

Partitioning of Protease using an Ionic Liquid based Aqueous Two Phase System: Experimental Study and Thermodynamic Modeling

Alireza Fazlali ¹, Vahab Ghalekhondabi ², Meysam Baghipour ³

1. Corresponding author, Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Arak University, Arak, Iran. E-mail:

a-fazlali@araku.ac.ir

2. Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Arak University, Arak, Iran. E-mail: v-ghalekhondabi@phd.araku.ac.ir

3. Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Arak University, Arak, Iran. E-mail: meysam.baghipour@yahoo.com

Article Info

Article type: research paper

Article history:

Received 1 March 2024

Received in revised form

15 August 2024

Accepted 6 September 2024

Published online 11 December 2024

Keywords:

Aqueous two phase system

Ionic liquid

Response surface method

Thermodynamic modeling

Protease

ABSTRACT

Objective: The aqueous two-phase system (ATPS) as a liquid-liquid fractionation technique has gained an interest because of great potential for recovery and purification of many biological materials such as proteins, enzymes, and nucleic acids. Ionic liquids (ILs), are a group of organic salts comprising entirely of ions and can be suggested as a suitable solvent for a specific purpose, especially separation processes. Among the various ILs, the alkyl-sulfate derivatives have the great advantages such as synthesizing easily in a halide-free way at a reasonable cost with relatively low viscosity and considering as a promising IL in ATPSs. In the present study, the partitioning of protease using the ATPS [1-Ethyl-3-Methyl-Imidazolium][EthylSulfate]([emim][eSO₄])/Na₂CO₃ was evaluated. The effect of parameters, such as the initial concentration of enzyme (protease), concentration of ionic liquid (IL) ([emim][eSO₄]) and concentration of salt (sodium carbonate) on the purification of protease was investigated.

Materials and Methods: The design experiment of BOX-Behnken as a method of the response surface methodology (RSM) was applied to minimize the number of runs and the process optimization.

Results: The optimum conditions were enzyme/IL of 0.210 and enzyme/salt of 0.381 and concentration of enzyme in the top phase (IL rich phase) and separation yield were obtained, 4 ppm and 94%, respectively.

Conclusions: The results showed that the protein tends to be extracted in a top phase, hence the protein concentration in the bottom phase (salt rich phase) was negligible. Furthermore, the experimental results are correlated successfully using non-random two liquid non-random factor (NRTL-NRF) equation as a short-range contribution.

Citation: Fazlali, Ghalekhondabi, Baghipour (2024). Partitioning of Protease using an Ionic Liquid based Aqueous Two Phase System: Experimental Study and Thermodynamic Modeling, Journal of Separation Science and Engineering, 16 (2), 1-15 <http://doi.org/10.22103/JSSE.2024.4442>



© The Author(s).

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman

استخراج آنزیم پروتئاز با استفاده از سیستم آبی دو فازی مبتنی بر مایع یونی: مطالعه آزمایشگاهی و مدل سازی ترمودینامیکی

علیرضا فضلعلی^۱، وهب قلعه خندابی^۲، میثم باقی پور^۳

۱. نویسنده مسئول، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران. رایانامه: a-fazlali@araku.ac.ir
۲. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران. رایانامه: v-ghalehkhondabi@phd.araku.ac.ir
۳. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران. رایانامه: a-fazlali@araku.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: علمی پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۱

دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۵/۲۵

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۶

انتشار: ۱۴۰۳/۰۹/۲۱

چکیده

هدف: سیستم دو فازی آبی به عنوان یک روش استخراج مایع-مایع به دلیل پتانسیل زیادی برای بازیابی و خالص سازی بسیاری از مواد بیولوژیکی مانند پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و اسیدهای نوکلئیک مورد توجه قرار گرفته است. مایعات یونی، گروهی از نمک‌های آلی هستند که کاملاً از یون تشکیل شده‌اند و می‌توانند به عنوان یک حلال مناسب برای یک هدف خاص به ویژه فرآیندهای جداسازی پیشنهاد شوند. در بین مایعات یونی مختلف، مشتقات آلکیل سولفات دارای مزایای بسیار خوبی مانند سنتز آسان به روش بدون هالید با ویسکوزیته نسبتاً کم و با هزینه مناسب هستند که به عنوان یک مایع یونی مطمئن در سیستم های دو فاز آبی در نظر گرفته می‌شوند. در این مطالعه، جداسازی آنزیم پروتئاز با استفاده از سامانه دو فازی آبی مایع یونی ۱-اتیل، ۳-متیل ایمیدازولیوم اتیل سولفات و نمک سدیم کربنات مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر پارامترهایی چون غلظت اولیه آنزیم، غلظت اولیه مایع یونی و غلظت اولیه نمک بر میزان خالص سازی پروتئاز بررسی شد.

مواد و روش: طراحی آزمایش باکس-بنکن به عنوان یکی از روش های سطح-پاسخ بمنظور به حداقل رساندن تعداد آزمایشات و بهینه سازی فرآیند مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج: شرایط بهینه برای نسبت آنزیم به مایع یونی برابر ۰/۲۱۰ و نسبت آنزیم به نمک برابر ۰/۳۸۱ بدست آمد که در این شرایط، غلظت آنزیم در فاز بالا (فاز غنی از مایع یونی) و راندمان جداسازی به ترتیب ۴ میلی گرم بر لیتر و ۹۴ درصد بدست آمدند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که پروتئین تمایل به استخراج در فاز بالا دارد، و غلظت پروتئین در فاز پایین (فاز غنی از نمک) قابل چشم پوشی بوده است. بعلاوه نتایج آزمایشگاهی تطابق مطلوبی با معادله حالت پیشنهادی NRTL-NRF به عنوان یک معادله با دامنه همبستگی کوتاه داشتند.

کلمات کلیدی:

آنزیم پروتئاز
روش سطح-پاسخ
سامانه دو فازی آبی
مایع یونی
مدل سازی ترمودینامیکی

استناد: فضلعلی، قلعه خندابی، باقی پور (۱۴۰۳). استخراج آنزیم پروتئاز با استفاده از سیستم آبی دو فازی مبتنی بر مایع یونی: مطالعه آزمایشگاهی و مدل سازی ترمودینامیکی. نشریه علوم و مهندسی جداسازی، (۲) ۱۶، ۱-۱۵. <http://doi.org/10.22103/JSSE.2024.4442>



© نویسندگان

ناشر: دانشگاه شهید باهنر کرمان

۱. مقدمه

استخراج مایع-مایع، یکی از فرآیندهای رایج جداسازی است. با این حال، زمان بر بودن و ایجاد مشکلات محیط زیستی به دلیل استفاده از حلال‌های آلی سمی، تشکیل امولسیون و تولید مقادیر بالای آلاینده، از جمله ایرادهای اساسی آن، به شمار می‌رود [۱،۲]. در مقابل، سیستم‌های دو فاز آبی که نخستین بار توسط آلبرتسون^۱ (۱۹۶۵) معرفی گردید دارای مزایایی همچون سادگی، راندمان بالا، ظرفیت بالا، زمان عملیاتی پائین، عدم استفاده از حلال‌های آلی فرار، قابلیت یکپارچه سازی، مقرون به صرفه بودن، عدم نیاز به پیش تصفیه خوراک و تنش بسیار کم در فصل مشترک فازها هستند [۳-۵]. همچنین، زیست سازگاری سامانه دو فاز آبی و قابلیت افزایش مقیاس این سیستم‌ها، سبب شده است که کاربردهای موثری در حوزه‌های مختلفی همچون جداسازی مولکول‌های زیستی و دی ان ای، تعیین خواص مولکول‌های زیستی، بازیابی و جداسازی بیومولکول‌های ارزشمند از پساب و استخراج غشایی داشته باشند [۶-۱۰].

