

## بررسی استخراج میسل معکوس اریتروماپسین با استفاده از طراحی آزمایش OFAT

سروه کامروا، پریسا حجازی\*

تهران، دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکده مهندسی شیمی، آزمایشگاه بیوتکنولوژی، کدپستی: ۱۳۱۱۴-۱۶۸۴۶،  
(phejazi@iust.ac.ir)

مشخصات مقاله	چکیده
<b>تاریخچه مقاله:</b> دریافت: ۲۹ مرداد ۹۰ دریافت پس از اصلاح: ۲ آبان ۹۰ پذیرش نهایی: ۹ آذر ۹۰	در این تحقیق از روش استخراج میسل معکوس با استفاده از سورفکتانت آنیونی AOT و حلال ایزواکتان برای جداسازی آنتی بیوتیک اریتروماپسین استفاده شد. عوامل موثر بر استخراج جلوگرد و عقبگرد میسل معکوس شامل pH، غلظت نمک، غلظت سورفکتانت، غلظت اولیه آنتی بیوتیک با استفاده از روش طراحی آزمایش "یک فاکتور در یک زمان" (OFAT) بررسی شد. بالاترین بازده استخراج جلوگرد ۹۸/۸٪ بدست آمد، اما به منظور تعیین تاثیر عوامل موثر بر استخراج جلوگرد، بالاترین بازده استخراج آنتی بیوتیک در هر دو مرحله جلوگرد و عقبگرد مورد توجه قرار گرفت. شرایط بهینه مرحله استخراج جلوگرد در $pH=10$ ، غلظت های نمک ۰/۲۵ مولار، سورفکتانت ۰/۰۵ مولار و آنتی بیوتیک ۵ میلی مولار بدست آمد. بالاترین بازده استخراج عقبگرد در $pH=4/2$ و غلظت نمک ۱ مولار برابر ۱۶/۴٪ بدست آمد.
<b>کلمات کلیدی:</b> استخراج میسل معکوس اریتروماپسین روش طراحی یک فاکتور در یک زمان سورفکتانت آنیونی AOT	
* عهده دار مکاتبات	حقوق ناشر محفوظ است.

## ۱- مقدمه

اریترومایسین یک آنتی‌بیوتیک ماکرولید از زیر مجموعه آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید و محصول ثانویه باکتری گرم مثبت *Saccharopolyspora erythraea*<sup>۱</sup> می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی استفاده می‌شوند. اریترومایسین به دلیل وجود گروه‌های عاملی روی سطح آن، دارای بار مثبت می‌باشد. در فرآیند تولید محصولات بیولوژیکی، جداسازی محصول مطلوب از حجم‌های بالای محیط کشت تخمیر شده که حاوی انواع مواد نامطلوب است، در مرحله پایین‌دستی فرآیند تخمیر ضروری می‌باشد [۱]. با وجود پیشرفت‌های بدست آمده در زمینه استخراج و خالص‌سازی محصولات دارویی، مطالعات بیشتر برای یافتن روش‌های اقتصادی و اختصاصی‌تر خصوصاً بر روی آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری به نظر می‌رسد [۲]. روش مورد استفاده علاوه بر سادگی، هزینه‌های فرآیند پایین و امکان افزایش مقیاس، باید قابلیت رسیدن به بالاترین بازده با حفظ فعالیت دارویی آنتی‌بیوتیک را داشته باشد [۳-۵].

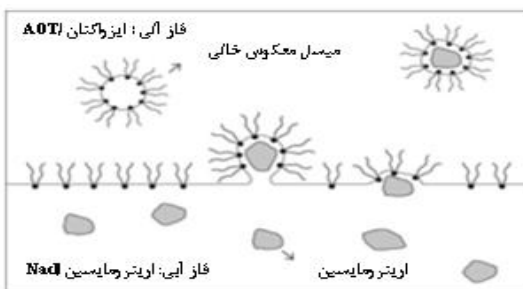
آنتی‌بیوتیک‌ها براساس بار و قطبیت آن‌ها به روش‌های مختلف جداسازی می‌شوند. به عنوان مثال در روش‌های رزین‌های تبادل یونی آنتی‌بیوتیک‌ها براساس بار آنها جداسازی می‌شوند و برای خالص‌سازی هر آنتی‌بیوتیک، رزین با بار مخالف استفاده می‌شود. اساس جداسازی در روش‌های دو فاز مایع، غشاها و کروماتوگرافی مایع، جداسازی براساس قطبیت و آبدوستی آنتی‌بیوتیک می‌باشد. در روش غشا مایع مولکول باید قابلیت حل شدن در حلال آلی مورد استفاده را داشته باشد [۴-۹].

روش میسل معکوس به دلیل مزایای آن در دو دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته است. اساس این روش بر پایه استخراج مایع-مایع می‌باشد. بسیاری از بیومولکول‌ها نظیر پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و یون‌های فلزی با استفاده از این روش خالص‌سازی شده‌اند. از جمله مزایای روش استخراج میسل معکوس قدرت انتخاب‌پذیری بالا با کمترین تغییر در طبیعت و فعالیت بیولوژیکی مولکول، افزایش مقیاس آسان، بازده بالا، نیاز به انرژی کم و امکان انجام عملیات به صورت پیوسته می‌باشد. همچنین این عملیات را می‌توان در شرایط نزدیک به دمای محیط انجام داد [۱۰].

