنجایی که یون‌های نمک با گروه‌های باردار با بار مخالف پروتئین‌ها برهم‌کنش دارند، با تشکیل لایه‌های دوتایی از گروه‌های یونی موجب دی‌هیدراته شدن (حذف مولکول آب) پروتئین‌ها می‌شوند. این خاصیت آب‌پوشی یون‌های نمک و دی‌هیدراته کردن پروتئین‌ها باعث گسترش نواحی آب‌گریز پروتئین‌ها می‌شود (Ozturk, 2001).

برخی پژوهشگران دلیل تشکیل دو فاز مجزا در سیستم‌های دوفازی-آبی شامل نمک (الکترولیت) را به توانایی الکترولیت‌ها برای القای پدیده نمک‌زدایی^۱ مرتبط می‌دانند (Sadeghi & Jahani, 2012). در حالت کلی حلالیت یک پلیمر محلول در آب در اثر وجود الکترولیت ممکن است کاهش (اثر نمک‌زدایی) و به دنبال آن تشکیل سیستم دوفازی-آبی) یا افزایش (اثر نمک‌فزونی^۲) یابد. یون‌های القاننده پدیده نمک‌زدایی با آب ترکیب شده و کمپلکس هیدراته تشکیل داده و سپس از کنار مولکول‌های پلیمر دور می‌شوند. با افزایش غلظت این مواد (الکترولیت و پلیمر) در آب، میزان دور شدن کمپلکس‌ها افزایش می‌یابد. نهایتاً به حالتی می‌رسیم که تشکیل دوفاز، حالت مطلوب سیستم سده و دو فاز غنی از نمک (الکترولیت) و پلیمر به وجود خواهد آمد.

- توسعه معادله مدل رگرسیون

جهت ارزیابی داده‌های تجربی بدست آمده برای ضریب توزیع‌پذیری، یک معادله درجه دوم توسط نرم افزار Minitab توسعه داده شد. به منظور تعیین ضرایب این چند جمله‌ای از روش حداقل کردن مربعات خطا استفاده می‌شود و پس از آن بر اساس رویه پاسخ بدست آمده، تحلیل بر روی سیستم صورت می‌گیرد. در صورتی که مدل ارائه شده انطباق خوبی با سیستم واقعی داشته باشد، مدل پیشنهادی از عملکرد مناسبی برخوردار است. رابطه ۳ مدل حاصل به صورت کد نشده را برای ضریب توزیع‌پذیری آلfa آمیلاز نشان می‌دهد.

نتایج آنالیز واریانس در جدول ۵ ارائه شده است. مقدار بالای F نشان دهنده آن است که مدل معتبر می‌باشد و تغییرات پاسخ، با مدل رگرسیون پیشنهادی قابل پیش بینی است مقدار P اهمیت آماری پارامترها را مشخص می‌کند و برای یک مدل با اهمیت آماری بالا باید مقداری کمتر از ۰/۰۵ داشته باشد. مقدار P مدل پیشنهادی در این پروژه ۰/۰۰۱ بوده و این خود نشانی از مناسب بودن مدل است. کل تغییرات توصیف نشده با مدل پیشنهادی توسط ترم خطا بیان می‌شود. با توجه به مقادیر موجود در جدول، شکل مدل انتخابی قادر است رابطه بین فاکتورها و پاسخ سیستم را به خوبی توصیف کند.

- توزیع‌پذیری آلfa آمیلاز در سیستم دوفازی-آبی

تعیین سیستم مناسب برای استخراج آلfa آمیلاز از مخلوط تخمیری همواره یکی از چالش‌های پیش رو در زمینه تولید آنزیمی بوده است. نتایج حاصل از توزیع آنزیم آلfa آمیلاز در سیستم دوفازی آبی شامل پلی اتیلن گلیکول و تری سدیم سیترات در جدول ۵ گزارش شده‌اند.

