

بررسی بازیابی آلفاآمیلاز با سامانه دو فازي آبی در ابعاد میکرو

فرشاد راجی^۱ و احمد رهبر کلیشمی^{۲*}

۱. کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، آزمایشگاه فرایندهای پیشرفته جداسازی، دانشکده مهندسی شیمی نفت و گاز، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران.

۲. دانشیار گروه فرایندهای جداسازی، آزمایشگاه فرایندهای پیشرفته جداسازی، دانشکده مهندسی شیمی نفت و گاز، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران.

دریافت: تیر ۱۴۰۰ بازنگری: آبان ۱۴۰۰ پذیرش: آبان ۱۴۰۰

doi 10.30495/JACR.2022.692119

20.1001.1.17359937.1401.16.1.11.3

چکیده

سامانه دو فازي آبی ریزسیالی بستری مناسب برای جداسازی و بازیابی مواد زیستی در زمینه فناوری زیستی است. این سامانه امکاناتی را فراهم می‌کند که در روش‌های ماکرو امکان‌پذیر نیست یا به سختی قابل اجرا است. در این پژوهش، بازیابی آلفاآمیلاز با سامانه دو فازي آبی پلی‌اتیلن‌گلیکول / سدیم سیترات، بر یک دستگاه ریزسیال شیشه‌ای که با روش لیزر CO₂ ساخته شده، بررسی شد. عامل‌های مؤثر با مقادیر متفاوت غلظت (۵۰ تا ۱۲۵ mg/l) و سرعت جریان (۰/۸ تا ۲ ml/h) آزمایش شدند. روش سطح پاسخ (RSM) برای تعیین بهینه عامل‌های عملیاتی به‌کارگرفته شد. انتقال آلفا آمیلاز از فاز نمک به فاز پلی‌اتیلن‌گلیکول با الگوی جریان موازی، انجام شد. مقادیر به‌دست‌آمده در نقطه بهینه نیز در مقایسه با مقدار پیش‌بینی شده از معادله‌های طراحی آزمایش، خطای اندکی داشت. استفاده از سامانه ریزسیالی مورد مطالعه در این پژوهش به‌واسطه ابعاد میکرو، موجب افزایش بازیابی نسبت به سامانه‌های ماکرو خواهد بود. همین‌طور کاهش زمان این فرایند در ابعاد میکرو نسبت به ابعاد ماکرو قابل توجه بود.

واژه‌های کلیدی: ریزسیال، سامانه‌های دو فازي آبی، زیست‌مولکول، آلفاآمیلاز، استخراج

مقدمه

سامانه‌های دو فازي مایع-مایع برای جداسازی و خالص سازی زیست‌مولکول‌ها مورد توجه بوده است [۱ تا ۳]. استفاده از حلال‌های آلی در سامانه‌های دو فازي یک روش متداول است، ولی به دلیل اینکه مولکول‌ها در مواد آلی حل نمی‌شوند و بیشتر دچار تغییر ماهیت می‌شوند، محیط مناسبی

پیشرفت در بیوشیمی مستلزم توسعه در روش‌های جداسازی، استخراج و خالص‌سازی است. در مخلوط‌هایی با تعداد زیادی از اجزاء سلولی، هیچ روشی به تنهایی قادر به حل مساله جداسازی نیست. در سال‌های گذشته به‌کارگیری

پروتئین‌ها از دستگاهی شامل سه کانال ورودی که حاوی یک فاز غنی از پلی‌اتیلن گلايکول در جریان میانی و پتاسیم فسفات در دو جریان کناری برای تشکیل سامانه دو فازی آبی-نمک-پلی‌اتیلن گلايکول، استفاده کردند [۱۱]. به دلیل تفاوت زیاد گران‌روی بین پلی‌اتیلن گلايکول و فازهای نمک، این سامانه عدم تعادل جریان زیادی را نشان می‌داد و جریان نمک در طول آزمایش نسبت به جریان پلی‌اتیلن گلايکول، هشت برابر حجم بیشتر نیاز داشت. همچنین، لو و همکارانش افزون‌براین، رفتار سامانه‌های دو فازی آبی با یک فصل مشترک را با پلی‌اتیلن گلايکول و سدیم سولفات در یک دستگاه ریزسیالی ساده T-شکل بررسی کردند [۱۲]. هوانگ و همکارانش از سامانه‌های دو فازی آبی ریزسیالی با جریان‌های هم‌محور برای بازیابی آلومین سرم گاوی استفاده کردند. آن‌ها به همان بازده استخراج (۷۱٪) رسیدند که در یک سامانه ناپیوسته رخ داده بود. با این تفاوت که زمان بسیار کمتری صرف شده بود [۱۳]. نوک و همکارانش از سامانه دو فازی آبی با سه جریان ورودی برای استخراج آنزیم آلفا‌امیلاز استفاده کردند. سامانه دو فازی آبی ماکرومقیاس، آلفا‌امیلاز را از فاز پتاسیم فسفات با بازده ۷۴٪ در ۲/۵ ساعت استخراج کردند. سامانه ریزسیالی، استخراج را در ۱۰ ثانیه انجام داده بود، ولی تنها به بازده ۵۲٪ رسید. بازده استخراج به‌عنوان تفاوت غلظت بین ورودی و خروجی میکروکانال آلفا‌امیلاز تعریف شده بود [۱۴].