سیستم‌های دو فاز آبی بر پایه‌ی مایعات یونی رویکردی جدید در فرآیندهای استخراج جداسازی بیولوژیکی هستند. در این سیستم‌ها به جای پلیمر از مایع یونی برای ایجاد سیستم دو فاز استفاده می‌شود. این سیستم‌ها را می‌توان در چهار دسته مایع یونی-نمک، مایع یونی-آمینواسید، مایع یونی-پلیمر و مایع یونی-نمک معدنی-پلیمر تقسیم کرد [۱۱-۱۴]. مایعات یونی به لحاظ کاربرد به عنوان حلال و همچنین از دیدگاه سازگاری با محیط زیست، نسبت به حلال‌های آلی متداول دارای مزایای فراوانی هستند که از جمله آن، می‌توان به قابلیت انحلال ترکیبات مختلف، درجه قطبیت بالا، فشار بخار بسیار پایین، ماهیت ضد اشتعالی، پایداری تا دمای 300°C ، قرار گیری در فاز مایع تا دمای 200°C ، قابلیت هدایت حرارتی و الکتروشیمیایی بالا و امتزاج ناپذیری با بسیاری از حلال‌های آلی اشاره کرد [۱۵-۱۸]. ویژگی‌های مایعات یونی بر اساس اندازه، هندسه و توزیع بار تعیین می‌شود. بعلاوه، خواص مایعات یونی ترکیبی از خواص کاتیون‌ها و آنیون‌ها بوده و شامل خواص اسیدی، بازی، آب دوستی و آب گریزی می‌باشد. کاتیون موجود در مایعات یونی، عموماً دارای ساختاری آلی با میزان تقارن کم است. آنیون‌هایی که در ساختار مایعات یونی استفاده می‌شوند، موادی معدنی یا آلی هستند که دارای بار منفی در ساختار خود هستند [۱۹-۲۴].

سیستم‌های دوفازی آبی مایع یونی-نمک، گونه‌های جدید از سیستم‌های دوفازی آبی هستند که توسط راجرز^۲ و سدان^۳ (۲۰۰۳) [۲۵] معرفی شد و در آن به جای پلیمر از مایع یونی استفاده می‌شود. هادلستون^۴ و همکاران (۲۰۰۳) [۲۶] برای نخستین بار قابلیت این نوع جدید از سیستم‌های استخراج مایع-مایع را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها دریافتند که جداسازی مشتقات ساده و جایگزین شدن بنزین، میان آب و مایع یونی $[\text{PF}_6][\text{C}_4\text{mim}]$ به بار الکتریکی جزء حل شونده و آبگریزی نسبی بستگی دارد. از آن پس تاکنون استخراج یون‌های فلزی، ترکیبات آلی و آروماتیکی توسط مایعات یونی امتزاج ناپذیر در آب با گزینش پذیری بالایی انجام گرفته است. افزون بر آن با استفاده از مایعات یونی با پایه ایمیدازولیوم، مولکول‌های زیستی مانند دی. ان. ای. و آمینواسیدها به طور گزینش پذیر از محیط آبی به محیط آبگریز مایع یونی می‌تواند استخراج شود [۲۷،۲۸].

¹ Albertson² Rogers³ Seddon⁴ Huddleston

با استفاده از مایعات یونی برای تولید سیستم‌های دو فازی آبی، گوتوسکی^۱ و همکاران (۲۰۰۳) [۲۹] اولین بار گزارشی از نمودار فازی سیستم‌های دوفازی آبی مایع یونی-نمک ارائه دادند. آن‌ها همچنین توانایی نمک‌های کاسموتروپیک مانند K_3PO_4 را برای کاهش حلالیت ناشی از حضور نمک برای مایعات یونی آبدوست مانند [Bmim][Cl] بررسی کردند. نخستین پژوهش در مورد هسته‌ی کاتیون مایع یونی در تشکیل سیستم دوفازی آبی توسط بریدجز^۲ و همکاران (۲۰۰۷) [۳۰] صورت گرفت. در این پژوهش، از مایعات یونی [P444][Cl]، [N444][Cl] و [Bmim][Cl] به عنوان نمک‌های کائوتروپیک و از نمک‌های K_2HPO_4 ، K_3PO_4 و KOH به عنوان نمک‌های کاسموتروپیک استفاده شد. آن‌ها دریافتند که هر چه منحنی باینودال به محورهای مختصات نزدیکتر باشند، چگالی بار یون‌های مایع یونی کمتر بوده و آب‌گریزی و توانایی مایع یونی برای جدایش فازها بیشتر است. پی^۳ و همکاران (۲۰۰۷) [۳۱] تفاوت مایعات یونی بر پایه ی برمید و کلرید را در توانایی جداسازی فازها مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش از مایعات یونی [C4mim][Cl] و [C6mim][Cl] و نمک‌های K_2HPO_4 و KOH استفاده گردید. آن‌ها نتیجه گرفتند که در مایعات یونی هر چقدر خاصیت کاسموتروپیک آنیون بیشتر باشد، توانایی تشکیل فازها کاهش پیدا می‌کند که دلیل آن، رقابت آبپوشی با تشکیل فاز نمک است. صادقی و همکاران (۲۰۱۰) [۳۲] اثر دما را بر سیستم دوفازی شامل مایع یونی [C4C1mim]Br و نمک $Na_3C_6H_5O_7$ مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها دریافتند که با افزایش دما، منحنی باینودال از محورهای اصلی دور شده و باعث کاهش ناحیه دوفازی می‌شود. به عبارت دیگر در دمای بالاتر، غلظت بالاتری از نمک و مایع یونی برای تشکیل سیستم دوفازی مورد نیاز است. دلیل این تفاوت را می‌توان کاهش اندک انرژی آزاد گیبس آبپوشی یون‌های مایع یونی با کاهش دما دانست؛ بنابراین، حلالیت یون‌های مایع یونی کاهش پیدا کرده و موجب تسهیل در جدایی فازها می‌شود.