۱۰

بحث

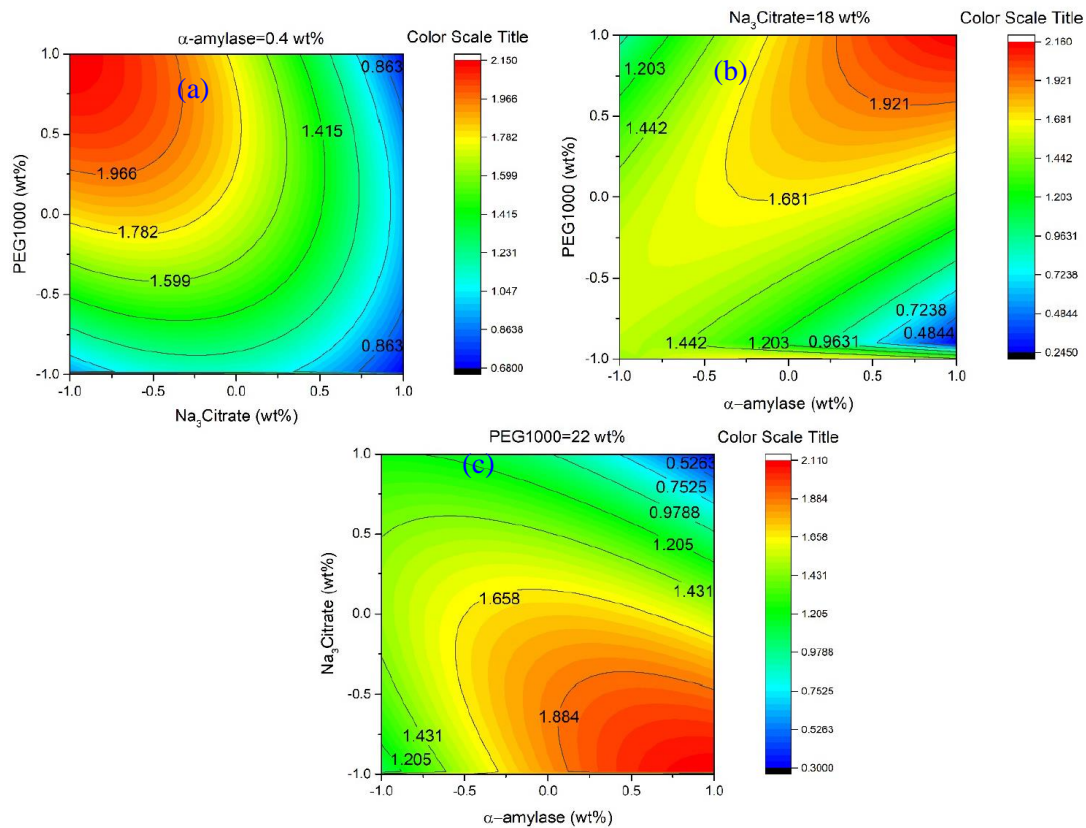
- اثر پارامترهای عملیاتی

همان‌طور که در منحنی کانتور (شکل ۲-a) مشاهده می‌شود، افزایش غلظت PEG1000 در خوراک از سطح کد شده ۱- به ۱+ منجر به افزایش ضریب توزیع‌پذیری آنزیم از ۰/۸۵ به ۱/۴۶ می‌شود. افزایش غلظت اولیه پلیمر موجب می‌شود فاز غنی از پلیمر آب‌گریزتر شود و به همین دلیل افزایش در ضریب توزیع‌پذیری بیومولکول مشاهده می‌شود. به عبارت دیگر می‌توان نتیجه گرفت که فرآیند استخراج به طور کلی با برهم‌کنش‌های هیدروفوب کنترل می‌شود.