در صورت تماس دو فاز آبی و آلی حاوی سورفکتانت،

ذرات میسل معکوس از به هم پیوستن سورفکتانت‌ها و تشکیل توده‌هایی در فاز آلی شکل می‌گیرند. بر خلاف میسل، در توده‌های میسل معکوس سر آگریز سورفکتانت‌ها به سمت خارج و سر آبدوست آن‌ها به سمت داخل توده میسل معکوس قرار می‌گیرند و در مرکز آن فاز آبی به تله می‌افتد (شکل ۱). مکانیسم فرآیند استخراج میسل معکوس شامل برهمکنش مستقیم بین میسل معکوس تولید شده بوسیله سورفکتانت در فاز آلی و بیومولکول‌ها در فاز آبی خوراک بر اثر وجود نیروهای الکترواستاتیکی بین سر آبدوست مولکول‌های سورفکتانت و بیومولکول است. به عبارت دیگر استخراج بر مبنای قوانین استخراج یونی مایع-مایع می‌باشد و برای استخراج بیومولکول مورد نظر، باید از سورفکتانت با بار یونی مخالف بهره جست. فرآیند کلی استخراج مایع-مایع میسل معکوس شامل دو مرحله اصلی است:

- استخراج جلوگرد<sup>۲</sup> که در آن بیومولکول از محلول آبی حاوی نمک به فاز آلی میسل معکوس حاوی سورفکتانت و حلال آلی غیر قطبی منتقل می‌شود.
  - استخراج عقبگرد<sup>۳</sup> که در آن بیومولکول منتقل شده به فاز آلی، از میسل معکوس به فاز آبی تازه (فاز عاری ساز<sup>۴</sup>) حاوی نمک آزاد می‌شود.
- شمایی از حل شدن بیومولکول در میسل معکوس در مرحله جلوگرد در شکل (۱) نشان داده شده است. بدلیل عدم تماس بیومولکول‌ها با فاز آلی و قرار گرفتن آن‌ها در مرکز آبی میسل معکوس، فعالیت بیولوژیکی و ساختار شیمیایی آن‌ها کمترین تغییر را نشان می‌دهند [۱۱-۱۳].



شکل (۱) شمایی از مکانیسم استخراج جلوگرد میسل معکوس

بر خلاف پروتئین‌ها، تحقیقات محدودی بر استخراج آنتی-بیوتیک‌ها به روش میسل معکوس انجام شده است. معمولاً

<sup>2</sup> Forward Extraction

<sup>3</sup> Backward Extraction

<sup>4</sup> Stripping Phase

<sup>1</sup> *Saccharopolyspora erythraea*

## ۲-۲- استخراج جلوگرد

برای تهیه ۵ میلی‌لیتر فاز آبی در ارلن درب‌دار، مقدار معینی از اریترومایسین پایه در محلول بافر سیترات-فسفات با pH مورد نظر و نمک کلرید سدیم با غلظت مورد نظر برای هر آزمایش مخلوط شد. ۵ میلی‌لیتر از فاز آلی که از حل کردن سورفکتانت AOT با غلظت مورد نظر در حلال آلی ایزواکتان بدست آمد، به فاز آبی افزوده و در شیکر با دور ۲۱۰ rpm و دمای ۲۵°C به مدت زمان معین قرار داده شد. پس از اتمام استخراج، محتویات ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در دور rpm ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد تا دو فاز آبی و آلی از یکدیگر جدا شدند. فاز آلی از فاز آبی جدا و برای استخراج عقبگرد استفاده شد. مقدار اریترومایسین باقیمانده در فاز آبی تعیین و بازده استخراج جلوگرد طبق رابطه (۱) محاسبه شد.

$$E_f = \frac{M_0 - M_a}{M_0} \quad (1)$$

که  $M_0$  مقدار اولیه آنتی‌بیوتیک در فاز آبی و  $M_a$  مقدار باقیمانده آنتی‌بیوتیک بعد از استخراج جلوگرد می‌باشد.

## ۲-۳- استخراج عقبگرد

۴ میلی‌لیتر از فاز آلی جدا شده در انتهای مرحله استخراج جلوگرد با مقدار مساوی از فاز عاری‌ساز در ارلن درب‌دار مخلوط شد. برای تهیه محلول عاری‌ساز، ۳/۲ میلی‌لیتر محلول نمک NaCl با غلظت تعیین شده برای هر آزمایش با ۰/۸ میلی‌لیتر بافر سیترات-فسفات با pH مورد نظر ترکیب شد. ارلن در شیکر با دور ۲۱۰ rpm و در دمای ۲۵°C به مدت زمان معین برای هر آزمایش استخراج عقبگرد قرار داده شد. در نهایت محتویات ارلن در دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و دو فاز از هم جدا شدند. فاز آبی برای آنالیز مقدار اریترومایسین رها شده در این فاز مورد استفاده قرار گرفت و بازده استخراج عقبگرد با استفاده از رابطه (۲) تعیین شد.

$$E_b = \frac{M_b}{M_0 - M_a} \quad (2)$$

که  $M_b$  مقدار اریترومایسین استخراج شده به داخل محلول استخراج (فاز عاری‌ساز) می‌باشد. بازده انتقال استخراج عقبگرد، نسبت مقدار اریترومایسین استخراج شده در فاز آبی بافری به مقدار اولیه آنتی‌بیوتیک موجود در فاز میسل معکوس از انتقال جلوگرد می‌باشد [۸، ۱۱، ۱۲].

