بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده فنی
گروه مهندسی شیمی

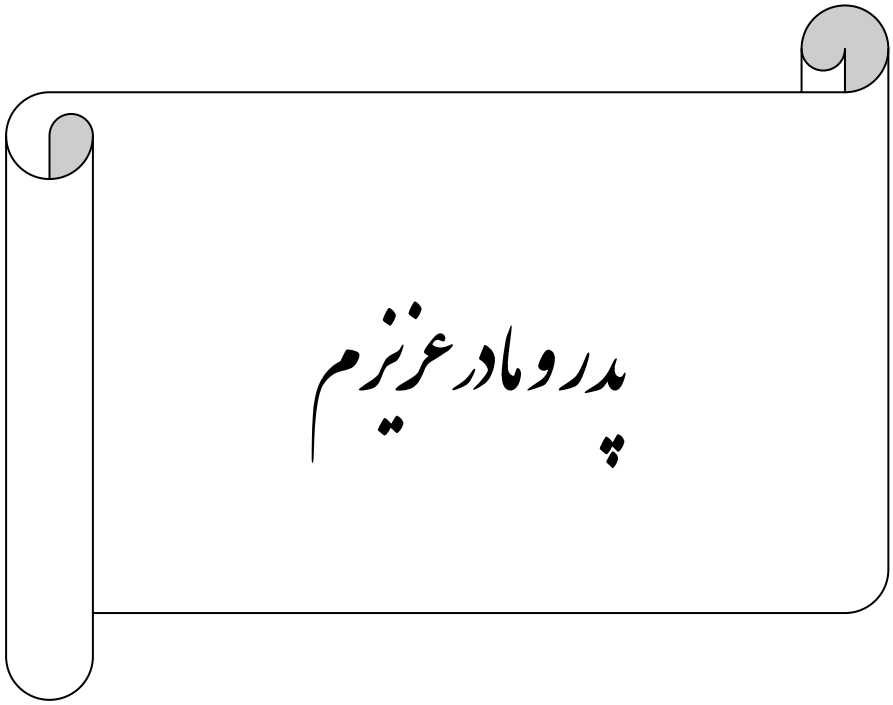
استخراج آنزیم بتاگالاکتوزیداز از سوسپانسیون تخمیری با استفاده از سیستم دو فازی آبی

از
نوشین شهیدی

استاد راهنما
دکتر غلام خیاطی

شهریور ماه ۱۳۹۳

تقدیم به:



تقدیر و تشکر:

سپاس بی کران خداوند سبحان را که با افاضه فرصتی جهت فراگیری علم، جان را به نور معرفت خویش مزین نموده و در این راه بیش از هر چیز قدر و منزلت انسان را بر خویش نمایان ساخت که دانش ما چیست جز ذره ای در خزانه حکمت او.

بدین وسیله بر خود فرض می دانم از استاد فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر خیاطی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند، کمال تشکر را داشته باشم.

با تشکر ویژه از اساتید فرزانه و دلسوز آقایان: دکتر جواد صیادامین و دکتر بهروز عباسی سورکی که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند.

با تشکر از اتمامی اساتید محترم گروه مهندسی شیمی که از محضرشان درس ها آموختم.

با تشکر ویژه از دوستان عزیزم که مرا از مهربانی و عطوفتشان سرشار نمودند.

عنوان **فهرست مطالب** **صفحه**

چکیده فارسی ر

چکیده انگلیسی ز

مقدمه ۱

فصل اول: کلیات ۳

۱-۱- سیستم های دو فازی آبی ۴

۱-۱-۱- ساختار سیستم های دوفازی آبی ۵

۱-۱-۲- انواع سیستم های دوفازی آبی ۶

۱ -۱-۲-۱- سیستم های دوفازی آبی پلیمر- پلیمر ۶

۱-۱-۲-۲- سیستم دوفازی آبی پلیمر – نمک ۷

۱-۱-۲-۳- سیستم های دوفازی آبی برپایه مواد فعال سطحی ۸

۱-۱-۲-۴- سیستم دوفازی آبی برپایه مایع یونی ۸

۱-۱-۳- کاربرد های سیستم های دوفازی ـ آبی ۹

۱-۱-۴- مزیت های سیستم های دوفازی آبی ۱۰

۱-۱-۵- توزیع پذیری مواد بیولوژیکی در سیستم های دوفازی آبی ۱۱

۱-۱-۵-۱- عوامل موثر بر میزان توزیع پذیری مواد بیولوژیکی در سیستم های دوفازی آبی ۱۲