هم‌چنین منحنی کانتور در شکل ۲ بیانگر آن است که افزایش غلظت نمک‌آلی در خوراک از سطح کد شده ۱- به ۱+ منجر به کاهش ضریب توزیع‌پذیری آنزیم از ۱/۵۷ به ۰/۷۱ می‌شود. افزایش غلظت نمک در فاز پایین بر روی

¹ Salting-out² Salting-in

$$K_{\alpha\text{-amylase}} = -18.69 + 0.871X_1 + 1.280X_2 - 2.90X_3 - 0.01791X_1^2 - 0.02011X_2^2 - 5.67X_3^2 - 0.01908X_1X_2 + 0.8404X_1X_3 - 0.6086X_2X_3 \quad R^2 = 0.9829 \quad (3)$$



۱۱

شکل ۲- نمودار کانتور اثر پارامترهای عملیاتی بر روی توزیع پذیری آلفا آمیلاز در سیستم PEG1000- تری سدیم سیترات

جدول ۵ - جدول آنالیز واریانس برای توزیع پذیری آلفا آمیلاز در سیستم PEG1000- تری سدیم سیترات

P-value	F-value	درجه آزادی	مجموع مربعات	منبع
$.$	۳۱/۹۶	۹	۶/۱۱۶۲	مدل
$.$	۳۴/۸۴	۱	۰/۷۴۰۷۹	x_1
$.$	۶۹/۶۵	۱	۱/۴۸۰۹	x_2
$.$	۰/۱۴	۱	۰/۰۰۳۰	x_3
$.$	۱۷/۵۳	۱	۰/۳۷۲۷	$x_1 \times x_2$
$.$	۸۵/۰۴	۱	۱/۸۰۸۲	$x_1 \times x_3$
$.$	۴۴/۶۰	۱	۰/۹۴۸۲	$x_2 \times x_3$
$.$	۱۴/۲۵	۱	۰/۲۲۸۳	x_1^2
$.$	۱۷/۹۸	۱	۰/۳۴۳۹	x_2^2
$.$	۸/۹۴	۱	۰/۱۹۰۰	x_3^2
		۵	۰/۱۰۶۳	خطا ^۱
		۳	۰/۰۷۳۲	نقص تناسب ^۲
		۲	۰/۰۳۳۰	خطای خالص ^۳
		۱۴	۶/۲۲۲۵	مجموع

¹ Error

² Lack of Fit

³ Pure Error

محیط تخمیر است. سیستم دو فازی آبی نسبت به سیستم-های متداول و سنتی آب-حلال آلی دارای مزیت‌های بیشتری می‌باشد. از آنجا که هر دو فاز تا حد بسیار زیادی شامل آب بوده، سیستم بسیار ملایمی برای مواد بیولوژیکی فراهم می‌نماید. این بدان معنا است که از آنزیم طبیعت-زدایی نمی‌شود. در این مطالعه منحنی بینودال سیستم دوفازی-آبی-PEG1000-نمک آلی تری‌سدیم سیترات رسم گردید و سپس اثر غلظت پلیمر و نمک در خوراک علاوه بر غلظت آنزیم آلفا آمیلاز به صورت آماری مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که غلظت اجزای تشکیل دهنده سیستم دوفازی آبی اثر معنی-داری بر روی توزیع‌پذیری آنزیم آلفا آمیلاز دارند. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین ضریب توزیع آلفا آمیلاز در این سیستم ۲/۶۸۱ است. با بررسی اثر پارامترهای عملیاتی مشخص شد که افزایش غلظت پلیمر از ۱۸ به ۲۶ wt% به دلیل برهم‌کنش‌های هیدروفوب تمایل آنزیم را برای قرارگیری در فاز غنی از پلیمر افزایش می‌دهد. در مقابل افزایش غلظت نمک آلی از ۱۴ به ۲۲ wt% به دلیل قدرت نمک‌زدایی آن توزیع‌پذیری بیومولکول را کاهش می‌دهد. در همین راستا ارزیابی شرایط بهینه برای استخراج بیومولکول حائز اهمیت است؛ و در شرایط بهینه توزیع‌پذیری آنزیم مورد بررسی ۳/۱۰۲ تخمین زده شده است.