بازده حاصل از استخراج جلوگرد بالا و بازده استخراج عقبگرد پایین است، لذا در اکثر تحقیقات، تلاش‌ها بر افزایش بازده استخراج مرحله عقبگرد متمرکز می‌باشد. از آنجا که نیروهای الکترواستاتیکی عامل استخراج بیومولکول‌ها هستند، لذا عوامل موثر بر استخراج جلوگرد بر بازده استخراج عقبگرد و نهایتاً استخراج کلی تاثیر می‌گذارند. معمولاً عواملی که باعث افزایش بازده استخراج جلوگرد می‌شود، باعث کاهش بازده استخراج عقبگرد می‌شود. بنابراین برای رسیدن به بالاترین بازده استخراج میسل معکوس، باید تاثیر سطوح عوامل استخراج جلوگرد بر بازده عقبگرد نیز مورد بررسی قرار گیرد [۱۴-۱۰، ۸، ۱۰].

اریترومایسین یکی از مهمترین آنتی‌بیوتیک‌هایی است که به روش تخمیر در کشور تولید می‌شود. روش متداول استخراج و خالص‌سازی این آنتی‌بیوتیک، استخراج مایع-مایع با حلال ایزوبوتیل استات است. بر اساس اطلاعات بدست آمده، تنها یک تحقیق در زمینه خالص‌سازی این آنتی‌بیوتیک با استفاده از سورفکتانت سنتزی DOLPA گزارش شده است [۸]. با توجه به مزایای روش میسل معکوس برای خالص‌سازی بیومولکول‌ها در این تحقیق خالص‌سازی آنتی‌بیوتیک اریترومایسین با استفاده از سورفکتانت آنیونی AOT<sup>۵</sup> مورد بررسی قرار گرفت. سورفکتانت آنیونی AOT بدون نیاز به کمک-سورفکتانت<sup>۶</sup> قادر به تشکیل میسل‌های معکوس می‌باشد و در مقایسه با سایر سورفکتانت‌ها توانایی حل کردن مقدار زیادی آب در هسته میسل معکوس را دارد [۱۵]. در این تحقیق، بدلیل عدم اطلاع از محدوده موثر متغیرها در استخراج جلوگرد و عقبگرد از روش طراحی "یک فاکتور در یک زمان"<sup>۷</sup> برای بررسی تاثیر عوامل مختلف بر استخراج جلوگرد و عقبگرد استفاده شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد شیمیایی

مواد به کار برده در آزمایش‌ها شامل نمک NaCl، سورفکتانت آنیونی AOT (نمک دوکوسات سدیم)، حلال‌های ایزواکتان و کلروفرم و معرف بروموفنل بلو، ساخت شرکت سیگما-آلدریج با درصد خلوص ۹۹/۹٪ بودند. اریترومایسین پایه از طرف شرکت شفا فارمد اهدا شد.

<sup>۵</sup> Docusate Sodium Salt

<sup>۶</sup> Cosurfactant

<sup>۷</sup> One Factor at a Time

## ۲-۴- روش آنالیز اریترومایسین

برای آنالیز اریترومایسین در فاز آبی از روش رنگ سنجی استفاده شد. در این روش کلروفورم به میزان دو برابر با فاز آبی مخلوط و در شیکر با دور ۲۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد و پس از سانتریفوژ دو فاز از یکدیگر جدا شدند. فاز آلی با حجم مساوی از بافر فسفات حاوی برموفنول بلو در pH مناسب، در شیکر با دور و زمان مذکور مخلوط شد. جذب نوری کمپلکس زرد رنگ تشکیل شده حاوی اریترومایسین پس از جداسازی در طول موج ۴۱۵nm خوانده شد [۱۶].

## ۲-۵- طراحی آزمایش‌ها

### ۲-۵-۱- بررسی اثر زمان بر بازده استخراج

به منظور تعیین زمان مورد نیاز برای استخراج جلوگرد و عقبگرد، آزمایش‌هایی در شرایط ارائه شده در جدول (۱) انجام شد.

### ۲-۵-۲- بررسی اثر فاکتورهای موثر بر بازده استخراج

#### به روش "یک فاکتور در یک زمان"

جداسازی اریترومایسین از فاز آبی اولیه و انتقال آن به هسته میسل معکوس و سپس انتقال آن به فاز آبی جدید به تمامی فاکتورهایی که برهمکنش‌های بین سورفکتانت AOT و مولکول‌های اریترومایسین را تحت تاثیر قرار می‌دهد، بستگی دارد. فاکتورهای اصلی اثرگذار عبارتند از: pH فاز آبی، غلظت نمک، غلظت سورفکتانت و غلظت اولیه اریترومایسین. از

آنجایی که پیش از این تحقیقی بر روی استخراج میسل معکوس اریترومایسین با استفاده از سورفکتانت AOT انجام نشده بود و محدوده سطوح فاکتورهای مذکور مشخص نبود، از روش "یک فاکتور در یک زمان" جهت بررسی خصوصیات فیزیکی و تعیین محدوده مؤثر بر افزایش بازده استخراج استفاده شد.