۱-۲- بیوتکنولوژی ۱۳

۱-۲-۱- تاریخچه بیوتکنولوژی ۱۳

۱-۲-۲- صنایع تخمیری بیوتکنولوژی ۱۴

۱-۲-۳- فرآورده‌ها و محصولات میکروبی ۱۴

۱-۳- منابع میکروبی تولید کننده بتا-گالاکتوزیداز ۱۵

۱-۳-۱- قارچ آسپرژیلوس ۱۵

۱-۳-۱-۱- اهمیت تجاری ۱۶

۱- ۳-۱-۲- آسپرژیلوس نیجر	۱۶
۱-۴- آنزیم‌ها	۱۸
۱-۴-۱- تاریخچه بتا-گالاکتوزیداز	۱۹
۱-۴-۲- اهمیت بتا-گالاکتوزیداز	۲۰
۱-۴-۳- ساختار بتا-گالاکتوزیداز	۲۳
۱-۴-۴- مکانیسم عمل بتا-گالاکتوزیداز	۲۴
۱-۵- روش‌های تخلیص محصولات	۲۵
۱-۶- مهندسی جداسازی بیولوژیکی	۲۶
۱-۷- مقدمه‌ای بر تکنیک طراحی آزمایش‌ها	۲۷
۱-۷-۱- طراحی آزمایش چیست	۲۷
۱-۷-۲- هدف از طراحی آزمایش	۲۹
۱-۷-۳- دستاوردهای طراحی آزمایش	۲۹
فصل دوم: مروری بر مطالعات وتحقیقات انجام شده	۳۰
۲-۱- تاریخچه سیستم های دوفازی آبی	۳۱
۲-۲- اهمیت سیستم دوفازی آبی	۳۱
۲-۳- مروری بر تحقیقات انجام شده	۳۲
فصل سوم: مواد وروش های انجام آزمایش	۳۷
۳-۱- مواد و تجهیزات	۳۸
۳-۱-۱- مواد	۳۸
۳-۱-۱-۱- مواد محیط کشت	۳۸
۳-۱-۱-۲- مواد شیمیایی و نمک‌ها	۳۸
۳-۱-۲- تجهیزات آزمایشگاهی	۳۸
۳-۲- فرآینداستخراج آنزیم از محیط تخمیر	۳۹

۳-۲-۱- فرآیندتولیدآنزیم (تخمیر) ۳۹

۳-۲-۱-۱- فعال سازی میکرو ارگانیسم ۴۰

۳-۲-۱-۲- آماده سازی محیط کشت اصلی تخمیر و تولید آنزیم ۴۰

۳-۲-۱-۳- جداسازی توده میکروبی از سوسپانسیون آنزیمی ۴۰

۳-۲-۱-۴- سنجش فعالیت آنزیمی ۴۱

۳-۲-۱-۵- سنجش میزان پروتئین ۴۲

۳-۲-۲- آماده سازی سیستم های دوفازی آبی ۴۴

۳-۲-۳- استخراج آنزیم در سیستم های دوفازی آبی ۴۴

۳-۲-۳-۱- تعیین نسبت حجمی فاز ها ۴۶

۳-۲-۳-۲- تعیین ضریب جداسازی آنزیمی ۴۶

۳-۲-۳-۳- تعیین درصد بازیابی فعالیت آنزیمی ۴۶

۳-۲-۳-۴- تعیین فعالیت ویژه آنزیمی ۴۷

۳-۲-۳-۵- تعیین فاکتور خلوص ۴۷

۳-۲-۳-۶- تعیین ضریب جداسازی پروتئین ۴۷

۳-۲-۳-۷- تعیین ضریب گزینش پذیری ۴۸

فصل چهارم: نتایج و بحث ۴۹

۴-۱- تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر پارامتر های جداسازی آنزیم بتاگالاکتوزیداز ۵۰

۴-۲- تأثیر غلظت نمک و پلی اتیلن گلایکول بر پارامتر های جداسازی آنزیم بتاگالاکتوزیداز ۶۰