برای توزیع‌پذیری آلفا آمیلاز، اثر خطی غلظت پلیمر و نمک آلی مهم است. همچنین اثر مربعی و اثر برهم‌کنش‌های فاکتورهای مورد بررسی بسیار مهم می‌باشد. لازم به ذکر است که اثر خطی غلظت آنزیم توزیع شونده چندان حائز اهمیت نیست.

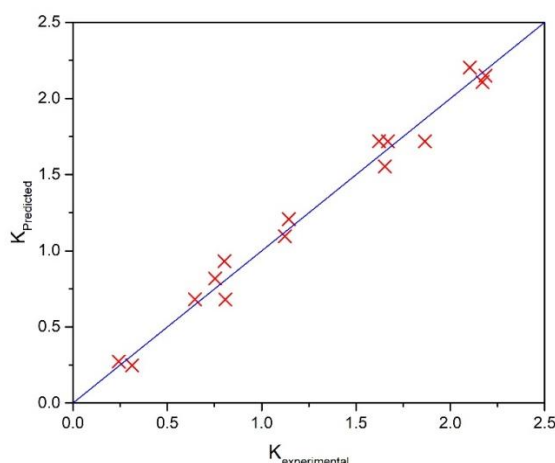
شکل ۳ نمودار مقدار واقعی در مقابل مقدار پیش بینی شده توسط مدل برای پاسخ را نشان می‌دهد. این نتایج عمدتاً اطراف خط 45° پراکنده شده‌اند که مؤید انطباق مناسب مدل با مقدار واقعی می‌باشد.

در بهینه‌سازی هدف یافتن ترکیبی از سطوح عوامل مستقل است که شرط قرار داده‌شده بر روی پاسخ را تامین کند. بنابراین هدف مورد نظر برای هر فاکتور مستقل (غلظت‌های اولیه خوراک) و پاسخ (ضریب توزیع‌پذیری آنزیم) باید انتخاب شود. در این پژوهش، تابع هدف برای ضریب توزیع‌پذیری مقدار ماکزیمم انتخاب شده و هر یک از متغیرهای مستقل باید درون محدوده مورد بررسی قرار گیرند. نتایج بهینه‌سازی در جدول ۶ نشان داده‌شده‌اند.

نتیجه‌گیری

هدف از بررسی توزیع‌پذیری بیومولکول در سیستم‌های دوفازی آبی دستیابی به شرایط مناسب برای افزایش بازدهی جداسازی بیومولکول‌ها به خصوص آنزیم‌ها از

۱۲



شکل ۳ - مقایسه مقدار واقعی و مقدار پیش بینی شده توسط مدل برای پاسخ

جدول ۶- مقدار بهینه شرایط عملیاتی برای ماکزیمم مقدار ضریب توزیع‌پذیری

شرایط بهینه				سیستم دو فازی-آبی
$K_{\alpha\text{-amylase}}$	PEG1000(wt%)	Salt(wt%)	Enzyme(wt%)	
۳/۱۰۲	۲۶	۱۴	۰/۶	تری‌سدیم سیترات-PEG1000

phase systems. Separation and Purification Technology, 105 (22), 8-14.

Khayati, G., Anvari, M. & Shahidi, N. (2015). Partitioning of b-galactosidase in aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and phosphate salts, Fluid Phase Equilibria, 385 (15), 147-152.

Merchuk, J. C., Andrews B. A. & Asenjo, J. A. (1998). Aqueous two-phase systems for protein separation. Studies on phase inversion. Journal of Chromatography B, 711(1-2), 285-293.

Ozturk, B. (2001). Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. Thesis of Department: Biotechnology and Bioengineering. İzmir Institute of Technology İzmir, Turkey.