جدول (۱) شرایط آزمایش‌های بررسی تاثیر زمان بر استخراج

#### میسل معکوس

فاکتور	استخراج جلوگرد	استخراج عقبگرد
pH	۱۰	۳
غلظت نمک [M]	۰/۲۵	۱
غلظت AOT [M]	۰/۰۵	-
غلظت اریترومایسین [mM]	۵	-

شرایط انجام آزمایش‌های استخراج جلوگرد در جدول (۲)

آمده است. این فاکتورها بر روی فاز آبی مرحله جلوگرد اعمال و تاثیر آن‌ها به طور همزمان بر بازده مرحله جلوگرد و عقبگرد بررسی شده است. در ادامه آزمایش‌ها، در شرایط بهینه مرحله جلوگرد، تاثیر عوامل ارائه شده در جدول (۳) بر روی فاز عاری‌ساز بر بازده استخراج عقبگرد استفاده شد. زمان و دمای انجام تمامی آزمایش‌ها به ترتیب برابر ۹۰ دقیقه و ۲۵°C نظر گرفته شد. تمامی آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شده و میانگین آن‌ها گزارش شده است.

جدول (۲) شرایط آزمایش استخراج جلوگرد میسل معکوس به روش OFAT

آزمایش	استخراج جلوگرد [%]			استخراج عقبگرد [%]	
	pH	غلظت NaCl [M]	غلظت AOT [M]	pH	غلظت NaCl [M]
اثر pH	۸-۱۰/۷۴	۰/۲۵	۰/۰۵	۳	۱
اثر نمک	۱۰	۰/۱-۰/۲۵	۰/۰۵	۳	۱
اثر سورفکتانت	۱۰	۰/۲۵	۰/۰۰۲-۰/۰۳	۳	۱
اثر آنتی‌بیوتیک	۱۰	۰/۲۵	۰/۰۵	۳	۱

جدول (۳) شرایط آزمایش استخراج عقبگرد میسل معکوس به روش OFAT

آزمایش	استخراج جلوگرد [%]			استخراج عقبگرد [%]	
	pH	غلظت NaCl [M]	غلظت AOT [M]	pH	غلظت NaCl [M]
اثر pH	۱۰	۰/۲۵	۰/۰۵	۳	۱
اثر نمک	۱۰	۰/۲۵	۰/۰۵	۳	۱

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- اثر زمان بر بازده استخراج جلوگرد و عقبگرد

جاذبه الکترواستاتیکی بین آنتی بیوتیک و سورفکتانت به اندازه‌ای قوی است که انتقال آنتی بیوتیک‌ها را از فاز آبی خوراک به فاز آلی میسل معکوس سرعت می‌بخشد. بنابراین، کمپلکس پایدار آنتی بیوتیک-سورفکتانت در مرکز میسل معکوس تشکیل می‌شود، بطوریکه سرعت استخراج عقبگرد آنتی بیوتیک بسیار کند می‌شود و در بعضی موارد باز یافت آنتی بیوتیک‌ها از فاز عاری سازی امکان پذیر نیست [۱۵].

همانطور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود، در حالت کلی افزایش زمان باعث افزایش بازده استخراج می‌شود، ولی استخراج جلوگرد سریعتر به بازده‌های استخراج بالا می‌رسد و در طول ۱۲۰ دقیقه حدود ۱۰٪ افزایش بازده نشان می‌دهد. در حالیکه بازده عقبگرد همچنان افزایش نشان می‌دهد، ولی پس از گذشت ۹۰ دقیقه سرعت افزایش بازده کاهش یافته است. لذا با توجه به محدودیت‌های عملیاتی، زمان استخراج جلوگرد و عقبگرد در طراحی آزمایش‌ها ۹۰ دقیقه در نظر گرفته شد.

#### ۳-۲- بررسی عوامل موثر بر استخراج جلوگرد

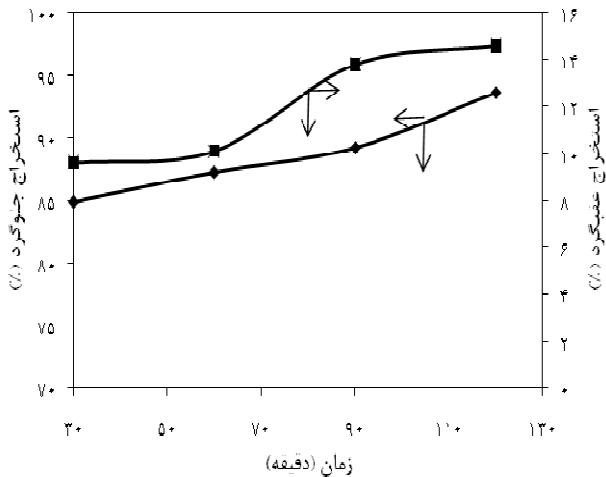
##### ۳-۲-۱- تاثیر pH فاز آبی جلوگرد بر بازده استخراج جلوگرد و عقبگرد

