نشریه علوم و مهندسی جداسازی
دوره هفتم ، شماره اول، سال ۱۳۹٤، صفحه ٤٥-٥٣

Journal of Separation Science and Engineering
Vol. 7, No. 1 , pp 45-53

استخراج آنزیم لیپاز تولیدی توسط قارچ *Aspergillus niger* از براث تخمیری با استفاده از سیستم دو فازی آبی

غلام خیاطی [۱،*] ، صاحبه علیزاده [۱]

۱. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

مشخصات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۵ دی ۹۲
دریافت پس از اصلاح: ۱۵ آذر ۹۳
پذیرش نهایی: ۱۵ بهمن ۹۳

کلمات کلیدی:
لیپاز
استخراج
سیستم دو فازی آبی
پلی اتیلن گلایکول

چکیده

یکی از چالش‌های عمده در صنعت بیوتکنولوژی، تخلیص پروتئین و آنزیم‌های مطلوب از مجموعه بیومولکولهای موجود در سوسپانسیون تخمیری است. هدف از این تحقیق جداسازی لیپاز با استفاده از سیستم‌های دوفازی آبی می‌باشد. سیستم دوفازی آبی روشی ارزشمند برای جداسازی و تخلیص مخلوط‌هایی از بیومولکول ها است. در این تحقیق سیستم‌های دوفازی آبی مختلف شامل پلی اتیلن گلایکول با وزن مولکولی ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ و نمک‌های اگزالات پتاسیم و تارتارات سدیم - پتاسیم برای استخراج لیپاز از سوسپانسیون تخمیری مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از بررسی پارامترهای تأثیرگذار بر سیستم، بهترین شرایط عملیاتی برای استخراج لیپاز شامل ۱۷/۵ درصد وزنی پلی اتیلن گلایکول ۴۰۰۰ و ۱۹/۵ درصد وزنی اگزالات پتاسیم و ۱۰/۲ درصد وزنی به وزنی سوسپانسیون تخمیری در pH=۵ تعیین گردید. در این شرایط ضریب جداسازی ۱/۲۹، درصد بازیابی آنزیم ۸۴/۹۳ ، فاکتور تخلیص ۱۷/۵۹و فعالیت ویژه آنزیمی ۲۲/۲۲ بدست آمد.

* عهده دار مکاتبات
khayati@guilan.ac.ir

حقوق ناشر محفوظ است.

۱-مقدمه

لیپازها جزء آنزیم های گروه هیدرولازها بوده و عملکرد زیستی اصلی آنها تبدیل تری گلسیرید نامحلول به اسیدهای چرب و گلیسرول می‌باشد. آنها آنزیم‌های مهمی هستند که سطح قابل توجهی از فعالیت و پایداری را در هر دو محیط آبی و غیر آبی دارا می‌باشند. همچنین این آنزیم‌ها از قابلیت انجام واکنش‌های کاتالیزوری چندگانه مثل ترنس استریفیکاسیون، استریفیکاسیون و غیر استریفیکاسیون برخوردارند. در میان کل تولیدات آنزیم در جهان، آنزیم‌های لیپولتیک از مهم‌ترین گروه آنزیم‌ها در صنعت بوده و کاربرد وسیعی در صنایع مختلف ازجمله صنایع غذایی، چرم و کاغذ سازی، تصفیه‌ی فاضلاب (تجزیه و حذف مواد روغنی)، حوزه‌های پزشکی و دارو سازی کاربرد دارند [۱].

قارچها به طور گسترده‌ای به عنوان میکروارگانیسم های تولید کننده آنزیم لیپاز مورد استفاده قرار می‌گیرند. از تولید کننده‌های میکروبی شناخته شده در این بین می‌توان به گونه های مختلف جنس آسپرژیلوس اشاره کرد [۴-۲].