۴-۳- بررسی اثر pH بر فاکتور خلوص ۶۵

۴-۴- بررسی اثر بار جرمی سوسپانسیون تخمیری بر فاکتور خلوص ۶۷

۴-۵- بررسی اثر نسبت جرمی نمک به پلیمر ۶۸

۴-۶- نتایج حاصل از طراحی روش فول فاکتوریل ۶۹

۴-۷- انتخاب سیستم بهینه برای جداسازی آنزیم بتاگالاکتوزیداز ۷۴

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات ۷۵

۵-۱- نتیجه گیری ۷۶

۵-۲- پیشنهادات ۷۷

منابع ۷۸

ضمائم ۸۶

فهرست شکل ها

شکل(۱-۱): ساختار لاکتوز و ترکیبات حاصل از تجزیه آن ۲۲

شکل(۱-۲): ساختار بتا-گالاکتوزیداز در *E.coli* ۲۴

شکل(۱-۳): مکانیسم عمل بتا-گالاکتوزیداز ۲۴

شکل (۱-۴): عمده مراحل مورد استفاده برای جداسازی و تخلیص آنزیم‌های درون سلولی ۲۵

شکل(۳-۱): نمونه بعد از سانتریفیوژ ۴۰

شکل(۳-۲): منحنی استانداردجذب اورتو نیترو فنل دربرابرغلظت ۴۲

شکل(۳-۳): منحنی استانداردجذب پروتئین دربرابرغلظت ۴۳

شکل (۳-۴): سیستم دوفازی آبی ۴۴

شکل(۳-۵): سیستم دوفازی آبی پس از افزودن سوسپانسیون آنزیمی ۴۵

شکل(۳-۶): سیستم دوفازی آبی حاوی سوسپانسیون آنزیمی پس از سانتریفیوژ شدن ۴۵

شکل(۴-۱): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر ضریب جداسازی آنزیم و ضریب جداسازی پروتئین کل با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک دی آمونیوم هیدروژن فسفات(۲۴٪)-پلی اتیلن(۸٪). ۵۲

شکل(۴-۲): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر ضریب جداسازی آنزیم و ضریب جداسازی پروتئین کل با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک دی آمونیوم هیدروژن فسفات(۱۸٪)- پلی اتیلن(۱۶٪). ۵۳

شکل(۴-۳): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر ضریب جداسازی آنزیم و ضریب جداسازی پروتئین کل با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک دی آمونیوم هیدروژن فسفات(۱۲٪)- پلی اتیلن(۲۴٪). ۵۳

شکل(۴-۴): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر ضریب جداسازی آنزیم و ضریب جداسازی پروتئین کل با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک دی آمونیوم هیدروژن فسفات(۶٪)- پلی اتیلن(۳۲٪). ۵۴

شکل(۴-۵): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر ضریب جداسازی آنزیم و ضریب جداسازی پروتئین کل با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک دی پتاسیم هیدروژن فسفات(۲۴٪)- پلی اتیلن(۸٪). ۵۴

شکل(۴-۶): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر ضریب جداسازی آنزیم و ضریب جداسازی پروتئین کل با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک دی پتاسیم هیدروژن فسفات(۱۸٪)- پلی اتیلن(۱۶٪). ۵۵

شکل(۴-۷): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر ضریب جداسازی آنزیم و ضریب جداسازی پروتئین کل با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک دی پتاسیم هیدروژن فسفات(۱۲٪)- پلی اتیلن(۲۴٪). ۵۵

شکل(۴-۸): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر ضریب جداسازی آنزیم و ضریب جداسازی پروتئین کل با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیم با نمک دی پتاسیم هیدروژن فسفات(۶٪)- پلی اتیلن(۳۲٪). ۵۶

شکل(۴-۹): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر درصد بازیابی آنزیم با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک(۱۸٪)- پلی اتیلن گلایکول(۱۶٪). ۵۷

شکل(۴-۱۰): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر درصد بازیابی آنزیم با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک(۱۲٪)- پلی اتیلن گلایکول(۲۴٪). ۵۷

شکل(۴-۱۱): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر گزینش پذیری آنزیم با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک(۲۴٪) و (۱۸٪)- پلی اتیلن (۸٪) و (۱۶٪). ۵۹

شکل(۴-۱۲): تاثیر وزن مولکولی پلیمر بر گزینش پذیری آنزیم با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک(۱۲٪) و (۶٪)- پلی اتیلن (۲۴٪) و (۳۲٪). ۶۰

شکل(۴-۱۳): تاثیر غلظت پلیمر بر فاکتور خلوص و فعالیت ویژه آنزیم با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک و پلی اتیلن ۲۰۰۰ ۶۱

شکل(۴-۱۴): تاثیر غلظت پلیمر بر فاکتور خلوص و فعالیت ویژه آنزیم با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون آنزیمی با نمک و پلی اتیلن۴۰۰۰ ۶۲

شکل(۴-۱۵): تاثیر غلظت پلیمر بر فاکتور خلوص و فعالیت ویژه آنزیم با افزودن ۱۰٪ وزنی سوسپانسیون با نمک و پلی اتیلن ۸۰۰۰ ۶۲