شکل (۳-الف) رابطه بین pH و بازده استخراج اریترومایسین را تحت شرایط آزمایش ذکر شده در جدول (۲) نشان می‌دهد. اریترومایسین مولکول نسبتاً بزرگی است و نیاز به میسل معکوس بزرگتری دارد بنابراین نیاز به انرژی بیشتری دارد و این افزایش انرژی با افزایش pH تامین می‌شود. چنانچه در شکل مشاهده می‌شود در  $pH=10$  بازده هر دو استخراج بطور نسبی بالا می‌باشند، بنابراین در ادامه آزمایش‌ها pH فاز آبی مرحله جلوگرد برابر با ۱۰ تنظیم شد. نتایج بدست آمده در مقالات برای آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین، پنی سیلین G و تیکوپلانیلین نیز نشان می‌دهد در محدوده خاصی از pH همانند نتیجه بدست آمده در این تحقیق بازده استخراج جلوگرد تغییر قابل توجهی ندارد [۱۳، ۱۸، ۱۹].

##### ۳-۲-۲- تاثیر غلظت نمک فاز آبی جلوگرد بر بازده استخراج جلوگرد و عقبگرد

وجود حداقل غلظتی از نمک در فاز آبی برای تشکیل میسل‌های معکوس الزامی است. همانطور که در شکل (۳-ب)

مشاهده می‌شود در ابتدا با افزایش غلظت نمک، بازده استخراج افزایش می‌یابد تا به یک مقدار حداکثر برسد و سپس با افزایش بیشتر غلظت، بازده کاهش می‌یابد. همانطور که بیان



شکل (۲) اثر زمان بر بازده جلوگرد و عقبگرد استخراج میسل معکوس

شد، این امر به علت برهمکنش نیروهای الکترواستاتیکی بین اریترومایسین و سورفکتانت می‌باشد. بعلاوه بدون نمک کافی مرز بین دو فاز آبی و آلی بعد از سانتریفیوژ واضح نمی‌باشد. با توجه به شکل (۳-ب) در  $0/25$  مولار بازده هر دو استخراج جلوگرد و عقبگرد بالا می‌باشند، لذا در ادامه آزمایش‌ها غلظت نمک در محلول استخراج جلوگرد  $0/25$  مولار تنظیم شد. نتایج مقالات برای آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین، جنتامایسین و نئومایسین نیز تایید می‌کند که در غلظت‌های کم نمک، بازده استخراج جلوگرد بالا می‌باشد [۱۴، ۱۸].

##### ۳-۲-۳- تاثیر غلظت سورفکتانت بر بازده استخراج جلوگرد و عقبگرد

افزایش غلظت سورفکتانت، تعداد میسل‌های معکوس را در فاز آلی افزایش می‌دهد و بنابراین آنتی بیوتیک بیشتری استخراج می‌شود. مطابق شکل (۳-ج)، با افزایش غلظت سورفکتانت بازده استخراج جلوگرد افزایش می‌یابد که به علت افزایش تعداد و سایز میسل‌های معکوس می‌باشد. اما بازده استخراج عقبگرد با افزایش غلظت سورفکتانت کاهش می‌یابد که به علت تشکیل کمپلکس پایدار بین آنتی بیوتیک و مولکول‌های سورفکتانت می‌باشد. برای بهینه کردن هزینه‌های فرآیند و با توجه به اینکه در غلظت  $0/05$  مولار بازده استخراج جلوگرد برابر ۸۲٪ می‌باشد و بیشترین بازده استخراج عقبگرد

مولار در نظر گرفته شد.

نیز وابسته به غلظت اولیه آنتی بیوتیک در فاز آبی خوراک می باشد و با افزایش غلظت در ابتدا افزایش و سپس کاهش بازده مشاهده می شود. لذا، غلظت ۵mM آنتی بیوتیک را که در آن بازده هر دو استخراج نسبتاً بالا می باشد، بعنوان غلظت بهینه تعیین شد.

نتایج بدست آمده در مقالات برای آنتی بیوتیک های پنی سیلین G، اریترومایسین، جنتامایسین و نئومایسین نیز نشان می دهد که با کاهش غلظت آنتی بیوتیک باعث کاهش بازده استخراج در هر دو مرحله می شود [۱۴، ۱۸].