پروتئازها از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی به حساب می‌آیند که از توانایی شکستن پیوندهای پپتیدی برخوردار هستند و سهم ۶۰ درصدی کل بازار آنزیم جهانی را به خود اختصاص داده‌اند. این آنزیم‌ها کاربردهای فراوانی در صنایع مرتبط با تولید شوینده‌ها، صنایع غذایی، دارویی، نساجی و تولیدات چرم دارند. پروتئازها را می‌توان از منابع حیوانی، گیاهی، باکتریایی و قارچی استخراج نمود [۳۳]. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که جداسازی آنزیم پروتئازها از منابع مختلف با استفاده از سیستم‌های دوفازی آبی امکان‌پذیر است. در بین نتایج، استخراج پروتئاز با استفاده از سیستم آبی دو فازی پلی اتیلن گلیکول و منیزیم سولفات، تا نسبت غلظت ۳ برابر پروتئین در فاز بالا به فاز پایین مشاهده شده است [۳۴]. در یک پژوهش، یک سیستم دوفازی آبی الکل و نمک با هدف پیدا کردن شرایط بهینه‌ی جداسازی پروتئاز موجود در پوست میوه‌ی انبه، مورد بررسی قرار گرفت. در این سیستم، اتانول، پروپانول، نمک‌های سدیم سترات و پتاسیم فسفات به کار گرفته شد [۳۵]. همچنین در منابع، استخراج آنزیم پروتئاز از شیرهی یک گونه گیاه استوایی با استفاده از سیستم دو فازی آبی گزارش شده است [۳۶]. در یک مطالعه استخراج پروتئاز با استفاده از سیستم دو فازی آبی پلی اتیلن گلیکول و سدیم سترات صورت گرفت. در این پژوهش، غلظت‌های متفاوت نمک و پلیمر با وزن مولکولی متفاوت مورد بررسی قرار گرفت و در بهترین حالت جدایش، غلظت پروتئین در فاز بالا به ۵/۳ برابر غلظت آن در فاز پایین گزارش شد [۳۷]. پروتئازها با منبع قارچ نیز از جمله محصولاتی است که جداسازی آن با این روش مطرح است. در این زمینه، قابلیت جداسازی پروتئاز اسیدی حاصل از تخمیر گونه‌ی پنی سیلیوم روکفورتی با استفاده از سیستم دو فازی آبی، مورد بررسی قرار گرفت و شرایط بهینه برای انجام آن، تعیین گردید

¹ Gutowski

² Bridges

³ Pei

[۳۸]. خیاطی و همکاران (۲۰۱۶) [۳۹] سیستم‌های دو فاز آبی مختلف شامل پلی اتیلن گلیکول و نمک‌های سیترات سدیم و سیترات پتاسیم در غلظت‌های مختلف را برای استخراج آنزیم پروتئاز از سوسپانسیون تخمیری باسیلوس لیکنی فورمیس مورد آزمایش قرار دادند. آن‌ها در شرایط بهینه به فاکتور تخلیص و درصد بازبایی آنزیم ۱۲/۷ و ۴۸/۹ دست یافتند.

سیستم‌های دو فاز آبی بر پایه‌ی مایعات یونی دارای مزایای زیادی نسبت به سیستم‌های دو فاز آبی رایج (پلیمر-پلیمر و پلیمر-نمک) هستند که از آن جمله می‌توان به راحتی در بزرگ نمایی، انتقال جرم سریع تر، بازده استخراج بالاتر، ویسکوزیته کم‌تر، تشکیل کم‌تر امولسیون، عدم نیاز به استفاده از حلال‌های آلی فرار و زیست گاری با محیط اشاره کرد. تا آنجا که ما به خوبی می‌دانیم، هنوز هیچ تحقیقی در زمینه استخراج آنزیم پروتئاز توسط سامانه دوفازی آبی مایع یونی-نمک یافت نشد. از اینرو هدف از مطالعه پیش رو بررسی جایگزینی پلیمر با مایع یونی بر پایه ایمیدازولیوم در سیستم دو فاز آبی بمنظور جداسازی آنزیم پروتئاز می‌باشد. در این تحقیق برای نخستین بار پارامترهای تاثیر گذار بر روی استخراج پروتئاز همچون غلظت اولیه آنزیم، مایع یونی و نمک بررسی خواهند شد. بعلاوه شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین راندمان جداسازی آنزیم توسط الگوریتم‌های طراحی آزمایش مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت. در پایان مطابقت داده‌های آزمایشگاهی با یک مدل ترمودینامیکی مطلوب انجام خواهد شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد

مایع یونی ۱-اتیل، ۳-متیل ایمیدازولیوم اتیل سولفات ([emim][eso₄]) با درصد خلوص بالای ۹۵ درصد، از پژوهشگاه مهندسی شیمی تهیه گردید. همچنین از نمک سدیم کربنات (Na₂CO₃) با خلوص ۹۹/۹ درصد ساخت شرکت Merck آلمان و آنزیم پروتئاز با خلوص ۹۹ درصد شرکت DSM فرانسه استفاده گردید.

۲.۲. آنالیز نمونه‌ها

جهت اندازه‌گیری غلظت مایع یونی و آنزیم از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل A-160 ساخت شرکت Shimadzu به ترتیب در طول موج‌های ۲۲۰ nm و ۵۵۰ nm استفاده شد. دستگاه طیف سنجی جذب اتمی مدل PU9200 ساخت شرکت Philips برای اندازه‌گیری غلظت نمک بکار گرفته شد. همچنین از همزن مدل VELP جهت اختلاط نمونه‌ها استفاده گردید.

۳.۲. طراحی آزمایش

در این پژوهش، میزان نمک، میزان مایع یونی و میزان آنزیم به عنوان متغیرهای مورد مطالعه [۲۷، ۲۰، ۱۳] و دور همزن، دما (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان (۱۰ ساعت) به عنوان متغیرهای ثابت، در نظر گرفته شدند [۴۲-۴۰]. با استفاده از نرم افزار Design Expert 13.0.1.0 یک طراحی آزمایش (DoE^۱) باکس-بنکن^۲ برای مطالعه‌ی تاثیر متغیرهای مورد بررسی، تعریف شده و از روش سطح-پاسخ (RSM^۳) برای مدل سازی ریاضی استفاده گردید. به‌منظور

^۱ Design of Experiment

^۲ BOX-Behnken

^۳ Response Surface Method

کاهش خطای مدل و مقایسه‌ی منطقی فاکتورهایی با واحدهای متفاوت، عامل‌های طراحی انتخاب شده (نسبت مقدار آنزیم به مایع یونی و نسبت مقدار آنزیم به نمک) با استفاده از رابطه (۱) به متغیرهای بدون بعد تبدیل شدند:

$$X_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X} \quad i = 1, 2, \dots, k \quad (1)$$

در این رابطه X_i متغیر بدون بعد متناظر با عامل طراحی i ام است، X_0 مقدار X_i در نقطه مرکزی و ΔX گام تغییر مقادیر است.