با توجه به مطالعه‌هایی که در زمینه سامانه‌های دو فازی آبی ریزسیالی انجام شده در این مطالعه‌ها اثر pH سرعت تزریق جریان بسیار و نمک و غلظت آلفا‌امیلاز بر بازده استخراج به‌طور محدود بررسی شده است و اینکه گران‌روی فازها بر ایجاد جریان موازی و بازده استخراج چه تاثیری دارد از خلأهای موجود در این زمینه است. در این پژوهش، اثر سرعت فازهای ورودی بر مقدار استخراج بررسی شد. دو فاز پلی‌اتیلن گلايکول ۴۰۰۰ و سدیم سیترات به‌عنوان فاز بسیار

برای جداسازی نیست. در این سامانه‌ها، زمان جدایی فاز تحت جاذبه به علت تفاوت کم چگالی دو فاز و گران‌روی آن‌ها، بین چند دقیقه تا چند ساعت طول می‌کشد [۴ تا ۶]. از طرفی، با توجه به اینکه در سامانه‌های دو فازی آبی کشش سطحی در سطح مشترک دو فاز به نسبت کم است، انتقال جرم بین دو فاز به سادگی و در زمان به نسبت کوتاهی صورت می‌گیرد [۷]. جداسازی مواد زیستی اهمیت ویژه‌ای نسبت به فرآورده‌های شیمیایی دارند و جداسازی این مواد باید بر مبنای روش‌های پیشرفته صورت گیرد.

روش‌های متداول جداسازی و خالص‌سازی مواد زیستی مانند پروتئین‌ها و مواد دارویی شامل رسوب‌دهی، جذب سطحی، سامانه‌های غشایی، گریزانه و سامانه‌های دو فازی آبی است که این سامانه‌ها به دلیل گران‌روی کم و زمان بسیار کوتاه برای جداسازی فازها کاربرد بیشتری نسبت به روش‌هایی مانند صاف کردن، به‌کارگیری گریزانه و غیره دارد. به دلیل ظرفیت بالا و سازگاری این سامانه با مواد زیستی بازدهی بالایی را ایجاد می‌کند. سامانه‌های ریزسیالی، مزایای ذاتی دارند که می‌توانند عملکرد سامانه‌های دو فازی آبی را تقویت کنند. سامانه‌های ریزسیالی می‌توانند هزینه‌های مواد مصرفی و حجم نمونه را به کمترین مقدار برسانند. در سامانه‌های ماکرومقیاس، جداسازی دو فاز آبی ممکن است ساعت‌ها طول بکشد و بیشتر اوقات هم‌زدن نیاز است. در حالی که در سامانه‌های ریزسیالی، جداسازی‌ها در چند ثانیه ممکن است رخ دهد [۸]. در سامانه‌های ماکرو، فازهای جدا شده آبی مانند طبقه‌های یک آپارتمان در یک گروه به صورت عمودی انباشته می‌شوند. در حالی که سامانه‌های ریزسیالی با میکروکانال چندگانه توانایی تشکیل فصل مشترک‌های چندگانه را دارا هستند [۹]. مونچو و همکارانش نخستین سامانه‌های دو فازی آبی با فصل مشترک دوگانه را در یک سامانه دو فازی آبی بسیار-بسیار نشان دادند [۱۰]. میقر و همکارانش برای جدا کردن

و نمک به کار گرفته شده و با توجه به گرانروی این دو فاز به بررسی سرعت‌هایی که در آن‌ها جریان موزای حاکم بود، پرداخته شد.

بخش تجربی

مواد و روش‌ها

جزئیات ویژگی‌های بسپار و نمک آلی مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. در همه آزمایش‌ها از آب دوبار تقطیر استفاده شد. آنزیم مورد استفاده، آنزیم آلفا آمیلا (EC 3/2/1/1) با سیلوس سبستیلیس با خلوص ۹۹٪ و جرم مولکولی ۵۷٫۶kDA از شرکت سیگما-آلدیرج خریداری شد.

جدول ۱ ترکیب‌های شیمیایی مورد استفاده

نام ماده	ساختار شیمیایی	فرمول مولکولی	چگالی (g/cm ³)	شرکت سازنده
تری سدیم سیترات		Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	۱٫۷	مرک
پلی اتیلن گلیکول		C _{2n} H _{4n+2} O _{n+1}	۱٫۱۲	مرک

ساخت میکروکانال شیشه‌ای

در ساخت میکروکانال‌ها از شیشه پیرکس و ایزوپروپیل الکل خریداری شده از شرکت مرک آلمان به عنوان واکنشگر استفاده شد. شیشه از مزایایی همچون ثبات سطح، بی‌اثر شیمیایی، سازگار با محیط زیست و سازگار با حلال‌های آلی بهره می‌برد. با به کارگیری روش لیزر CO₂ با حکاکی سریع و ارزان، طرح از پیش طراحی شده با عرض ۴۰۰، عمق ۳۰۰ میکرون و در طول ۸ سانتی‌متر بر شیشه حکاکی شد. پس از شست‌وشو سطح کانال با ایزوپروپیل الکل از روش پیوند مستقیم شیشه زیرین و رویی درون کوره استفاده شد. زمانی

که ورقه‌ها به‌طور کامل به هم پیوند داده شدند آب‌بندی کانال بررسی شد [۱۵].