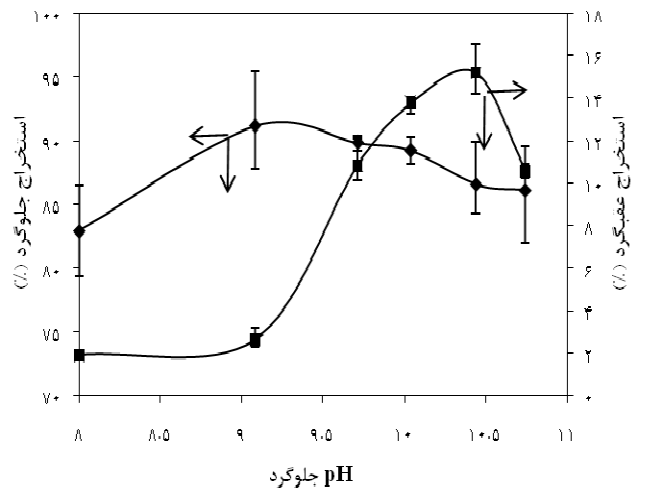
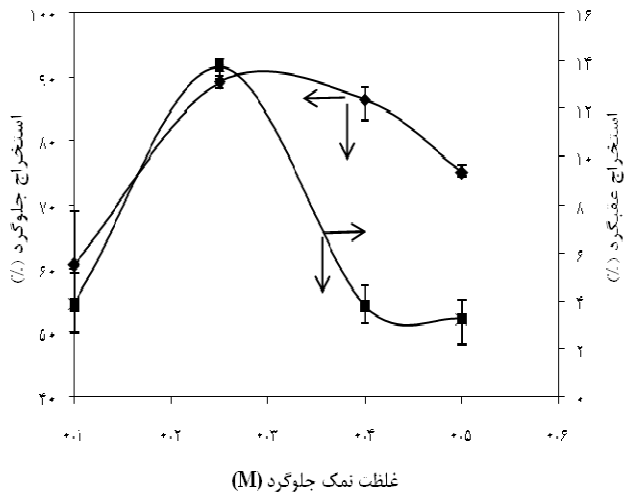
بدست آمده است، در ادامه آزمایش ها غلظت سورفکتانت ۰/۰۵ در سایر مقالات برای آنتی بیوتیک های پنی سیلین G و اریترومایسین، افزایش غلظت سورفکتانت، باعث تغییرات مشابه نتایج حاصل در این تحقیق بر بازده استخراج جلوگیری و عقبگرد شده است [۱۸].

### ۳-۲-۴- تاثیر غلظت اولیه آنتی بیوتیک بر بازده استخراج جلوگیری و عقبگرد

همانطور که در شکل (۳-۵) مشاهده می شود، بیشترین بازده استخراج جلوگیری در کمترین غلظت آنتی بیوتیک حاصل می شود و این امر به علت اشباع شدن سیستم میسل معکوس با افزایش غلظت آنتی بیوتیک می باشد. بازده استخراج عقبگرد

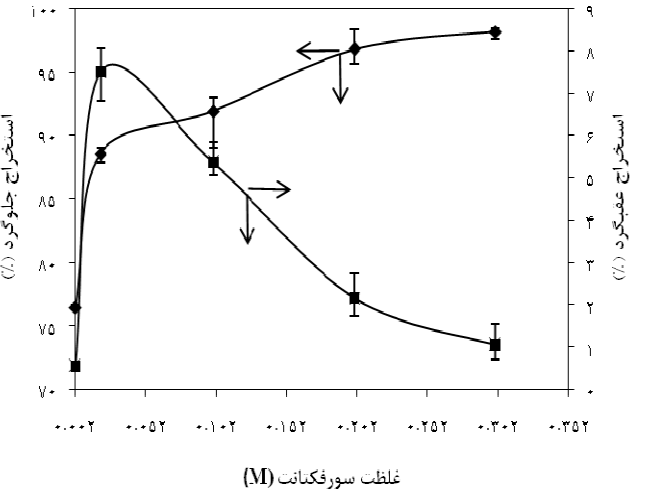
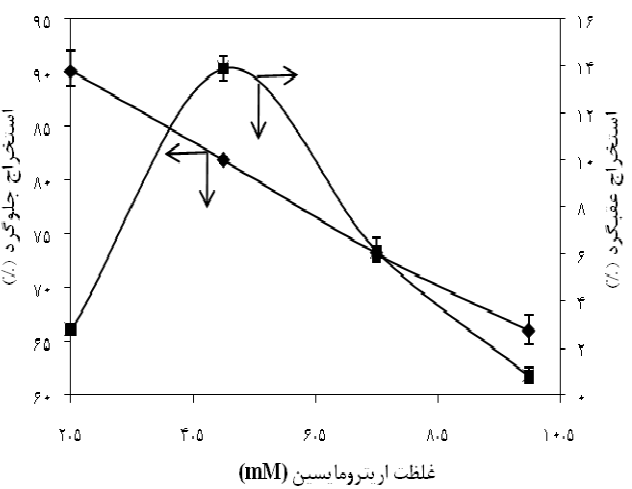
الف

ب



ج

د



شکل (۳) تاثیر فاکتورهای الف (pH، ب) غلظت کلرید سدیم، ج) غلظت سورفکتانت، د) غلظت اولیه اریترومایسین اعمال شده بر فاز آبی مرحله جلوگیری بر بازده استخراج جلوگیری و عقبگرد.

### ۳-۳- بررسی عوامل موثر بر استخراج عقبگرد

#### ۳-۳-۱- تاثیر pH محلول عاری ساز

تجزیه میسل‌های معکوس به مونومرهای آن (سورفکتانت) در pH های اسیدی محلول عاری ساز، باعث رها شدن مقدار بیشتری از آنتی بیوتیک و در نتیجه افزایش بازده استخراج عقبگرد می شود [۸۱].