لیپاز میکروبی با استفاده از روش‌های متداول سنتی مانند ترسیب یا کروماتوگرافی با جداسازی جزئی و بازیابی کم، تخلیص می‌شود. فرآیند تخلیص این آنزیم شامل مشکلات زیاد ناشی از پیچیدگی مخلوط پروتئینی و نیاز به حفظ فعالیت آنزیمی می‌باشد [۵] .

گام مهم در طراحی هر سیستم فرآیند تخمیری، رشد مناسب، روش‌های موثر جداسازی و تخلیص محصولات مطلوب است. از آنجا که اکثر بیومولکول ها دامنه پایداری بسیار کمی در برابر تغییرات pH، درجه حرارت، فشار اسمزی، بار سطحی و... دارند؛ انتخاب روش اختصاصی سازگار جداسازی و تخلیص چالش برانگیز و مهم است. در بین فرآیندهای جداسازی محصولات فرآیندهای شیمیایی، استخراج مایع- مایع راهکاری مناسب محسوب می‌شود. به طور کلی، استخراج مایع - مایع، با انتقال اجزاء خاص از یک فاز به فاز دیگر انجام می‌شود. این فازها در یکدیگر نامحلول یا نیمه محلول هستند و در تماس با هم قرار دارند. اما استخراج مایع - مایع که در صنعت و با به کارگیری حلال‌های آلی انجام می‌شود برای بازیابی محصولات فرآیندهای زیستی مناسب نیست زیرا بیومولکول هایی مانند پروتئین به اندازه کافی در حلال‌های آلی قابل انحلال نیستند و احتمال از بین رفتن آن‌ها وجود دارد. بنابراین سیستم‌های دو فازی آبی باید جایگزین سیستم آب و حلال آلی شوند [۶].

سیستم‌های دو فازی آبی شامل دو پلیمر ناسازگار، یک پلیمر و یک نمک و یا مواد فعال سطحی در محلول‌های آبی می‌باشد. سیستم دو فازی آبی محیطی خاص را به وجود می‌آورد که منجر به جداسازی بیومولکول ها یا مولکول‌های هدف در یک فاز می‌شود. از آنجا که بخش عمده‌ای از هر دو فاز (۸۵٪-۸۰٪) شامل آب است بنابراین ساختار ذاتی بیومولکول ها حفظ می‌شود. استخراج با استفاده از سیستم دوفازی آبی جایگزین بسیار مناسبی برای مراحل متعدد فرآیندهای پایین دستی مانند تصفیه ، تغلیظ و... می‌باشد. به علاوه انتقال جرم تعادلی به سادگی حاصل می‌گردد و جداسازی به سرعت انجام می‌شود. سیستم دو فازی آبی قابلیت استفاده در مقیاس صنعتی بزرگ و در کشت‌های پیوسته را دارد. سیستم‌های دوفازی آبی پلیمر- پلیمر و سیستم‌های پلیمر-نمک نسبت به روش‌های متداول استخراج با حلال‌های آلی مزیت‌های بیشتری دارند[۷] و از آنها به طور گسترده برای جداسازی پروتئین و سایر مولکول‌های زیستی استفاده شده است [۹-۸].

جداسازی پروتئین‌های هدف به وزن مولکولی PEG و اجزای تشکیل دهنده سیستم دوفازی آبی بستگی دارد زیرا این پارامترها از طریق تغییر میزان برهمکنش های آب گریزی که به برهمکنش بین پلی اتیلن گلایکول و نواحی آب گریز پروتئین‌ها مربوط می‌شود، بر تفکیک پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارند [۱۰]. تفکیک مولکول‌های زیستی در سیستم‌های دو فازی آبی همچنین تا حدودی متأثر از عواملی چون pH، دما، خواص سطحی، اندازه و غلظت مولکول‌های زیستی و نوع پلیمر و نمک است [۹]. انتخاب غلظت مناسب نمک از مهم‌ترین فاکتورهای جداسازی پروتئین‌ها در سیستم‌های دو فازی آبی است. افزایش غلظت نمک تا حدی می‌تواند موجب کاهش حجم آزاد موجود در فاز نمکی شده و باعث حرکت پروتئین‌ها به سمت فاز پلیمری شود. در غلظت‌های بالای نمک خاصیت salting out آن موجب ترسیب پروتئین‌ها در فصل مشترک دو فاز می‌گردد لذا ضریب جداسازی و درصد استخراج بیومولکول های هدف کاهش می‌یابد. بنابراین انتخاب درصد مناسب غلظت نمک از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد [۱۱].