سامانه دو فازی آبی ریزسیالی

در این پژوهش از سامانه دو فازی آبی پلی اتیلن - گلیکول ۴۰۰۰ / سدیم سیترات استفاده شد. محلول حاوی (w/w) ۱۹٫۷٪ پلی اتیلن گلیکول و (w/w) ۲۰٫۴٪ سدیم سیترات در آب دو بار تقطیر تهیه شد. به دلیل مشکل‌های بازیابی نمک‌هایی مانند فسفات‌ها و سولفات‌ها و مسائل زیست‌محیطی به وجودآمده ناشی از آن‌ها، پژوهشگران به سمت نمک‌هایی که ساده‌تر تجزیه می‌شوند، همچون نمک‌های سیترات، سوق داده شده‌اند. برای رسم منحنی بینودال از روش تیتراکردن نقطه ابری در دمای ۲۵ °C استفاده شد. در این روش ابتدا محلول پایه و شفاف از نمک تری سدیم سیترات تهیه شد. سپس با بورت محلول غلیظ و شفاف پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰۰ قطره قطره به محلول نمک در حال اختلاط افزوده شد. عبور نور از سامانه بسپار + نمک + آب و شفافیت آن نشان‌دهنده سامانه تک فاز و گذردن آن نشان‌دهنده تشکیل سامانه دو فاز است. بنابراین، هنگامی که نخستین قطره از بسپار محلول را کدر کرد، عمل افزودن قطع و حجم افزوده شده یادداشت شد. سپس، برای تعیین نقطه بعدی بر منحنی بینودال، به محلول کدر درون بشر مقدار ناچیزی آب دو بار تقطیر شده به صورت قطره‌قطره افزوده شد تا به حالت شفاف و تک فاز درآید. حجم دقیق آب افزوده شده یادداشت شد. دوباره عمل افزودن محلول بسپار ادامه داده شد تا محلول درون بشر کدر شود. به همین صورت نقاط بعدی نیز به دست آمد. از روی حجم‌های یادداشت‌شده می‌توان با استفاده از چگالی محلول‌های آبی بسپار، درصد وزنی مقدار بسپار افزوده شده را محاسبه کرد [۱۶ و ۱۷].

که در آن R نسبت حجم فاز بالایی به فاز پایینی تعریف می‌شود که در این پژوهش، فاز بالا غنی از پلی‌اتیلن - گلایکول و فاز پایین غنی از نمک است [۱۸ و ۱۹].

مشخصه‌یابی

برای بررسی تعیین غلظت آلفاآمیلاز با دستگاه UV-Visible (Shimazu UV-1800, Japan) در طول موج ۲۸۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. از ۶ محلول استاندارد با غلظت‌های متفاوت برای تهیه منحنی واسنجی استفاده شد.

طراحی آزمایش

روش سطح پاسخ یک شاخه مهم از طراحی آزمایش و یک فناوری مهم در توسعه یک فرایند جدید و بهینه‌سازی عملکرد آن برای بهتر کردن کیفیت و ساختار فراورده جدید است. مراحل طراحی به روش سطح پاسخ شامل مراحل زیر است:

۱. انتخاب متغیرهای مستقل که بیشترین تأثیر را بر فرایند دارند.
۲. انتخاب طراحی آزمایش و تهیه ماتریس آزمایش‌ها برپایه مدل طراحی انتخاب‌شده
۳. انتخاب محاسبه‌های ریاضی-آماری برای مدل کردن تابع چندجمله‌ای
۴. بررسی اهمیت و مناسب بودن مدل

۵. به دست آوردن مقدار بهینه برای هر کدام از متغیرها در روش طراحی آزمایش ابتدا باید عامل‌ها یا متغیرهای تأثیرگذار بر فرایند جداسازی انتخاب شوند. در مطالعه حاضر، ۳ عامل غلظت آنزیم، pH و سرعت جریان متغیرهای مهمی هستند که برای بازیابی آنزیم‌ها مطالعه شده‌اند. برای مطالعه تأثیر هم‌زمان عامل‌های عملیاتی در چندین سطح، از نرم‌افزار Design expert (نسخه ۱۱/۰) استفاده شد. پاسخ موردنظر برحسب مقدار بازدهی بازیابی آنزیم‌ها با سامانه دو فاز آبی پلی‌اتیلن گلایکول-سدیم سترات تعریف شده است. مقدار

در این پژوهش از میکروکانال با ورودی Y-شکل استفاده شده است. آمیلازها از جمله آنزیم‌های پرکاربرد صنعتی هستند، آمیلازها ساختاری پروتئینی دارند و به سه زیر گروه آلفاآمیلاز، بتاآمیلاز و گاماآمیلاز (γ -Amylase) گروه‌بندی می‌شوند. آمیلازها تنها آنزیم‌هایی هستند که توسط گیاهان، حیوان‌ها و ریزاندامگان‌ها تولید می‌شوند و نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها دارند. سامانه دو فاز آبی-نمک به دلیل مزایایی زیاد نسبت به سامانه‌های بسیار-بسیار و سامانه‌های شامل مایع یونی مور استفاده قرار گرفت. پمپ سرنگی مدل 4SP94-1 ساخت شرکت زیست‌راد ایران، به کار گرفته شد. همه سامانه‌های دو فاز آبی با وزن برابر از محلول‌های نمکی (در غلظت (w/w) ۰/۴٪) و محلول پلی‌اتیلن گلایکول (در غلظت (w/w) ۱۹/۷٪) تهیه شدند. در طول انجام آزمایش سرعت جمع‌آوری و حرکت درون میکروکانال از ۰/۸ تا ۲ ml/h است. در طول مراحل انجام آزمایش به علت تفاوت گرانروی دو محلول، سرعت جریان فاز نمک دو برابر سرعت جریان فاز پلی‌اتیلن گلایکول است. از این رو، محلول با گرانروی بیشتر (فاز پلی‌اتیلن گلایکول) اگر با سرعت برابر تزریق شود به مرور کل سطح کانال را پوشانده و اجازه ورود به فاز با گرانروی کمتر (فاز نمک) را نمی‌دهد. در همه این سرعت‌ها جریان، الگوی جریان موازی حاکم است. پایداری جریان‌های موازی در ورودی، خروجی و همچنین، دو فصل مشترک موجود در کانال اصلی و انتقال آلفاآمیلاز به فاز بسیار با میکروسکوپ مدل HR3-TRF-P از HUVITZ واپایش و عکس برداری شد. ضرایب پارتیشن (K) و بازده استخراج ($Y_e\%$) آنزیم‌ها با معادله‌های ۱ و ۲ محاسبه شدند.

$$K = \frac{C_t}{C_b} \quad (1)$$

$$Y_e\% = \frac{100}{(RK)^{-1} + 1} \quad (2)$$

ضرایب خطی، مرتبه دوم و برهم کنش دو متغیر و error مقدار خطا است [۲۰].