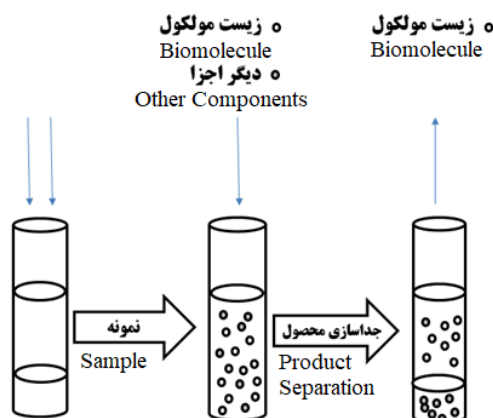
جدول ۱: ماتریس طراحی آزمایش

Table 1: Experimental matrix design

شماره آزمایش	نسبت مقدار آنزیم به مایع یونی	نسبت مقدار نمک به مایع یونی
Test number	Ratio of enzyme to ionic liquid	Ratio of salt to ionic liquid
1	0.042	0.071
2	0.077	0.133
3	0.107	0.187
4	0.133	0.235
5	0.156	0.278
6	0.176	0.316
7	0.194	0.350
8	0.210	0.380
9	0.225	0.409
10	0.238	0.435
11	0.250	0.458

۴.۲. روش انجام تحقیق

در این پژوهش، ابتدا پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آنزیم مشخص گردید. پس از تعیین غلظت و وزن مولکولی مایع یونی و نمک، دیاگرام فاز بدست آمد. سامانه دوفازی آبی با غلظت مشخص، از مایع یونی نمک ساخته و پس از تشکیل سامانه دوفازی آبی، نمونه آنزیم درون سامانه بارگذاری گردید و پس از گذشت زمان مشخص، جداسازی صورت پذیرفت (شکل ۱). سپس تاثیر پارامترهای عملیاتی بر میزان جداسازی و خلوص آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱: نمایی از جداسازی زیست مولکول‌ها با سیستم دوفازی آبی

Figure 1: Schematic of biomolecules separation by aqueous two-phase system

۵.۲. مدل سازی ترمودینامیکی

به کمک معادلات حالت می توان اثرات ساختار و برهم کنش مولکولی را روی خواص توده و رفتار فازی سیالات بررسی کرد. یکی از معادلات حالت با پایه مولکولی، معادله حالت NRTL-NRF می باشد. این معادله برای مخلوط‌هایی که به شدت غیرایده‌ال هستند و برای سیستم‌هایی که آمیختگی جزئی دارند بیان خوبی از داده‌های آزمایشگاهی ارائه می‌دهد به شرطی که در کاهش داده‌ها دقت شود تا پارامترهای قابل تنظیم به دست آید [۴۳]. مفیدترین خاصیت جزئی اضافی برای ترمودینامیک تعادل فازی، انرژی گیبس جزئی مولی اضافی است که مستقیماً به ضریب فعالیت مرتبط می‌شود. یکی از کاربردهای اصلی توابع اضافی برای توصیف خواص ترمودینامیکی مخلوط‌های مایع، پی‌ریزی روابط محکم ترمودینامیکی برای مخلوط‌های چندجزئی با هر تعداد دلخواهی از اجزا است. آن‌گاه از این روابط، ضرایب فعالیت مورد نیاز را برای پیدا کردن فوگاسیته فاز مایع می‌توانیم محاسبه کنیم. معادلات توابع اضافی به تعدادی ثابت نیاز دارد و بسیاری از این ثابت‌ها تنها از داده‌های دوتایی قابل محاسبه است. در بعضی از حالت‌ها، تمامی ثابت‌های مورد نیاز را از داده‌های دوتایی می‌توان به دست آورد. بنابراین اعمال توابع اضافی به مخلوط‌هایی با بیش از دو جزء، زحمت محقق را کاهش می‌دهد و تلاش‌های آزمایشگاهی برای توصیف مخلوط چندجزئی را به حداقل می‌رساند [۴۴]. در این تحقیق مدل ترمودینامیکی مورد استفاده در سیستم دوفازی آبی با توابع انرژی گیبس اضافی طبق رابطه (۲) مورد استفاده قرار گرفته است:

$$\frac{g^E}{RT} = \left(\frac{g^E}{RT}\right)^{NRTL-NRF} \quad (2)$$

در برهم کنش الکترولیتی از معادله NRTL-NRF استفاده شده است. ضریب اکتیویته برای معادله بالا طبق ذیل نوشته می‌شود:

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^{NRTL-NRF} \quad (3)$$

برای هر مخلوط، دو پارامتر قابل تنظیم τ_{12} و τ_{21} وجود دارد. در این بخش معادله NRTL-NRF با ضرایب فعالیت طبق رابطه (۴) استفاده می‌شود:

$$\ln \gamma_i^{NRTL-NRF} = \sum_j \eta_j \tau_{ji} \Gamma_{ji} + \sum_j [\eta_j \Gamma_{ij} (\tau_{ij} - \sum_{k=1} \eta_k \tau_{kj} \Gamma_{kj})] - \sum_j \eta_j (\tau_{ij} + \tau_{ji} - \sum_k \eta_k \tau_{kj}) \quad (4)$$

که ثابت معادله طبق رابطه (۵) محاسبه می‌گردد:

$$\Gamma_{ij} = \frac{G_{ij}}{\sum_j \eta_k G_{kj}}, G_{ij} = \exp(-\alpha_{ij} \tau_{ij}), \tau_{ij} = a_{ij} + \frac{b_{ij}}{T} \quad (5)$$

در معادله فوق Γ_{ij} انرژی بین مولکولی، G_{ij} پارامتر انرژی و مشخصه تاثیر متقابل i - j است. τ_{ij} پارامتر برهم کنش دوجزئی و a_{ij} ، b_{ij} ضرایب ثابت برهم کنش دوتایی مربوط به نظم در مخلوط می‌باشند. مقدار پارامتر بهینه‌سازی از رابطه (۶) محاسبه می‌گردد:

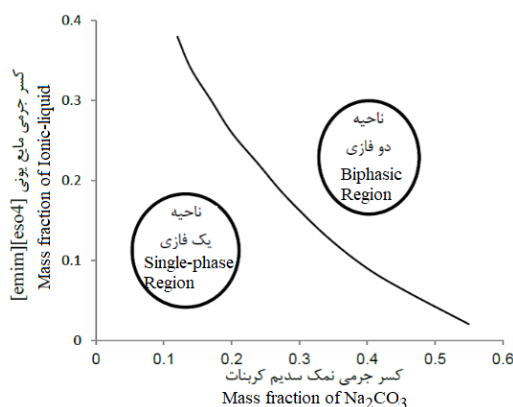
$$OF_{\eta} = \frac{1}{6N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^3 \left[\left(\frac{X_{ij}^{calc} - X_{ij}^{exp}}{X_{ij}^{exp}} \right)_I + \left(\frac{X_{ij}^{calc} - X_{ij}^{exp}}{X_{ij}^{calc}} \right)_{II} \right] \quad (6)$$