شکل(۴-۱۶): تأثیر pH بر فاکتور خلوص آنزیم بتاگالاکتوزیداز ۶۶

شکل(۴-۱۷): تأثیر میزان سوسپانسیون آنزیمی اضافه شده بر فاکتور خلوص آنزیم بتاگالاکتوزیداز ۶۸

شکل(۴-۱۸): تأثیرنسبت جرمی نمک به پلیمر بر فاکتور خلوص آنزیم بتاگالاکتوزیداز ۶۹

شکل(۴-۱۹): مقایسه مقادیر تجربی با مقادیر پیش‌بینی شده مدل برای فاکتور خلوص ۷۳

شکل(۴-۲۰): نمودار احتمال نرمال بر حسب مقادیر باقیمانده برای فاکتور خلوص ۷۴

فهرست جداول

جدول۱-۱- گروه های اصلی آنزیم ها بر اساس نوع عملکرد ۱۹

جدول ۳-۱- تهیه استاندارد پروتئین ۴۳

جدول۴-۱- نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت نمک و پلیمر بر بازده آنزیمی و نسبت حجمی با افزودن ۱۰ درصد وزنی سوسپانسیون تخمیری ۶۴

جدول۴-۲- طراحی آزمایش فول فاکتوریل و نتایج حاصل از آن بر حسب درجه خلوص ۷۰

جدول۴-۳- نتایج آنالیز واریانس پارامتر های مختلف برای طراحی فول فاکتوریل ۷۲

جدول ۴-۴- شرایط عملیاتی بهینه برای استخراج بتاگالاکتوزیداز در سیستم دوفازی آبی ۷۴

علایم اختصاری

فعالیت آنزیمی(U/ml)	A
نسبت حجمی	V_r
حجم فاز بالایی(ml)	V_t
حجم فاز پایینی (ml)	V_b
ضریب جداسازی آنزیمی (ثابت تفکیک تعادلی)	K_L
درصد بازیابی آنزیمی	Y_t
فعالیت ویژه آنزیمی(U/mg)	SA
غلظت کلی پروتئین(mg/ml)	P_t
فاکتور خلوص	PF
ضریب جداسازی پروتئین(ثابت تفکیک تعادلی)	K_p
غلظت پروتئین در فاز بالایی(mg/ml)	C_t
غلظت پروتئین در فاز پایینی (mg/ml)	C_b
گزینش پذیری	S
تابع پاسخ	RF
ثابت مدل	$ß_0$
ضریب خطی	$ß_i$
ضریب برهمکنش	$ß_{ij}$
ضریب توزیع بیومولکول	K_{bio}

ر

استخراج آنزیم بتاگالاکتوزیداز از سوسپانسیون تخمیری با استفاده از سیستم دو فازی آبی

نوشین شهیدی

چکیده فارسی

یکی از چالش های عمده در صنعت بیوتکنولوژی، تخلیص پروتئین های مطلوب از تنوع گسترده ای بیومولکول در سوسپانسیون تخمیری است. هدف از این تحقیق جداسازی بتاگالاکتوزیداز با استفاده از سیستم های دوفازی آبی می باشد. سیستم دوفازی آبی به عنوان تکنیک ارزشمندی برای جداسازی و تخلیص مخلوطی از بیومولکول ها به اثبات رسیده است. رفتار جداسازی بتاگالاکتوزیداز (تولید شده از آسپرژیلوس نیجر) در سیستم های دو فازی آبی متشکل از پلی اتیلن گلایکول و یک نمک (دی آمونیوم هیدروژن فسفات یا دی پتاسیم هیدروژن فسفات) بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش وزن مولکولی پلیمر منجر به کاهش بازده، ضریب گزینش پذیری و ضریب جداسازی بتاگالاکتوزیداز گردید. سیستم متشکل از پلی اتیلن گلایکول با وزن مولکولی ۲۰۰۰ و نمک دی آمونیوم هیدروژن فسفات برای جداسازی بتاگالاکتوزیداز از سوسپانسیون تخمیری آسپرژیلوس نیجر PTCC 1050 مناسب می باشد. در ادامه از طراحی فول فاکتوریل برای بررسی سه متغیر مستقل (نسبت جرمی نمک به پلیمر، میزان سوسپانسیون تخمیری اضافه شده و pH سیستم) در جداسازی بتاگالاکتوزیداز استفاده شد. از بین سیستم های مطالعه شده گوناگون، سیستم با ۲۴ درصد وزنی پلی اتیلن گلایکول با وزن مولکولی ۲۰۰۰ و ۱۲ درصد وزنی نمک دی آمونیوم هیدروژن فسفات با ۵ درصد وزنی سوسپانسیون آنزیمی اضافه شده در pH=۷، بهترین نتایج را با درجه خلوص برابر با ۱۳/۷۱۸۱ نشان داد.