جدول ۲ گستره عامل‌های مورد مطالعه و سطح آن‌ها

عامل	نام	واحد	نوع	سطح پایین	سطح بالا
A	pH	-	عددی	۵	۹
B	سرعت جریان	ml/h	عددی	۰٫۸	۲
C	غلظت	mg/l	عددی	۵۰	۱۲۵

مدل درجه دوم پیش‌بینی بازیابی آلفا آمیلاز در معادله ۴ ارائه شده است.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^m \beta_i X_i + \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^m \beta_{ii} X_i^2 + error \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{در معادله ۴ ضرایب معادله به دست آمده از وایزش، بر مبنای مقادیر در نظر گرفته شده از متغیرهای مستقل، pH، سرعت جریان و غلظت آنزیم به دست آمده است. نتیجه آزمایش و مقدار پیش‌بینی شده در جدول ۳ نشان داده شده است. بررسی مدل پیش‌بینی شده با تحلیل وردایی، ضریب تعیین (R²) و نمودارهای آماری انجام شد. تحلیل وردایی: با تجزیه و تحلیل وردایی و نمودارهای آماری مدل پیشنهادی بررسی شد. در تجزیه و تحلیل نتیجه‌های به دست آمده از آزمایش‌ها نکته مهم این است که مشخص شود آیا تغییرهای مشاهده شده در پاسخ ناشی از تغییر سطوح عامل‌های مورد نظر است یا این تغییرها تنها به خطاهای تصادفی اندازه‌گیری‌ها مربوط می‌شوند. نرم‌افزار طراحی آزمایش تحلیل داده‌های جمع‌آوری شده را با جدول ANOVA نمایش می‌دهد. جدول ۴ نشان‌دهنده تحلیل وردایی است. ضریب تعیین: ضریب تعیین (R² = ۰٫۹۸۶۶) که نزدیک به ۱ است نشان‌دهنده همبستگی بالا بین مقادیر مشاهده شده$$

پیش‌بینی شده است که اعتبار مدل را تأیید می‌کند. مقدار ضریب تعیین تنظیم شده^۱ برابر ۰٫۹۷۴۶ و به طور کامل مناسب است. مقدار دقت کافی^۲ که نشان‌دهنده تفاوت بین مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر میانگین خطای پیش‌بینی شده است. باید بزرگتر از ۴ باشد که در این مطالعه برابر ۲۹٫۴۸۱۹ است. مقدار متغیر آماری P کمتر از ۰٫۰۵ نشان‌دهنده دقت بالای مدل‌های ارائه شده است و مقادیر P بزرگتر از ۰٫۰۱ نشان‌دهنده دقت پایین مدل‌های ارائه شده است. همان‌طور که در جدول نشان داده شده مقدار متغیر آماری P مدل پیشنهادی کمتر از ۰٫۰۵ است. بنابراین، بررسی کامل برآوردهای آماری نشان داد که مدل ارائه شده برای پیش‌بینی پاسخ متغیرها از نقطه نظر آماری در گستره مورد قبولی قرار دارد. نقص برازش^۳ مدل برابر است با ۰٫۷۵۰۷ که می‌تواند ناچیز شمرده شود و مدل به خوبی متناسب می‌شود.

بازدهی استخراج برپایه معادله ۲ محاسبه شد. گستره متغیرها و سطوح استفاده شده در جدول ۱ گزارش شده است. همچنین، از معادله چندجمله‌ای درجه دوم برای پیش‌بینی بازیابی آلفا آمیلاز از معادله ۳ استفاده شد.

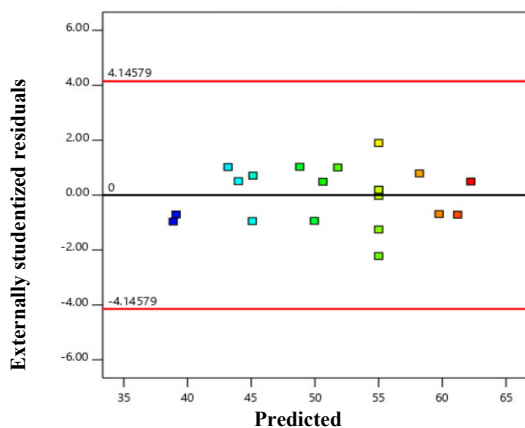
که در آن، متغیر Y پاسخ پیش‌بینی شده، β_0 ضریب ثابت، X_1 و X_j مقدار متغیرهای مستقل، $\beta_1, \beta_{11}, \beta_{ij}$ و β_{ij} به ترتیب

1. Adjusted R²

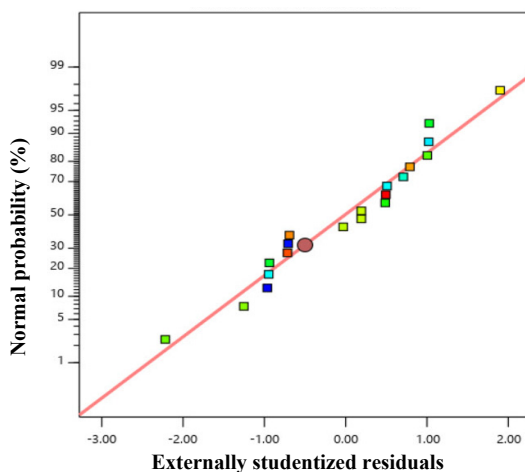
2. Adequate precision

3. Lack of fit

نشان می‌دهد که همخوانی خوبی بین پاسخ پیش‌بینی شده و پاسخ تجربی وجود دارد. بنابراین، مدل چندجمله‌ای درجه دوم از نظر آماری توانایی پیش‌بینی دقیق مقدار بازیابی آلفامیلاز را دارد.