که در آن X^{exp} مربوط به داده‌های آزمایشگاهی و X^{calc} مربوط به جزء مولی بدست آمده در مدل‌سازی ترمودینامیکی می‌باشد. مقادیر جزء مولی مایع یونی-آب و نمک-آب در دمای ثابت محاسبه شده است.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. منحنی دوفازی سامانه آبی مایع یونی-نمک

به طور کلی فرآیند جدایش فازها در سیستم دوفازی آبی مایع یونی-نمک را می‌توان بدین شکل توضیح داد که وقتی نمک به مولکول‌های حلال می‌پردازد این رقابت با برتری بیشتر یون‌های معدنی و با کشش قوی تر نسبت به حلال همراه می‌شود. بنابراین مهاجرت مولکول‌های حلال از یون‌های مایع یونی در نمک‌های معدنی صورت می‌گیرد که یکی پس از دیگری باعث کاهش آب پوشی و در نهایت کاهش حلالیت یون‌های مایع یونی می‌گردد، در نتیجه فاز غنی از مایع یونی از بقیه محلول جدا می‌شود. از این رو مشاهده می‌شود که اثر نمک زدایی به طور مستقیم به قدرت آبیوشی یون‌های مختلف نمک معدنی مرتبط است. همان طور که در شکل (۲) مشخص است با افزایش قدرت نمک زدایی نمک‌های معدنی، مقدار نمک مورد نیاز برای تشکیل دو فاز در ترکیب یکسان مایع یونی کاهش می‌یابد.

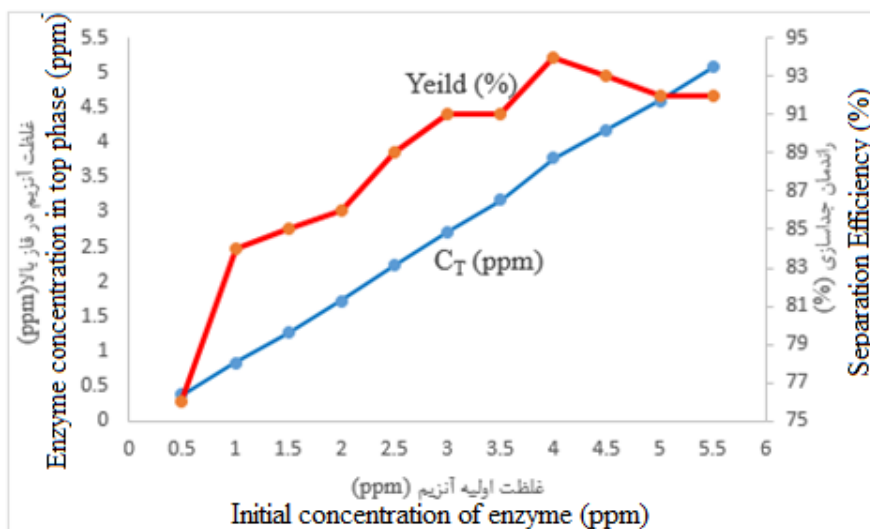


شکل ۲: منحنی دوفازی سامانه مایع یونی-نمک بدون حضور آنزیم

Figure 2: Biphasic curve of ionic liquid-salt system absence of enzyme

۲.۳. اثر غلظت اولیه آنزیم بر جداسازی پروتئاز

با توجه به شکل (۳) افزایش مقدار غلظت اولیه پروتئاز نقش مثبتی در استخراج آن داشته و اما پس از نقطه بهینه (۴ میلی گرم بر لیتر) به تدریج منجر به کاهش روند جداسازی می‌شود تا اینکه از غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر تغییرات راندمان جداسازی ثابت شده و افزایش غلظت اولیه آنزیم تاثیری روی آن نخواهد داشت. همان گونه که در شکل (۳) نمایان است در نقطه بهینه غلظت آنزیم در فاز بالا ۴ میلی گرم بر لیتر و راندمان جداسازی ۹۴ درصد می‌باشد. بنابراین، شکل (۳) نشانگر آن است که حجم بالای محلول پروتئین منجر به استخراج بیشتر آنزیم نمی‌شود.

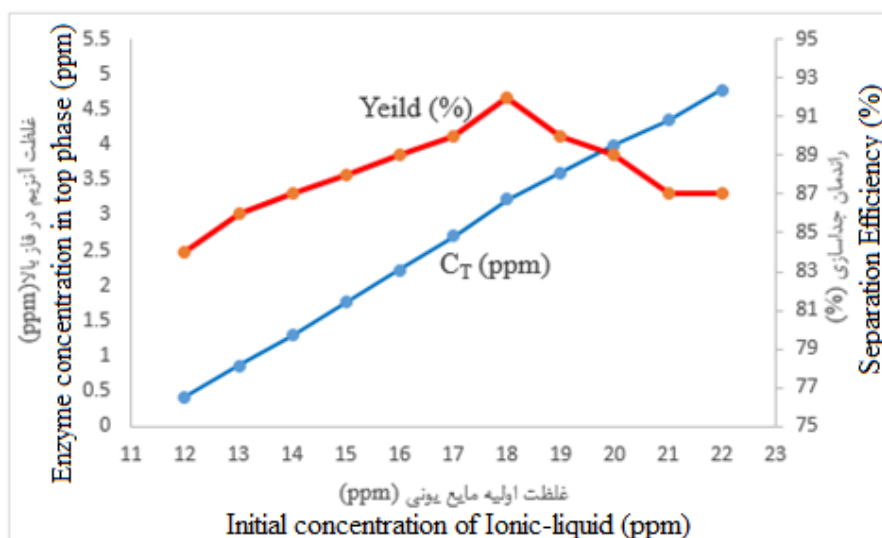


شکل ۳: غلظت پروتئاز در فاز بالا و راندمان جداسازی بر حسب غلظت اولیه آنزیم

Figure 3: Protease concentration in top phase and separation efficiency according to initial concentration of enzyme

۳.۳. اثر غلظت اولیه مایع یونی بر جداسازی پروتئاز

مطابق با شکل (۴) در مقدار ثابت نمک، راندمان استخراج پروتئاز با افزایش غلظت اولیه مایع یونی بهبود یافته است. با توجه به شکل (۴) با افزایش میزان مایع یونی از ۱۲ تا ۱۸ میلی گرم بر لیتر بازده جداسازی به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته و بعد از آن تا غلظت ۲۱ میلی گرم بر لیتر سیر نزولی پیدا کرده و در نهایت ثابت می‌شود. در نقطه بهینه غلظت آنزیم در فاز بالا و راندمان جداسازی به ترتیب ۳ میلی گرم بر لیتر و ۹۲ درصد بدست آمدند (شکل (۴)).