واژگان کلیدی: بتاگالاکتوزیداز، سیستم دوفازی آبی، پلی اتیلن گلایکول، طراحی فول فاکتوریل

Extraction of β-galactosidase enzyme from fermentation broth using aqueous two-phase system

Nushin Shahidi

abstract

One of the major challenges in the biotechnology industry is the purification of a desired protein from a fermentation broth containing a wide variety of biomolecules .The aim of this work isPartitioning of lipase using aqueous two phase systems (ATPS). ATPS has proved to be a valuable tool for separating and purifying mixtures of biomolecules. The partitioning behavior of β-galactosidase (from *Aspergilus niger*) studied in aqueous two-phase systems (ATPS) was composed of poly ethylene glycol (PEG) and a salt (di-ammonium hydrogen phosphate or di-potassiom hydrogen phosphate). The results demonstrated that the increase of PEG molecular weight leads to the decrease of yield (*Y*%), selectivity coefficient (S) and partition coefficients of β-galactosidase (K_e). The PEG2000/ $(NH_4)_2HPO_4$ system is suitable for the extraction of β-galactosidase from fermentation broth of *Aspergilus niger* PTCC 1050. In the following, multilevel factorial design was used to evaluate the effects of three independent variables (the weight ratio of PEG to salt, loaded fermentation broth, and pH of the system) on β-galactosidase extraction. Among the different conditions studied, a phase system containing composition of 24% (w/w) PEG 2000 and 12% (w/w) $(NH_4)_2HPO_4$ at pH=7 with loaded fermentation broth of 5% (w/w) produced the best overall results with purification factor of 13.7181.

Keywords : β-galactosidase; aqueous two-phase system; poly ethylene glycol; multilevel factorial design

مقدمه

سیستم های دوفازی آبی[۱] از حل شدن اجزای تشکیل دهنده فاز (پلیمر-نمک) یا (پلیمر - پلیمر) در آب که در نهایت منجر به تشکیل دوفاز می شود، حاصل می گردند. سیستم دوفازی آبی محیطی خاص می باشد که منجر به جداسازی بیومولکول ها یا مولکول های هدف، در یک فاز می شود. از آنجا که بخش عمده ای از هر دوفاز شامل آب می باشد(۸۵٪-۸۰٪) ساختار ذاتی بیومولکول ها حفظ می شود. برای فرآورده هایی مانند آنزیم ها، پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک، آنتی بیوتیک ها حفظ فعالیت بیولوژیکی تا آخرین مرحله خالص سازی ضروری می باشد. از آنجاکه اکثر بیومولکول ها دامنه پایداری بسیار کمی در برابر تغییرات pH ، درجه حرارت، فشار اسمزی، بار سطحی دارند مرحله چالش انگیز ومهم ، انتخاب روش مناسب جداسازی و تخلیص می باشد که برای محصولات، اختصاصی و با آن ها سازگار باشد. استخراج با استفاده از سیستم دوفازی آبی جایگزین بسیار مناسبی به جای مراحل متعدد فرآیندهای پایین دستی مانند تصفیه و تغلیظ می باشد. به علاوه انتقال جرم در این سیستم ها به سادگی حاصل و جداسازی به سرعت انجام می شود. سیستم دوفازی آبی قابلیت استفاده در مقیاس صنعتی[۲] را دارد. سیستم های دوفازی آبی پلیمر- پلیمر و سیستم های پلیمر- نمک نسبت به روش های متداول استخراج با حلال های آلی مزیت های بیشتری دارند [۱].

آنزیم بتاگالاکتوزیداز به طور متداول برای شکستن لاکتوز به گلوکز و گالاکتوز مورد استفاده قرار می‌گیرد و پیوند بتا- گالاکتوز موجود در ترکیبات مختلف را می شکند. بنابراین دارای کاربردهای گسترده ای در صنایع غذایی و دارویی می باشد. تاثیرات سودمند بالقوه بتاگالاکتوزیداز بر روی جذب غذاهای حاوی لاکتوز، به عنوان یک مزیت، امکان بهره گیری های محیطی و تکنولوژیکی از آن را فراهم کرده است و نیز موجب توسعه کاربرد های صنعتی آن گردید. رفع مشکلات مرتبط با آب پنیر، تبلور لاکتوز، تشکیل اولیگوساکارید ها طی فرایند هیدرولیز لاکتوز و کمک به مصرف شیر و فرآورده های لبنی توسط افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز از جمله کاربردهای آنزیم بتاگالاکتوزیداز می باشند. این آنزیم به طور ویژه جهت هیدرولیز شیر و محصولات تخمیری حاصل از آن مورد استفاده قرار می گیرد. انتخاب روش هیدرولیز لاکتوز در درجه اول به خصوصیات آنزیم، دارا بودن توجیه اقتصادی در تولید، ذخیره سازی و بازاریابی محصول بستگی دارد [۷، ۶، ۵، ۴، ۳ و ۲].