در شکل (۴-الف) مشخص است که با افزایش pH در ابتدا بازده افزایش و سپس کاهش می یابد و در  $pH=4/2$  بازده استخراج عقبگرد حداکثر و برابر  $16/6\%$  می باشد.

در تحقیقات دیگری که بر آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین G و اریترومايسين انجام شده نیز pH های اسیدی برای رسیدن

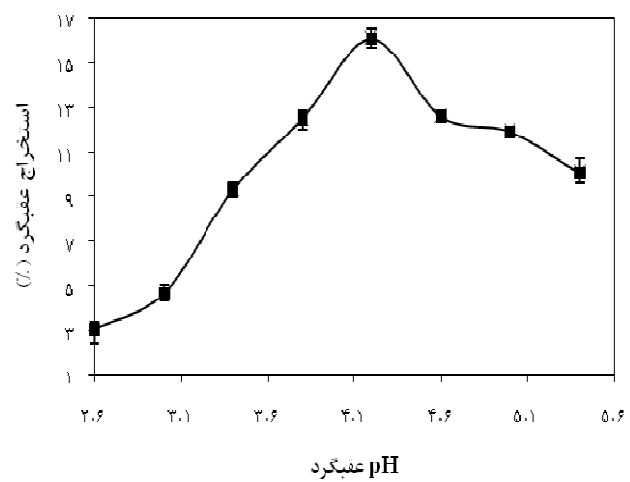
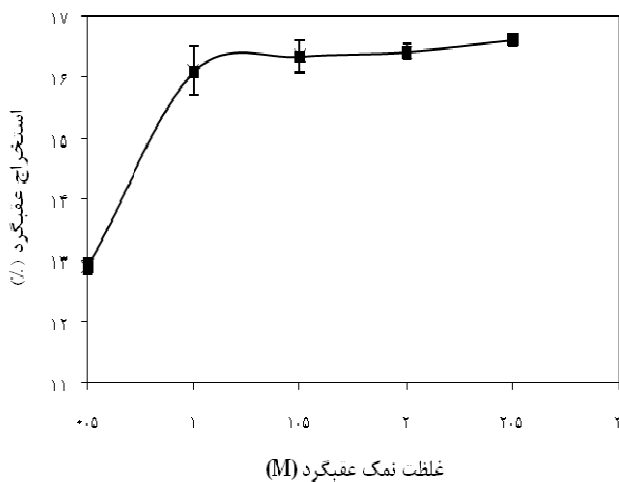
به بازده استخراج عقبگرد بالا مناسب معرفی شده اند [۸۱].

#### ۳-۳-۲- تاثیر غلظت نمک محلول عاری ساز

افزایش غلظت نمک در مرحله عقبگرد باعث افزایش سایز میسل‌های معکوس تشکیل شده در مرحله جلوگرد و ناپایداری آن‌ها و در نتیجه خروج بیشتر آنتی بیوتیک‌ها از مرکز میسل معکوس می شود [۸]. شکل (۴-ب) نشان می دهد که افزایش غلظت نمک تا ۱ مولار باعث افزایش بازده استخراج عقبگرد می شود و غلظت نمک بیشتر از ۱ مولار اثر چندانی بر افزایش بازده ندارد. بنابراین غلظت نمک NaCl ۱ مولار غلظت بهینه در نظر گرفته شد.

الف

ب



شکل (۴) تاثیر فاکتورهای الف (pH و ب) غلظت نمک کلرید سدیم بر بازده استخراج عقبگرد

### ۴- نتیجه گیری

با توجه به آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق با تغییر شرایط عملیاتی بازده استخراج میسل معکوس جلوگرد و عقبگرد اریترومايسين بهبود یافت. در استخراج جلوگرد pH تقریباً بی اثر بوده ولی افزایش آن بازده مرحله عقبگرد را افزایش می دهد. در مرحله عقبگرد، pH های نسبتاً پایین باعث افزایش بازده استخراج عقبگرد شد. غلظت نمک بعلت تاثیر بر سایز میسل معکوس و برهمکنش‌های الکترواستاتیکی بین آنتی بیوتیک و سورفکتانت، در مرحله استخراج جلوگرد مقادیر کم و در مرحله استخراج عقبگرد مقادیر بالای آن باعث افزایش بازده استخراج عقبگرد شد. غلظت سورفکتانت بر تعداد میسل‌های معکوس اثرگذار است و در مقادیر بالا باعث افزایش بازده استخراج جلوگرد و کاهش بازده عقبگرد می شود، لذا

غلظت نسبتاً کم بعنوان غلظت بهینه انتخاب شد. در غلظت‌های کم آنتی بیوتیک، احتمال به تله افتادن آن‌ها در میسل‌های معکوس بیشتر و بازده استخراج جلوگرد و عقبگرد افزایش نشان می دهد. بالاترین میزان استخراج کل برابر  $13/1\%$  حاصل شد که در این حالت استخراج جلوگرد و عقبگرد به ترتیب برابر  $82\%$  و  $16/6\%$  بود.