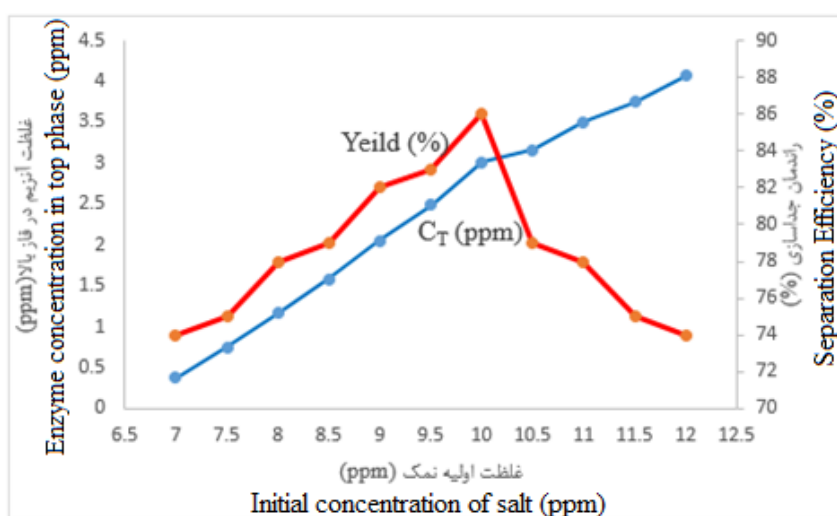


شکل ۴: غلظت پروتئاز در فاز بالا و راندمان جداسازی بر حسب غلظت اولیه مایع یونی

Figure 4: Protease concentration in top phase and separation efficiency according to initial concentration of ionic liquid

۴.۳. اثر غلظت اولیه نمک بر جداسازی پروتئاز

شکل (۵) تاثیر غلظت نمک بر روی بازده استخراج پروتئاز را نشان می‌دهد. زمانی که غلظت نمک ۱۰ میلی گرم بر لیتر می‌باشد، راندمان جداسازی به حداکثر مقدار خود در ۸۷ درصد دست می‌یابد. سپس با افزایش غلظت نمک بازده جداسازی با شیب تندی رو به کاهش می‌باشد. افزایش غلظت نمک در فاز پایین روی برهم کنش آب گریز پروتئین‌ها تاثیر می‌گذارد. افزایش غلظت نمک تا حدی می‌تواند موجب کاهش حجم آزاد موجود در فاز نمکی شده و باعث حرکت پروتئین‌ها به سمت فاز مایع یونی شود. در غلظت‌های بالای نمک خاصیت Salting out آن می‌تواند موجب ترتیب پروتئین‌ها در فصل مشترک دو فاز گردد لذا میزان جداسازی و درصد استخراج بیومولکول‌های هدف کاهش می‌یابد. با توجه به شکل (۵) در نقطه بهینه غلظت آنزیم در فاز بالا ۳ میلی گرم بر لیتر و راندمان جداسازی ۸۷ درصد می‌باشد.



شکل ۵: غلظت پروتئاز در فاز بالا و راندمان جداسازی بر حسب غلظت اولیه نمک

Figure 5: Protease concentration in top phase and separation efficiency according to initial concentration of salt

۵.۳. مدل سازی ترمودینامیکی سامانه تعادلی آبی مایع یونی-نمک

برای کاربردهای علمی، مهم‌ترین استفاده از تابع انرژی گیبس اضافی، از بسط به سیستم‌های چند جزیبی سه تایی یا بالاتر حاصل می‌شود. چنین بسطی نیاز به پارامترهای دوتایی اولیه دارد. در بعضی از موارد تعداد کمی از پارامترهای سه تایی نیز مطلوب می‌باشد اما در بیش تر موارد، پارامترهای دوتایی به تنهایی برای تعادل مایع-مایع کافی هستند. بنابراین تابع انرژی گیبس اضافی یک وسیله افزایش مقیاس می‌باشد. به این معنی که، فوگاسیته‌ها در مخلوط‌های سه جزیبی یا بالاتر می‌توانند تنها با استفاده از اطلاعات آزمایشگاهی مربوط به سیستم‌های دوتایی محاسبه شوند. این افزایش مقیاس باعث کاهش بسیار زیاد در تلاش‌های آزمایشگاهی مورد نیاز برای مشخص کردن مخلوط مایع چند جزیبی می‌گردد. مقادیر ضرایب برهم کنش دوتایی و ثوابت آن‌ها برای سیستم مورد مطالعه برابر $A=0.17$ ، $a_{ij}=6/525$ ، $b_{ij}=-6/919$ ، $a_{ij}=-6/770$ ، $b_{ij}=-6/919$ محاسبه شدند. در جدول‌های ۲ و ۳، داده‌های آزمایشگاهی و مدل‌سازی برای مخلوط سه تایی از مایع یونی $[emim][eso_4]$ + نمک (Na_2CO_3) + آب (H_2O) ارائه شده‌اند. این

جداول ترکیب درصد تعادلی و ضریب فعالیت مایع یونی و نمک را در سیستم دو فازی آبی در فاز بالا و پایین به همراه انحراف میانگین نسبی محاسبه شده توسط رابطه (۶) را نشان می‌دهند.

جدول ۲: مقادیر ترکیب درصد تعادلی آزمایشگاهی و مدلسازی فاز بالایی (مایع یونی-آب)

Table 2: The percent composition of equilibrium experimental and modeling of top phase (ionic liquid-water)

X_{exp}	X_{cal}	γ_{exp}	γ_{cal}	Error
0.29	0.29	0.43	0.39	0.007
0.30	0.31	0.40	0.37	0.006
0.30	0.31	0.41	0.35	0.019
0.31	0.31	0.38	0.36	0.003
0.31	0.32	0.38	0.35	0.009
0.33	0.33	0.34	0.32	0.003
0.33	0.33	0.34	0.32	0.004
0.31	0.32	0.37	0.35	0.004
0.31	0.32	0.37	0.35	0.002
0.30	0.31	0.39	0.37	0.004
0.30	0.30	0.40	0.38	0.003

جدول ۳: مقادیر ترکیب درصد تعادلی آزمایشگاهی و مدلسازی فاز پائینی (نمک-آب)

Table 3: The percent composition of equilibrium experimental and modeling of bottom phase (salt-water)

X_{exp}	X_{cal}	γ_{exp}	γ_{cal}	Error
0.70	0.71	0.94	0.91	0.007
0.69	0.70	0.94	0.95	0.006
0.69	0.71	0.96	0.90	0.019
0.68	0.69	0.99	0.97	0.002
0.68	0.69	0.99	0.96	0.009
0.66	0.67	1.04	1.03	0.002
0.66	0.67	1.05	1.02	0.004
0.68	0.68	1.01	0.99	0.004
0.68	0.68	1.01	0.99	0.002
0.69	0.69	0.97	0.95	0.006
0.69	0.70	0.97	0.93	0.012

۶.۳. بهینه سازی و صحت سنجی

در این تحقیق به دنبال افزایش جدا سازی آنزیم با رسیدن به مقدار بهینه برای همه پارامترهای عملیاتی هستیم تا به این طریق به حداکثر بازده ممکن برسیم. به این منظور نرم افزار شرایط عملیاتی را معرفی می‌کند، که تحت آن می‌توان به میزان حداکثر حذف آنزیم رسید. همچنین برای اطمینان از صحت میزان جداسازی تحت شرایط مطرح شده در نقطه بهینه آزمایش را در نقطه مورد نظر تکرار و نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج پیش بینی شده توسط نرم افزار موافقت خوبی داشت. این نتایج در جدول (۴) آورده شده است.