شکل ۱ نمودار مانده برای بازیابی آلفامیلاز



شکل ۲ نمودار احتمال نرمال در مقابل مقدار باقی‌مانده برای بازیابی آلفامیلاز

جدول ۳ نتیجه‌های محاسبه‌شده و پیش‌بینی شده بازده بازیابی آلفامیلاز

آزمایش -	متغیرها			پاسخ (%)
	pH	سرعت جریان	غلظت	
۱	۷	۱٫۴	۷۵	۵۵٫۰۰۰۲۵
۲	۶	۱٫۷	۱۰۰	۵۸٫۲۰۰۷۶
۳	۶	۱٫۷	۵۰	۵۰٫۶۲۹۰۶
۴	۸	۱٫۱	۵۰	۴۵٫۱۳۶۶۹
۵	۵	۱٫۴	۷۵	۳۹٫۱۰۷۰۸
۶	۷	۱٫۴	۷۵	۵۵٫۰۰۰۲۵
۷	۷	۱٫۴	۷۵	۵۵٫۰۰۰۲۵
۸	۷	۱٫۴	۲۵	۴۹٫۹۵۶۰۵
۹	۷	۱٫۴	۷۵	۵۵٫۰۰۰۲۵
۱۰	۷	۱٫۴	۷۵	۵۵٫۰۰۰۲۵
۱۱	۷	۰٫۸	۷۵	۳۸٫۸۷۹۶۹
۱۲	۷	۱٫۴	۷۵	۵۵٫۰۰۰۲۵
۱۳	۷	۱٫۴	۱۲۵	۶۱٫۱۹۹۴۵
۱۴	۹	۱٫۴	۷۵	۴۵٫۰۸۹۸۲
۱۵	۸	۱٫۷	۱۰۰	۶۲٫۳۳۲۱۳
۱۶	۸	۱٫۷	۵۰	۵۱٫۷۹۵۴۳
۱۷	۶	۱٫۱	۵۰	۴۳٫۱۸۵۳۱
۱۸	۷	۲٫۰	۷۵	۵۹٫۷۴۷۱۸
۱۹	۶	۱٫۱	۱۰۰	۴۳٫۹۹۲۰۱
۲۰	۸	۱٫۱	۱۰۰	۴۸٫۸۰۸۳۹

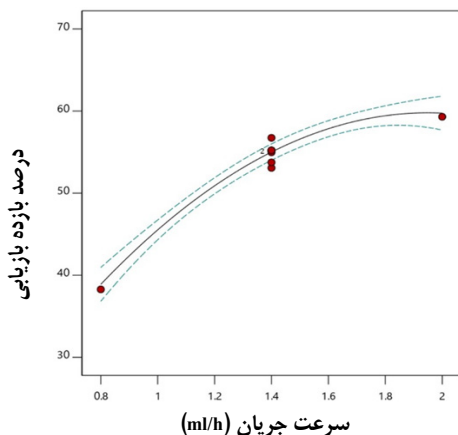
در این حالت، همه داده‌ها باید در گستره $\pm 4/14579$ باشند. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، همه داده‌ها در این گستره هستند. این همخوانی نشان می‌دهد که مشکلی در مدل پیشنهادی وجود ندارد.

شکل ۲ نمودار احتمال بهنجار در مقابل مقدار باقی‌مانده را نشان می‌دهد، که داده‌های استفاده شده نزدیک به خط مستقیم است و فرض طبیعی بودن داده‌های تجربی را اثبات می‌کند. نمودار مقادیر پیش‌بینی شده در برابر مقادیر واقعی برای بازیابی آلفامیلاز در شکل ۳ نشان داده شده است. توزیع مناسب نقاط در اطراف خط مورب (خط ۴۵ درجه)

نتيجه‌ها و بحث

تأثير سرعت جريان

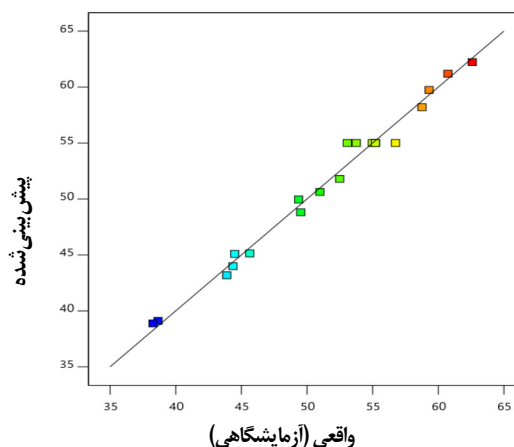
تأثير تغيير سرعت جريان فازهاي متفاوت در گستره‌اي كه جريان موازي بوده برسي شد. با توجه به شكل ۴ بر خلاف آنچه در سرعت جريان‌هاي پايين مشاهده شد؛ با افزايش سرعت جريان، نيروي محرکه انتقال جرم از فاز نمك به فاز PEG با افزايش همراه شد. بازده بازیابی محاسبه شده با سرعت جريان ۱ ml/h به ۵۸/۶۷٪ و با افزايش بود و با سرعت جريان ۲ ml/h به ۵۹/۵۶٪ رسيد.