Sadeghi, R. & Jahani, F. (2012). Salting-In and Salting-Out of Water-Soluble Polymers in Aqueous Salt Solutions. Journal of Chromatography B, 116 (17), 5234-5241.

Shahriari, S., Neves, C. M., Freire G. M. & Coutinho, J. A. P. (2012). Role of the Hofmeister Series in the Formation of Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems. The Journal of Physical Chemistry B, 116 (24) , 7252-7258.

Shahriari, S., Vossoughi, M., Taghikhani, V., Safekordi, A. A. & Alemzadeh, I. (2010). Experimental Study and Mathematical Modeling of Partitioning of β -Amylase and Amyloglucosidase in PEG-Salt Aqueous Two-Phase Systems. Journal of Chemical & Engineering Data, 55 (11), 4968-4975.

Shahriari, S., Vossoughi, M., Taghikhani, V., Safekordi, A. A., Alemzadeh, I. & Pazuki, G. (2012). Measurement of partition coefficients of β -amylase and amyloglucosidase enzymes in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ at different temperatures. Fluid Phase Equilibria, 292 (30), 80-86.

Subramaniam, R. & Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. International Journal of Natural Sciences, 3 (3), 480-486.

Tianwei, T., Qing, H. & Qiang, L. (2002). Purification of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch with ethanol/phosphate aqueous two phase system. Biotechnology Letters, 24(3), 1417-1420.

منابع

خیاطی، غ. و علیزاده، ص. (۱۳۹۴). استخراج آنزیم لیپاز تولیدی توسط قارچ *Aspergillus niger* از براث تخمیری با استفاده از سیستم دوفازی آبی. نشریه علوم مهندسی و جداسازی، دوره ۷، شماره ۱، صفحات ۵۳-۴۵.

Cacace, D. N. & Keating, C. D. (2013). Biocatalyzed mineralization in an aqueous two-phase system: effect of background polymers and enzyme partitioning. Journal of Materials Chemistry B, 1(13), 1767-1870.

Dehnavi, S. M., Pazuki, G. & Vossoughi, M. (2015). PEGylated silica-enzyme nanoconjugates: a new frontier in large scale separation of α -amylase. Scientific Reports, 5, 1-9.

Gomes, G. A., Azevedo, A. M., Aires-Barros, M. R. & Prazeres, D. M. F. (2009). Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate. Separation and Purification Technology, 65 (1), 22-30.

Haghtalab, A., Mokhtarani, B. & Maurer, G. (2003). Experimental Results and Thermodynamic Modeling of the Partitioning of Lysozyme, Bovine Serum Albumin, and α -Amylase in Aqueous Two-Phase Systems of PEG and (K_2HPO_4 or Na_2SO_4). Journal of Chemical & Engineering Data, 48 (5), 1170-1177.

Han, J., Yu, C. & Wang, Y. (2010). Liquid-liquid equilibria of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and sodium citrate/tartrate/acetate aqueous two-phase systems at 298.15 K: experiment and correlation. Fluid Phase Equilibria, 295 (1) , 98-103.

Kammoun, R., Naili, B. & Bejar, S. (2008). Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). Bioresource Technology, 99 (13), 5602-5609.

Karkas, T. & Önal, S. (2012). Characteristics of invertase partitioned in poly (ethylene glycol)/magnesium sulfate aqueous two-phase system. Biochemical Engineering Journal, 60 (16), 142-151.

Kavakçioğlu, B. & Tarhan, L. (2013). Initial purification of catalase from *Phanerochaete chrysosporium* by partitioning in poly (ethylene glycol)/salt aqueous two

Xie, H. G., Wang, Y. J. & Mi Suna, M. (2006). Modeling of the partitioning of membrane protein and phase equilibria for Triton X-100–salt aqueous two-phase systems

using a modified generalized multicomponent osmotic virial equation. Process Biochemistry, 41 (3), 689-696.