هضم ضعیف، قدرت شیرین کنندگی کم، حلالیت پایین و قابلیت تجزیه بیولوژیک ناچیز از جمله ویژگی هایی هستند که موجب توجه روز افزون به تولید و تخلیص آنزیم بتا گالاکتوزیداز در سراسر جهان شده اند [۷]. از زمانی که بتاگالاکتوزیداز در سیستم های بیولوژیکی و میکروارگانیسم ها شامل مخمرها، کپک ها و باکتری ها یافت شد، این منابع به عنوان بهترین منابع

---

[۱] Aqueous two phase system.

[۲] Scale up.

استخراج تجاری این آنزیم به شمار می آیند [۸]. از این رو انتخاب میکرو ارگانیسم هایی که دارای قابلیت بالایی برای تولید آنزیم می باشند، بسیار حائز اهمیت است [۹].

درفصل اول پژوهش حاضر مطالعات اولیه و خلاصه ای از مباحث تئوری لازم برای آشنایی با سیستم دو فازی آبی آورده شده است. در فصل دوم مروری بر تحقیقات انجام شده ارائه شده است. درفصل سوم مواد وروش های آزمایش ها توضیح داده شد. درفصل چهارم که شامل نتایج و بحث بوده، جهت تعیین مناسب ترین سیستم دو فازی آبی برای جداسازی آنزیم بتاگالاکتوزیداز، شرایط مختلف فرآیند جداسازی آنزیم در سیستم های دو فازی گوناگون بررسی شد و آزمایشات متنوعی انجام گردید. در انتخاب بهترین سیستم دو فازی آبی از روش فول فاکتوریل با نرم افزار مینی تب ۱۶ استفاده شد. همچنین متغیرهای مستقل که بر میزان استخراج آنزیم بتاگالاکتوزیداز در سیستم دوفازی آبی تأثیرگذار بودند معرفی گردیده و مورد بررسی قرار گرفتند. پس از حصول سیستم دو فازی مناسب پارامتر های مختلفی بر فرایند جداسازی آنزیم در سیستم دو فازی انتخاب شده مورد بررسی قرار گرفت. فصل پنجم نیز شامل نتیجه گیری کلی بوده که شرایط سیستم دو فازی مناسب برای استخراج آنزیم بتاگالاکتوزیداز حاصل از قارچ آسپرژیلوس نیجر معرفی گردید. در پایان پیشنهادات ارائه می گردد.

فصل اول
کلیات

۱-۱- سیستم های دو فازی آبی[۱]