شكل ۴ تأثير سرعت جريان بر بازده بازیابی آلفا آمیلاز در غلظت اوليه آلفا آمیلاز برابر با ۷۵mg/l و pH برابر ۷

تأثير pH

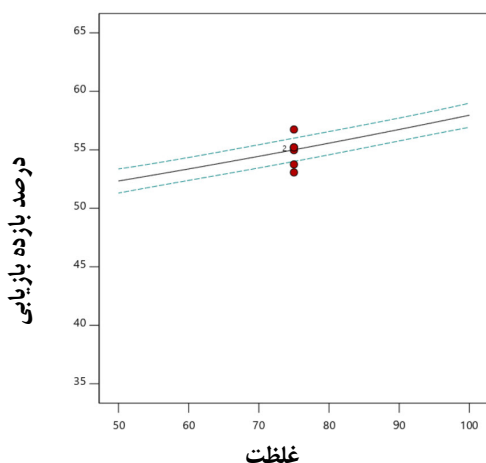
تأثير pH بر تفكيك زیست مولكول‌ها با تغيير زیست مولكول و نیز نوع سامانه دو فازي آبي تغيير می‌کند. pH موجب تغيير ساختار زیست مولكول می‌شود و رفتار تفكيك آن را متحول می‌سازد. تغيير در مقدار استخراج را می‌توان با در نظر گرفتن بار سطح زیست مولكول در مقایسه با نقطه هم بار آن (pI) توضیح داد. وقتی pH سامانه بالاتر از pI آلفا آمیلاز است، آلفا آمیلاز بار منفي خالص را حمل می‌کند. مشاهده شد كه



شكل ۳ همخوانی بين مقادير پیش‌بینی شده و آزمایشگاهی بازده بازیابی آلفا آمیلاز

جدول ۴ تحليل وردایی برای استخراج ریزسیالی آلفا آمیلاز

منبع	مجموع مربع‌ها	DF	میانگین مربع‌ها	مقدار F	مقدار P	مهم
مدل	۹۲۵/۹۹	۹	۱۰۲/۸۹	۸۱/۹۹	< ۰/۰۰۰۱	
A-pH	۳۵/۷۹	۱	۳۵/۷۹	۲۸/۵۲	۰/۰۰۰۳	
سرعت جريان-B	۴۳۵/۴۵	۱	۴۳۵/۴۵	۳۴۶/۹۹	< ۰/۰۰۰۱	
غلظت-C	۱۲۶/۵۱	۱	۱۲۶/۵۱	۱۰۰/۸۱	< ۰/۰۰۰۱	
AB	۰/۳۰۸۱	۱	۰/۳۰۸۱	۰/۲۴۵۵	۰/۶۳۱۰	
AC	۴/۱۰	۱	۴/۱۰	۳/۲۷	۰/۱۰۰۷	
BC	۲۲/۸۸	۱	۲۲/۸۸	۱۸/۲۳	۰/۰۰۱۶	
A ²	۲۶۱/۵۸	۱	۲۶۱/۵۸	۲۰۸/۴۴	< ۰/۰۰۰۱	
B ²	۵۰/۸۲	۱	۵۰/۸۲	۴۰/۵۰	< ۰/۰۰۰۱	
C ²	۰/۵۲۵۳	۱	۰/۵۲۵۳	۰/۴۱۸۶	۰/۵۳۲۲	
باقی مانده	۱۲/۵۵	۱۰	۱/۲۵			
نقص برازش	۴/۳۳	۵	۰/۸۶۵۸	۰/۵۲۶۶	۰/۷۵۰۷	ناچیز
خطای خالص	۸/۲۲	۵	۱/۶۴			
مجموع	۹۳۸/۵۴	۱۹				



شکل ۶ تأثیر غلظت اولیه آلفا آمیلاز بر بازده بازیابی آلفا آمیلاز در pH برابر با ۷ و سرعت جریان ۱/۴ ml/h

تعیین مقدار عامل‌ها در حالت بهینه

برپایه جدول ۵، مقادیر بهینه از متغیرهای عملیاتی برای دستیابی به بیشینه درصد بازیابی آلفا آمیلاز تعیین شد. مقدار بازیابی محاسبه شده در نقطه بهینه آزمایش انجام پذیرفت که با مقدار به دست آمده از طراحی آزمایش مقایسه شد. همان طور که در جدول ۵ نشان داده شده است، درصد خطا کمتر از ۱٪ به دست می آید. بنابراین، مدل پیشنهادی می تواند بازیابی آلفا آمیلاز را به عنوان گستره عملیاتی این پژوهش پیش بینی کند [۲۲].

جدول ۵ مقادیر بهینه عامل‌ها و درصد بازیابی پیش بینی شده و تجربی

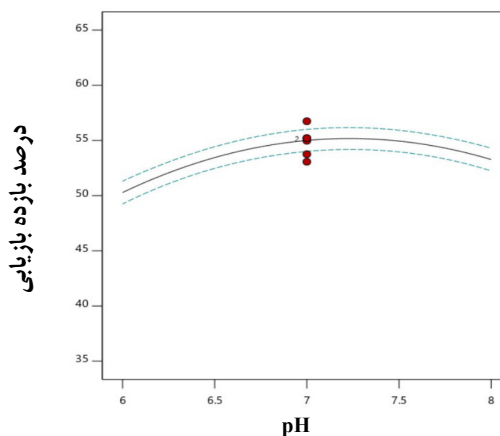
مقادیر بهینه	عامل
۷/۴۱	pH
۱/۶۸	نرخ جریان (ml/h)
۹۷/۶	غلظت آلفا آمیلاز (mg/l)
واقعی پیش بینی شده درصد خطا	درصد بازیابی آلفا آمیلاز
۰/۵۴ ۶۳/۰۸ ۶۲/۷۴	

افزایش و کاهش میزان بازیابی آلفا آمیلاز با pH سامانه در حالی که در گستره ۵/۰ تا ۷/۰ بود، ارتباط مستقیم داشت. همان طور که در شکل ۵ مشخص است، با افزایش pH، مقدار بازیابی نیز افزایش می یابد. کاهش میزان استخراج در pH بیشتر از ۷/۰ ممکن است به دلیل غلبه بر نیروی الکترواستاتیک بر نیروی آب گریز باشد [۲۱].