جدول ۴: شرایط بهینه بدست آمده از نرم افزار و آزمایشات

Table 4: Optimum conditions obtained from the software and experiment

پاسخ Response	مایع یونی/آنزیم Ionic liquid/Enzyme	نمک/آنزیم Salt/Enzyme	مشاهده شده Observed	پیش بینی شده Predicted	خطا Error
راندمان جداسازی Separation Efficiency	0.210	0.381	94	95	1.064

۴. نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه می توان سیستم دو فازی آبی متشکل از مایع یونی [emim][eso₄] و نمک سدیم کربنات را به عنوان یک فرآیند مناسب جهت جداسازی پروتئاز از پروتئین خام معرفی کرد. شرایط بهینه پیشنهادی توسط نرم افزار طراحی آزمایش در غلظت اولیه آنزیم، مایع یونی و نمک به ترتیب ۴، ۱۸ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر می باشد. با انجام آزمایش در شرایط بهینه غلظت آنزیم در فاز بالا و راندمان جداسازی به ترتیب ۴ میلی گرم بر لیتر و ۹۴ درصد (با خطای ۱ درصد) بدست آمدند. بعلاوه، داده های آزمایشگاهی انطباق موفقیت آمیزی با انحراف میانگین نسبی ۰/۰۰۴ در نقطه بهینه با معادله حالت NRTL-NRF از خود نشان دادند.

References

- [1] Seader, J. D., Henley, E. J. (2006), "Separation Process Principles", John Wiley & Sons Inc., New York.
- [2] Perry, R. H., Green, D. W., Aloney, J. O. (1997), "Chemical Engineering Handbook", 7th Ed., Mc Grow Hill, New York.
- [3] Riedl, W., Raiser, T. (2008), "Membrane-supported extraction of biomolecules with aqueous two-phase system", *Desalination*, 224, 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.02.088>
- [4] Gustafsson, A., Wennerstrom, H., Tjerneld, F. (1986), "Aqueous polymer two-phase systems in biotechnology", *Fluid Phase Equilibria*, 29, 365-371. [https://doi.org/10.1016/0378-3812\(86\)85036-1](https://doi.org/10.1016/0378-3812(86)85036-1)
- [5] Albertsson, P. A. (1970), "Partition of cell particles and macromolecules in polymer two-phase systems", *Advances in Protein Chemistry*, 24, 309-341. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60244-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60244-2)
- [6] Zafarani-Moattar, M. T., Hamzehzadeh, S., Nasiri, S. (2012), "A new aqueous biphasic system containing polypropylene glycol and a water-miscible ionic liquid", *Biotechnology Progress*, 28, 146-156. <https://doi.org/10.1002/btpr.718>
- [7] Pereira, J. F. B., Lima, A. S., Freire, M. G., Coutinho, J. A. P. (2010), "Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems", *Green Chemistry*, 12, 1661-1669. <https://doi.org/10.1016/j.gce.2021.11.004>
- [8] Dreyer, S., Salim, P., Kragl, U. (2009), "Driving forces of protein. Partitioning in an ionic liquid-based aqueous two-phase system", *Biochemical Engineering Journal*, 46, 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.05.005>
- [9] Zhang, J., Zhang, Y., Chen, Y., Zhang, S. (2007), "Mutual coexistence curve measurement of aqueous biphasic systems composed of [bmim][BF₄] and glycine, l-serine, and l-proline, respectively", *Journal of Chemical & Engineering Data*, 52, 2488-2490. <https://doi.org/10.1021/je0601053>
- [10] Huddleston, J. G., Willauer, H. D., Swatoski, R. P., Visser, A. E., Rogers, R. D. (1998), "Room temperature ionic liquids as novel media for clean liquid-liquid extraction", *Chemical Communications*, 16, 1765-1766. <https://doi.org/10.1039/A803999B>
- [11] Wu, B., Zhang, Y., Wang, H., Yang, L. (2008), "Temperature dependence of phase behavior for ternary systems composed of ionic liquid + sucrose + water", *The Journal of Physical Chemistry B*, 112, 13163-13165. <https://doi.org/10.1021/jp805483k>
- [12] Singh, T., Kumar, A. (2008), "Static dielectric constant of room temperature ionic liquids: internal pressure and cohesive energy density approach", *The Journal of Physical Chemistry B*, 112, 12968-12972. <https://doi.org/10.1021/jp8059618>
- [13] Gomez, E., Gonzalez, B., Calvar, N., Tojo, E., Dominguez, A. (2006), "Physical properties of pure 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate and its binary mixtures with ethanol and water at several temperatures", *Journal of Chemical & Engineering Data*, 51, 2096-2102. <https://doi.org/10.1021/je060228n>
- [14] Sorensen, J. M., Magnussen, T., Rasmussen, P., Fredenslund, A. (1979), "Liquid—liquid equilibrium data: Their retrieval, correlation and prediction Part II: Correlation", *Fluid Phase Equilibria*, 3, 47-82. [https://doi.org/10.1016/0378-3812\(79\)80015-1](https://doi.org/10.1016/0378-3812(79)80015-1)
- [15] Haghtalab, A., Paraj, A. (2012), "Computation of liquid—liquid equilibrium of organic-ionic liquid systems using NRTL, UNIQUAC and NRTL-NRF models", *Journal of Molecular Liquids*, 171, 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.04.008>
- [16] Wang, Y., Xu, X. H., Yan, Y. S., Han, J., Zhang, Z. L. (2010), "Phase behavior for the [Bmim] BF₄ aqueous two-phase systems containing ammonium sulfate/sodium carbonate salts at different temperatures: experimental and correlation", *Thermochimica Acta*, 501, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2010.01.020>