گام مهم در طراحی هر سیستم فرآیند تخمیری، توسعه و رشد مناسب روش های موثر جداسازی و تخلیص محصولات مطلوب می باشد. چنین فرآیندهای پایین دستی[۲] باید جداسازی و تخلیص محصولات اصلی را از سایر ترکیبات مانند محصولات متابولیکی، مواد اولیه ، سوبسترای استفاده نشده و باقی مانده ی سلول ها در سوسپانسیون تخمیری تضمین نماید. لذا این نکته که ۹۰-۶۰ درصد از هزینه های فرآیندهای بیولوژیکی صرف فرآیند های پایین دستی برای تخلیص و جداسازی محصولات شود قابل انتظار می باشد. روش های متداول سنتی برای استخراج وجداسازی محصولات دارای معایبی می باشند. در سانتریفیوژ و ته نشینی، اندازه و دانسیته مواد دخالت دارند و تفکیک پذیری مطلوبی حاصل نمی‌گردد. همچنین هزینه انرژی برای محلول های ویسکوز بسیار زیاد می باشد. روش های کروماتوگرافی مانند ستون های کروماتوگرافی یا کروماتوگرافی مایعات پر فشار تنها قابلیت جابه جایی بخش کمی از خوراک را دارا می باشند [۱۰]. در بین فرآیند های موجود برای جداسازی محصولات فرآیندهای شیمیایی، استخراج مایع- مایع یک راهکار مناسب محسوب می شود. به طور کلی، استخراج مایع - مایع، با انتقال اجزاء خاص از یک فاز به فاز دیگر انجام می شود که این فاز ها در یکدیگر نامحلول یا نیمه محلول هستند و در تماس با هم قرار گرفته اند. اما استخراج مایع - مایع که در صنعت وبا به کار گیری حلال های آلی انجام می شود برای بازیابی محصولات فرآیندهای زیستی مناسب نمی باشد. بیومولکول هایی مانند پروتئین به اندازه کافی در حلال های آلی قابل انحلال نیستند و احتمال از بین رفتن آن ها وجود دارد. بنابراین جایگزین کردن سیستم آب و حلال آلی با سیستم های دوفازی آبی می تواند انجام شود. سیستم های دوفازی آبی شامل دو پلیمر ناسازگار، یک پلیمر و یک نمک ویا مواد فعال سطحی در محلول های آبی می باشد. اگر این اجزای تشکیل دهنده فاز ها درغلظتی بالاتر از غلظت بحرانی با هم آمیخته گردند، دوفازی شدن رخ خواهد داد. هر فاز به طور عمده شامل آب(۹۰-۷۰درصد وزنی) و یک جزء می باشد. ویژگی های متفاوت الکترواستاتیکی اجزای تشکیل دهنده هر فاز باعث می شود تا بیومولکول هایی مانند پروتئین ها و آنزیم ها در یک فاز تجمع یابند وجدایش آن ها از ناخالصی ها انجام شود [۱۱].اساس این جداسازی توزیع اختصاصی یک بیومولکول مشخص در دوفاز است که به مشخصه های فازها، خواص بیومولکول و برهمکنش میان آن ها بستگی دارد [۱۲]. به علت ماهیت آبی هر دوفاز و کشش سطحی کم (در مرتبه بزرگی ($۱۰^{-۵} N.m^{-1}$)) در سیستم دوفازی آبی، سطح تماس بسیار زیاد بین فازها وجود دارد و انتقال جرم مناسب از یک فاز به فاز دیگر انجام می شود. به علاوه، پلیمرهای مورد استفاده برای دوفازی شدن محلول آبی، نتایجی را ارائه می کنند که حاکی از افزایش فعالیت زیستی و پایداری پروتئین ها وآنزیم هاست. با توجه به شرایط

---

[۱] Aqueous two phase system.

[۲] down stream.

محیطی معمولی علاوه بر جداسازی سریع و مقرون به صرفه، از آن به عنوان یک روش جدید برای جداسازی پروتئین ها می-توان استفاده نمود [۱۳].سیستم دوفازی آبی تکنیکی برای جداسازی بیولوژیکی محسوب می شود. هردوسیستم دوفازی آبی پلیمر- پلیمر و پلیمر- نمک نسبت به سیستم های متداول و سنتی آب- حلال آلی دارای مزیت های بیشتری می باشند. از آنجا که هر دوفاز تا حد بسیار زیادی شامل آب بوده، سیستم بسیار ملایمی برای مواد بیولوژیکی فراهم می نمایند [۱۴].

۱-۱-۱- ساختار سیستم های دو فازی آبی

سیستم های دوتایی مایع می توانند با استفاده از محلول دو پلیمر یا یک پلیمر ویک نمک تشکیل شوند. این سیستم ها که با عنوان سیستم های دوفازی آبی[۱]بررسی می شوند در سال ۱۸۹۶ توسط ام.بیجرنیک[۲]، میکروبیولوژیست آلمانی با مشاهده دوفازی شدن محلول ژلاتین وآگار مورد توجه قرار گرفت. هرچند گزارش اولین مشاهده مورد توجه قرار نگرفت تا اینکه آلبرتسان[۳]، بیوشیمیدان سوئیسی در سال ۱۹۵۶ مشخصه های دوفازی شدن محلول آبی در حضور مواد خاص را بررسی کرد و آن را به عنوان یک پدیده جدید برای جداسازی اجزای غشای سلولی یا سایر اجزای داخل سلول از محصولات تجزیه ای سلولی و همچنین خالص سازی اختصاصی پروتئین ها وآنزیم ها معرفی کرد [۱۳]. دو فاز عمدتا از آب و اجزای غیر فرار تشکیل شده اند، بنابر این ترکیبات آلی فرار باید حذف شوند. ترکیب یک سیستم دوفازی آبی به وزن مولکولی پلیمر، غلظت پلیمر، pH، دما و نمک محلول بستگی دارد. به طور کلی پلیمر های مورد استفاده متشکل از پلی اتیلن گلایکول یا پلیمر های دیگر مانند دکستران است. تاکنون به دلیل ساختار معلوم شیمیایی و فیزیکی آن ها به طور گسترده استفاده شده اند. در مقابل حالت دوم شامل پلی اتیلن گلایکول و نمک های آمونیوم سولفات، آمونیوم فسفات وپتاسیم سیترات می باشد. این سیستم پلیمر- نمکی منجر به انتخاب پذیری بالاتر در جزء بندی پروتئین ومنجر به محصول غنی شده با بازدهی بالا در مرحله اول استخراج می شود. از آنجاکه این اجزای فاز نسبت به مواد بیولوژیکی ساکن هستند، از این رو می توانند برای جزءبندی بیومولکول ها و سلول های کامل به کار برده شوند. اساس جزءبندی به خواص سطحی ذرات و مولکول ها که شامل اندازه، جرم و خاصیت آبدوستی آن هاست بستگی دارد. محتوی آب بالا از مشخصه بارز یک سیستم دوفازی آبی است و زمانی که با بافر مناسب و نمک به خوبی تکمیل شود، منجر به فراهم کردن محیط مناسب برای مواد بیولوژیکی می شود. علاوه براین کشش سطحی کم بین دوفاز، جزء بندی پروتئین ها را ممکن می سازد. محتوی پلیمر موجود در اکثر سیستم های دوفازی آبی، به تثبیت آنزیم