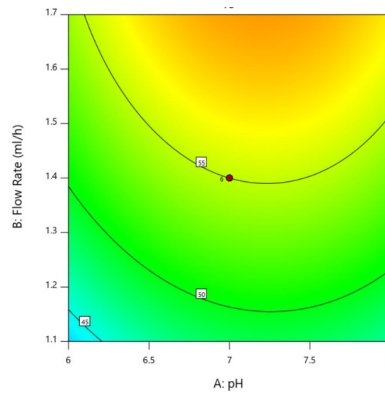
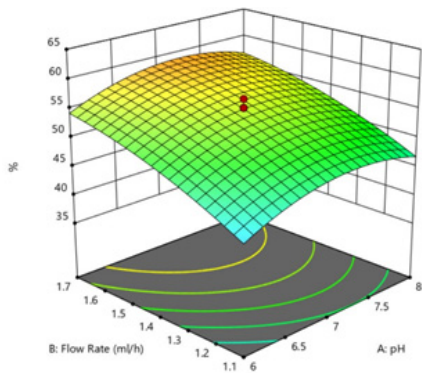
تأثیر غلظت اولیه آلفا آمیلاز

مقدار زیست مولکول موجود در سامانه دو فازی آبی تأثیر مهمی بر تفکیک آن‌ها داشت. با افزایش غلظت آلفا آمیلاز در سامانه دو فازی آبی، ناخالصی‌ها در فاز نمک افزایش یافت. با افزایش غلظت آلفا آمیلاز از مقادیر کم تا متوسط، بازیابی آلفا آمیلاز افزایش و پس از آن کاهش یافت (شکل ۶).

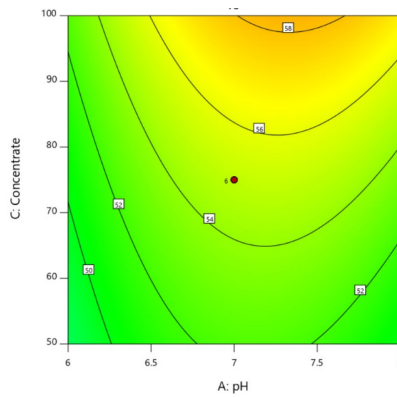
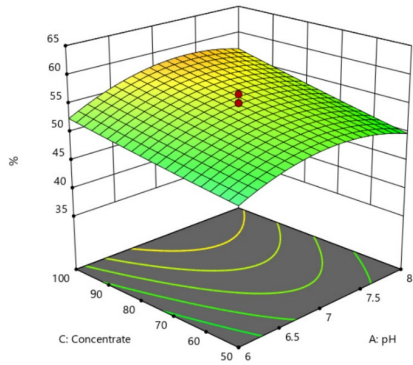
همچنین، در شکل ۷ تأثیر متقابل عامل‌ها نشان داده شده است.



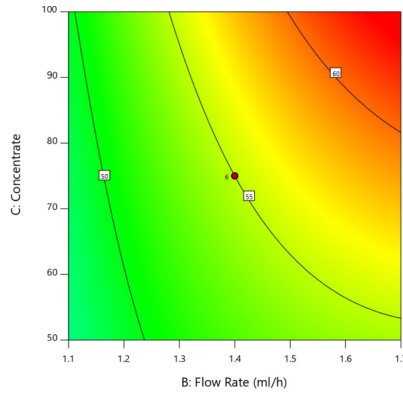
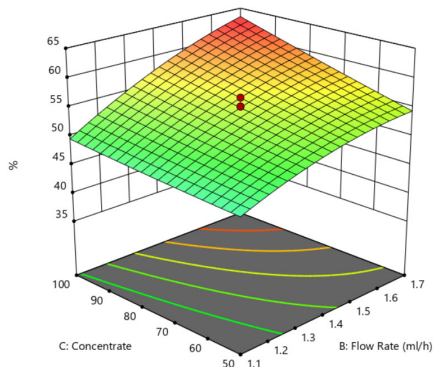
شکل ۵ تأثیر pH فاز خوراک بر بازده بازیابی آلفا آمیلاز در غلظت اولیه آلفا آمیلاز برابر با ۷۵mg/l و سرعت جریان ۱/۴ ml/h



الف



ب



ج

شکل ۷ نمودار سطح پاسخ بازیابی آلفا آمیلاز. تأثیر متقابل بین سرعت جریان و pH در غلظت اولیه آلفا آمیلاز ۷۵ mg/l (الف)، تأثیر متقابل بین غلظت اولیه آلفا آمیلاز و pH در سرعت جریان ۱/۴ ml/h (ب) و تأثیر متقابل بین سرعت جریان و غلظت اولیه آلفا آمیلاز در pH برابر با ۷ (ج)

۰۹۷/۶ mg/l و غلظت آلفاآمیلاز ۷/۴۱ برابر pH، ۱/۶۸ ml/h بازبایی ۶۳/۰۸٪ به دست آمد. افزون‌براین، استفاده از سامانه‌های ریزسیالی در عملکرد بازبایی آلفاآمیلاز موجب کاهش زمان عملیات شد. رفتار زیست‌مولکول‌ها در محیط دو فاز آبی بی‌همتا است. این به دلیل واکنش‌های شیمیایی و فیزیکی مربوط به آب‌گریزی سطح، بار و اندازه است که در روند تقسیم نقش دارند و در محیط ریزسیال اهمیت ویژه‌ای پیدا می‌کنند. تراشه تولیدشده برای بازبایی آلفاآمیلاز به‌عنوان نمونه‌ای از کاربرد آزمایشگاه بر روی تراشه قادر به نظارت و بهینه‌سازی فرایند استخراج و خالص‌سازی زیست مولکول‌هاست. مدل پیشنهادی می‌تواند مدل خوبی برای بهینه‌سازی عامل‌های موردبررسی در این پژوهش باشد.