- [17] Han, J., Wang, Y., Yu, C., Li, Y., Kang, W., Yan, Y. (2012), "(Liquid + liquid) equilibrium of (imidazolium ionic liquids + organic salts) aqueous two-phase systems at T = 298.15 K and the influence of salts and ionic liquids on the phase separation", *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 45, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2011.09.004>
- [18] Haghtalab, A., Mokhtarani, B. (2004), "The new experimental data and a new thermodynamic model based on group contribution for correlation liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase systems of PEG and (K₂HPO₄ or Na₂SO₄)", *Fluid Phase Equilibria*, 215, 151-161. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2003.08.004>
- [19] Alvarenga, B. G., Virtuoso, L. S., Lemes, N. H. T., Luccas, P. O. (2013) "Phase behavior at different temperatures of an aqueous two phase ionic Liquid containing ([Bmim]BF₄ + manganese sulfate + water)", *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 61, 45-50. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2013.01.025>
- [20] Haghtalab, A., Paraj, A., Mokhtarani, B. (2013), "[1-Ethyl-3-Methyl-Imidazolium] [EthylSulfate]-based aqueous two phase systems: New experimental data and new modelling", *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 65, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2013.05.026>
- [21] Deive, F. J., Rodriguez, A., Marrucho, I. M., Rebelo, L. P. N. (2011), "Aqueous biphasic systems involving alkylsulfate-based ionic liquids", *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 43, 1565-1572. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2011.04.024>
- [22] Zafarani-Moattar, M. T., Hamzehzadeh, S. (2011), "Effect of pH on the phase separation in the ternary aqueous system containing the hydrophilic ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and the kosmotropic salt potassium citrate at T = 298.15 K", *Fluid Phase Equilibria*, 304, 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2011.01.023>
- [23] Benavides, J., Aguilar, O., Lapizco-Encinas, B. H., Rito-Palomares, M. (2008), "Extraction and purification of bioproducts and nanoparticles using aqueous two-phase systems strategies", *Chemical Engineering & Technology*, 31, 838-845. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800068>
- [24] Simoni, L. D., Lin, Y., Brennecke, J. F., Stadtherr, M. A. (2008), "Modeling liquid-liquid equilibrium of ionic liquid systems with NRTL, Electrolyte-NRTL, and UNIQUAC", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47, 256-272. <https://doi.org/10.1021/ie070956j>
- [25] Rogers, R. D., Seddon, K. R. (2003), "Ionic Liquids-Solvents of the Future?", *Science*, 32, 792-793. <https://doi.org/10.1126/science.1090313>
- [26] Huddleston, J. G., Willauer, H. D., Rogers, R. D. (2003), "Phase diagram data for several PEG + salt aqueous biphasic Systems at 25 °C", *Journal of Chemical & Engineering Data*, 48, 1230-1236. <https://doi.org/10.1021/jc034042p>
- [27] Calvar, N., Gonzalez, B., Gomez, E., Dominguez, A. (2008), "Vapor-Liquid Equilibria for the ternary system ethanol + water + 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate and the corresponding binary systems containing the ionic liquid at 101.3 kPa", *Journal of Chemical & Engineering Data*, 53, 820-825. <https://doi.org/10.1021/jc0700710d>
- [28] Wu, B., Zhang, Y., Wang, H. (2008), "Phase behavior for ternary Systems Composed of Ionic Liquid + Saccharides + Water", *The Journal of Physical Chemistry B*, 112, 6426-6429. <https://doi.org/10.1021/jp8005684>
- [29] Gutowski, K. E., Broker, G. A., Willauer, H. D., Huddleston, J. G., Swatoski, R. P., Holbrey, J. D., Rogers, R. D. (2003), "Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic system of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, met, and separations", *Journal of American Chemical Society*, 125, 6632-6633. <https://doi.org/10.1021/ja0351802>
- [30] Bridges, N. J., Gutowski, K. E., Rogers, R. D. (2007), "Investigation of aqueous biphasic system formed from solutions of chaotropic salt with kosmotropic salt", *Green Chemistry*, 9, 177-183. <https://doi.org/10.1039/B611628K>
- [31] Pei, Y., Wang, J., Liu, L., Wu, K., Zhao, Y. (2007), "Liquid-Liquid equilibria of aqueous biphasic systems containing selected imidazolium ionic liquids and salts", *Journal of Chemical & Engineering Data*, 52, 2026-2031. <https://doi.org/10.1021/jc0700315u>
- [32] Sadeghi, R., Golabiazar, R., Shekaari, H. (2010), "The salting-out effect and phase separation in aqueous solution of tri-sodium citrate and 1-butyl-3-methylimidazolium bromide", *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 42, 441-453. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2009.10.007>

- [33] Banik, R. M., Prakash, M. (2006), "Purification and characterization of laundry detergent compatible alkaline protease from *Bacillus cereus*", *Indian journal of biotechnology*, 5, 380-384.
- [34] Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. (2009), "Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems", *Process Biochemistry*, 44, 471-476. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.12.018>
- [35] Amid, M., Shuhaimi, M., Sarkerc, M. Z. I., Manap, M.Y.A (2012), "Purification of serine protease from mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) peel using an alcohol/salt aqueous two phase system", *Food Chemistry*, 132, 1382-1386. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.125>
- [36] Rawdkuen, S., Pintathong, P., Chaiwut, P., Benjakul, S. (2011), "The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins" *Food and Bioproducts Processing*, 89, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.02.001>
- [37] Porto, T. S., Silva, G. M. M., Porto, C. S., Cavalcanti, M. T. H., Neto, B. B., Lima-Filho, J. L., Converti, A., Porto, A. L. F., Pessoa, A. (2008), "Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system", *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47, 716-721. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.12.004>
- [38] Pericin, M. D., Madjarev-Popovic, Z. S., Vastag, G. (2008), "Partitioning of acid protease from *Penicillium roqueforti* in aqueous two-phase system Polyethylene Glicol/Phosphate" *Acta Periodica Technologica*, 39, 171-180. <https://doi.org/10.2298/APT0839171P>
- [39] Khayati, G., Firoozi, M., Ahmadi, M. (2016), "Partitioning of protease in PEG/sodium citrate and potassium citrate aqueous two-phase system", *Journal of Separation Science and Engineering*, 8, 1-6. (In Persian) <https://doi.org/10.22103/jsse.2016.1143>
- [40] Alhelli, A. M., Abdul Manap, M. Y., Mohammed, A. S., Mirhosseini, H., Suliman, E., Shad, Z., Mohammed, N. K., Hussin, A. S. M. (2016), "Response surface methodology modelling of an aqueous two-phase system for purification of protease from *penicillium candidum* (PCA 1/TT031) under solid state fermentation and its biochemical characterization", *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1-23. <https://doi.org/10.3390/ijms17111872>
- [41] Bai, Z., Chao, Y., Zhang, M., Han, C., Zhu, W., Chang, Y., Li, H., Sun, Y. (2013), "Partitioning behavior of papain in ionic liquids-based aqueous two-phase systems", *Journal of Chemistry*, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2013/938154>
- [42] Lu, Y., Lu, W., Wang, W., Guo, Q., Yang, Y. (2011), "Thermodynamic studies of partitioning behavior of cytochrome c in ionic liquid-based aqueous two-phase system", *Talanta*, 85, 1621-1626. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.058>
- [43] Zaytsev, I. D., Assev, G. G. (1992), "Properties of Aqueous Solutions of Electrolytes", CRC Press Inc.
- [44] Karkas, T. Onal, S. (2012), "Characteristics of invertase partitioned in poly(ethylene glycol)magnesium sulfate aqueous two-phase system", *Biochemical Engineering Journal*, 60, 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.11.005>