---

[۱] Aqueous two phase system.

[۲] M.Beijernick.

[۳] Albertson.P.A.

ها و کاهش گنجایش آبی آن ها کمک می کند. همچنین قطرات کوچک که در چنین سیستم هایی به دست می آید ، فواصل کوتاه وسطح مقطع بزرگ به وجود می آورد که موجب تسهیل انتقال جرم می شود. جداسازی دوفاز مایع که تحت نیروی گرانش می باشد می تواند توسط سانتریفیوژ افزایش یابد. جزءبندی دوفاز یک پدیده پیچیده است که برهمکنش مواد جداشده وترکیبات هر فاز را درگیر می کند. تعدادی از برهمکنش های درگیر در جداسازی باند هیدروژنی، برهمکنش بار، نیروهای واندروالس، تعامل هیدروفوبیک و اثرات فضایی می باشند. علاوه براین توزیع مولکول ها بین دوفاز به جرم مولکولی و خواص شیمیایی پلیمرها و مولکول های تقسیم شده درهر دوفاز بستگی دارد [۱۳].

یک سیستم دوفازی تعادلی با پتانسیل لازم برای دست یابی به بازده و خلوص بالا، پاسخگوی همه ویژگی های یک تکنولوژی استخراج ایده‌آل می باشد. برای برگزیدن این روش برای فرآیند های در مقیاس صنعتی باید این روش شامل فرآیندهای بازیافتی باشد که استفاده آن را از نظر اقتصادی، امکانپذیر سازد. با این حال برای داروهای با قیمت بالای تولیدی با تکنولوژی نوترکیب، هزینه تولید فاز مواد شیمیایی، در مقایسه با بازده بالا،کاهش حجم وغنی سازی به دست آمده با مرحله استخراج قابل صرف نظر است. بنابراین با توجه به موارد فوق فقط آن دسته از سیستم های دوفازی آبی مناسب هستند که استخراج برگشتی محصولات به تسهیل برگشت ترکیب های فاز دست یافته است. سیستم دوفازی آبی، اغلب یک تکنولوژی فعال برای تخلیص پروتئین در مقیاس بزرگ می باشد. اما فاز های کارآمد تر برای فرآورش پایین دستی اقتصادی و موثر هنوز نیازمند توسعه است [۱۵].

۱-۱-۳- انواع سیستم های دوفازی آبی

تا به حال سیستم های دوفازی آبی بر اساس اجزاء تشکیل دهنده ی فازهای آن ها در چهار دسته اصلی طبقه بندی شده اند. ۱) پلیمر – پلیمر ۲) پلیمر – نمک ۳) مواد فعال سطحی ۴) مواد یونی – نمک . موارد سوم وچهارم جزء یافته های دانشمندان در سال های اخیر هستند وبه عنوان نو آوری در سیستم های دوفازی آبی مطرح شده اند [۱۶].

۱-۱-۲-۱- سیستم های دوفازی آبی پلیمر- پلیمر

در سیستم دوفازی آبی پلیمر - پلیمر، ویژگی های سطحی پلیمر هایی که از نظر الکترواستاتیکی غیر همسازگار هستند عامل دوفازی شدن آبی می باشد [۱۱].جدایی فاز درمحلولهای حاوی مخلوط پلیمری، یک پدیده بسیارمعمول است. درواقع امتزاج مخلوط پلیمر، یک استثنا است. اکثر پلیمرهای آبدوست در سیستم دوفازی آبی ناسازگارهستند و منجر به تشکیل دوفاز در