نتیجه‌گیری

سامانه دو فاز آبی نسبت به سامانه‌های متداول و سنتی آبی-حلال آلی دارای مزیت‌های بیشتری است که در صورت ترکیب با سامانه‌های ریزسیالی این مزیت‌ها و کاربرد آن دو چندان می‌شود. نتیجه‌های به‌دست‌آمده بسیار امیدوارکننده بود و نشان داد که ترکیب سامانه دو فاز آبی با ریزسیال، پتانسیل بالایی برای تبدیل شدن به روشی بی‌نقص برای جداسازی مولکول‌های زیستی است. در این پژوهش، یک سامانه ریزسیال با عرض ۴۰۰ vp و عمق ۳۰۰ میکرون و در طول ۸ سانتی‌متر، با روش لیزر CO₂ برپایه شیشه ساخته شد و با موفقیت برای بازبایی آلفا-آمیلاز با سامانه دو فاز آبی مورد بررسی قرار گرفت. ایجاد یک جریان آرام با الگوی جریان موازی و پیوسته امکان‌پذیر شد. در سرعت جریان

مراجع

- [1] Pazuki, G.R.; Taghikhani, V.; Vossoughi, M.; Part. Sci. Technol. 28, 67–73, 2010.
- [2] Tehrani, M.A.S.; Haghtalab, A.; J. Chem. Eng. Data. 64, 5448–5461, 2019.
- [3] Soares, R.R.G.; Silva, D.F.C.; Fernandes, P.; Azevedo, A.M.; Chu, V.; Conde, J.P.; Aires-Barros, M.R.; Biotechnol. J. 11, 1498–1512, 2016.
- [4] Yin, C.Y.; Nikoloski, A.N.; Wang, M.; Miner. Eng. 45, 18–21, 2013.
- [5] Xu, C.; Xie, T.; Ind. Eng. Chem. Res. 56, 7593–7622, 2017.
- [6] Abbasi, A.; Seifollahi, Z.; Rahbar-kelishami, A.; Sep. Sci. Tech. 56, 1047-1059, 2020.
- [7] Farahani, A.; Rahbar-kelishami, A.; Shayesteh, H.; Sep. Purif. Technol. 258, 118031, 2020.
- [8] Hardt, S.; Hahn, T.; Lab on a Chip 12, 434–442, 2012.
- [9] Vicente, F.A.; Plazl, I.; Ventura, S.P.M.; Žnidaršič-Plazl, P.; Green Chem. 22, 4391–4410, 2020.
- [10] Münchow, G.; Schönfeld, F.; Hardt, S.; Graf, K.; Langmuir 83, 8547–8553, 2008.
- [11] Meagher, R.J.; Light, Y.K.; Singh, A.K.; Lab on a Chip 8, 527–532, 2008.
- [12] Lu, Y.; Xia, Y.; Luo, G.; Microfluid. Nanofluidics 10, 1079–1086, 2011.
- [13] Huang, Y.; Meng, T.; Guo, T.; Li, W.; Yan, W.; Li, X.; Wang, S.; Tong, Z.; Microfluidics and Nanofluidics 16, 483–491, 2014.
- [14] Novak, U.; Lakner, M.; Plazl, I.; Žnidaršič-Plazl, P.; Microfluidics and Nanofluidics 19, 75–83, 2015.
- [15] Abbasi, A.; Rahbar-kelishami, A.; Ghasemi, M.J.; J. Rare Earths 36, 1198–1204, 2018.
- [16] Wysoczanska, K.; Macedo, E.A.; Fluid Phase Equilib. 428, 84–91, 2016.
- [17] Raji, F.; Rahbar-kelishami, A.; Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 624, 126823, 2021.
- [18] Saha, D.; Mukherjee, A.; Biophys. Rev. 10, 795–808, 2018.
- [19] Raji, F.; Rahbar-kelishami, A.; Chem. Eng. Process. - Process Intensif. 163, 108370, 2021.
- [20] Jalilvand, P.; Rahbar-kelishami, A.; Mohammadi, T.; Shayesteh, H.; J. Mol. Liq. 308, 113014, 2020.
- [21] Albertsson, P.; Adv. Protein Chem. 24, 309–341, 1970.
- [22] Azarang, A.; Rahbar-kelishami, A.; Norouzbeigi, R.; Shayesteh, H.; Environ. Technol. Innov. 15, 100432, 2019.

Study of alpha-amylase recovery by aqueous two-phase system in micro dimensions

Farshad Raji¹, Ahmad Rahbar Kelishami^{2,*}

1. M.Sc. in Chemical Engineering, Research Lab for Advanced Separation Processes, Faculty of Chemical, Petroleum and Gas Engineering, Iran University of Science and Technology (IUST), Tehran, Iran.

2. Associate of Chemical Engineering, Research Lab for Advanced Separation Processes, Faculty of Chemical, Petroleum and Gas Engineering, Iran University of Science and Technology (IUST), Tehran, Iran.

Abstract: The microfluidic aqueous two-phase system is a suitable platform for the separation and recovery of biomaterials in the field of biotechnology that is not possible or is difficult to achieve in macro methods. In this research, alpha-amylase recovery was investigated with an aqueous two-phase polyethylene glycol/sodium citrate system on a glass microfluidic device made by the Co₂-laser method. Effective parameters were tested with different values of concentration (125-150 mg / l) and flow rate (0.8-2 ml / h). The response surface method (RSM) was used to optimally determine the operational parameters. Transfer of alpha-amylase from the salt phase to the polyethylene glycol phase was performed with a parallel flow pattern. The values obtained at the optimal point also had a small error compared to the predicted value of the experimental design equations. The use of the microfluidic system studied in this research will increase the recovery rate compared to macro systems. Also, the reduction of the time of this process in the micro dimensions compared to macro dimensions was significant.

Keywords: Microfluidics, Aqueous Two-phase Systems, Biomolecules, Alpha-amylase, Extraction