### تشکر و قدردانی

از آقای دکتر ثقفی نیا مدیرعامل محترم شرکت شفا فارمد برای اهدای اریترومايسين پایه جهت انجام تحقیق حاضر صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

## مراجع

- [9] D. L. Oatley B. Cassey, P. Jones, and W. R. Bowen (2005) "Modelling the performance of membrane nanofiltration--recovery of a high-value product from a process waste stream", *Chemical Engineering Science Journal*, 60, 1953-1964.
- [10] S. H. Mohd-Setapar, R.J. Wakeman, and E. S. Tarleton (2009) "Penicillin G solubilisation into AOT reverse micelles", *Chemical Engineering Research and Design Journal*, 87, 833-842.
- [11] S. H. Mohd, S. W. Lau, E. Toorisaka, M. Goto, S. Furusaki, and H. Mat (2008) "Reverse micelle extraction of antibiotics", *Journal of Teknologi*, 59, 69-79.
- [12] W. D. Su, and C. K. Lee (1999) "Reversed micellar extraction of vancomycin: effect of pH, salt concentration, and affinity ligands", *Separation Science and Technology Journal*, 34, 1703-1715.
- [13] C. Yong, B. M. Hanapi, X. Zhinan, J. Zhihua, and C. Peilin (2004) "Determination of teicoplanin A2's partition coefficient in different liquid-liquid extraction systems", *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 12, 493-497
- [14] Z. Hu, and E. Gulari (1996) "Extraction of aminoglycoside antibiotics with reverse micelles", *Journal of Chemical Techology and Biotechnology*, 65, 45-48.
- [15] Y. S. Park, T. Dohjima, and M. Okabe (1996) "Enhanced  $\alpha$ -amylase production in recombinant *Bacillus brevis* by fed-batch culture with amino acid control", *Biotechnology and Bioengineering Journal*, 49, 36-44.
- [16] A. Regosz, D. Darbrowska, H. Babile, and H. Nestruck (1982) "Methods of determination of erythromycin I", *Science of Pharmaciutical*, 50, 17-25.
- [1] S. H. Mohd-Setapar, R. J. Wakeman, and E. S. Tarleton, (2008) "Separation of pharmaceutical products with reverse micelles", *10<sup>th</sup> World Filtration Congress*, Leipzig, Germany, 1-601.
- [2] N. W. Fadnavis, B. Satyavathi, and A. A. Deshpande (1997) "Reverse micellar extraction of antibiotics from aqueous solutions", *Biotechnology Progress*, 13, 503-505.
- [3] M. E. Leser, K. Mrkoci, and P. L. Luisi (1993) "Reverse micelles in protein separation: The use of silica for the back-transfer process", *Biotechnology and Bioengineering Journal*, 41, 489-492.
- [4] S. Krishna, N. Srinivas, K. Raghavarao, and N. Karanth (2002) "Reverse micellar extraction for downstream processing of proteins/enzymes", *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 75,119-183.
- [5] A. C. Farrenburg (2005) "Novel simulated moving bed process for antibiotic purification", *PhD Thesis*, Chemical Engineering Department, Purdue University.
- [6] J. T. Casey, P. K. Walsh, and D. G. O'Shea (2007) "Characterisation of adsorbent resins for the recovery of geldanamycin from fermentation broth", *Separation and Purification Technology Journal*, 53, 281-288.
- [7] B. Mokhtarani, R. Karimzadeh, and M. H. Amini, S. D. Manesh (2008) "Partitioning of ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate", *Biochemical Engineering Journal*, 38, 241-247.
- [8] K. F. Loh, S. E. Lau, S. W. Lau, S. H. Setapar, K. S. N. Kamaruddin, N. Othman, and A.N. Sadikin, (2004) "Reverse micelle extraction of erthromycin", *The 18<sup>th</sup> Symposium of Malaysian Chemical Engineers*,Johor, Malysia, 340.



## An investigation on the Erythromycin reverse micellar extraction using OFAT experimental design

Serveh Kamrava, Parisa Hejazi\*

Biotechnology Research Laboratory, School of Chemical Engineering, Iran University of Science and Technology, P.O. Box: 16846-13114, Tehran, Iran (ser.km85@gmail.com, phejazi@iust.ac.ir)

---

### ABSTRACT

In this study, a reverse micellar extraction method using AOT as an anionic surfactant and isoctane as a solvent has been applied to extract erythromycin. Effect of factors such as salt, surfactant, initial antibiotic concentrations and pH on forward and backward extractions were investigated using "one factor at a time" (OFAT) experimental design method. The highest forward extraction efficiency was 98%. In order to determine the effective level of a factor in forward stage, both forward and backward highest extraction efficiencies were taken into consideration. The optimum forward extraction factors levels, which result in both highest forward and backward efficiencies were: pH=10, 0.25M salt concentration, 0.05M surfactant concentration and 5mM antibiotic concentration. The highest backward extraction was 16.6% in pH=4.2 and salt concentration of 1M.

---

### ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 Aug. 2011

Received in revised form 24 Oct. 2011

Accepted 30 Nov. 2011

---

Key words:

Erythromycin

Reverse micellar extraction

One factor at a time method (OFAT)

Anionic surfactant AOT

---

All right reserved.

---

\* Corresponding author