در این پژوهش تفکیک و تخلیص آنزیم لیپاز تولیدی توسط *Aspergillus niger* از آبگوشت تخمیر توسط سیستم دو فاز آبی با استفاده از انواع نمک‌های آلی اگزالات و تارتارات انجام شد. تأثیر پارامترهای مختلف مانند نوع سیستم دوفازی،

نسبت حجم فازها، pH، غلظت نمک و .... مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های چنین سیستم دوفازی آبی در خصوص جداسازی آنزیم لیپاز تولید شده از قارچ *A.niger* پیشتر گزارش نشده است.

۲ - مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی:

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده با بالاترین درجه خلوص تهیه شدند. قارچ *Aspergillus niger* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) تهیه شد.

۲-۲- شرایط تخمیر:

برای تهیه پیش کشت آبگوشت مغذی حاوی ۲ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم پپتون ، ۱ گرم عصاره گوشت و ۵ گرم NaCl به یک لیتر آب مقطر اضافه شد. فرایند تخمیر غوطه‌ور جهت تولید آنزیم لیپاز در فلاسک های ۲۵۰ میلی لیتری با محیط کشت حاوی Czepek-dox media (متشکل از ساکاروز ۳۰ g/L، نیترات سدیم ۲/۵ g/L، دی پتاسیم فسفات ۱ g/L، سولفات منیزیم ۰/۵ g/L، کلرید پتاسیم ۰/۵ g/L و سولفات آهن ۰/۰۱ g/L) با ۰/۱ درصد وزنی به حجمی از روغن زیتون به عنوان القاء کننده انجام شد. پس از استریل سازی محیط (تحت شرایط ۱۲۱° C به مدت ۱۵ دقیقه) ، مایه تلقیح قارچ (دارای ۱۰۷ اسپور در هر لیتر) به آن اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری محیط در دمای ۳۰° C با تکانش rpm ۱۵۰، توده قارچی توسط سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه طی ۱۰ دقیقه جداسازی شد [۱۲]. محلول صاف شده روئی به عنوان محلول آنزیمی خام جهت جداسازی در سیستم دوفازی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳- روش انجام آزمایش‌ها:

همه سیستم‌های دو فاز آبی در لوله‌های سانتریفیوژ ۱۵ میلی لیتری با حجم برابر از محلول‌های نمکی و محلول پلی اتلین گلیکول (PEG) تهیه گردیدند. به منظور بررسی اثر وزن مولکولی PEG و نوع نمک بر چگونگی جداسازی لیپاز از براث تخمیر در سیستم دوفازی آبی، محلول نمک‌های اگزالات پتاسیم و تارتارات سدیم و پتاسیم با محلول پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ با ترکیب درصد مشخص (جدول ۱) مخلوط شدند.

پس از افزودن مقدار مناسب از محلول آنزیم تولیدی (هر میلی لیتر از براث تخمیری عاری از سلول حاوی ۱۷/۴۶ میلی گرم پروتئین با فعالیت ویژه آنزیمی ۴/۴۱ U/mg)، لوله سانتریفیوژ به شدت تکان داده شد سپس فازها توسط سانتریفوژ در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه طی ۱۰ دقیقه جداسازی شدند. پس از جدایی فازها ، به منظور تعیین نسبت حجمی، حجم هر فاز اندازه گیری شد. نمونه از فاز بالا و پایین با استفاده از یک سرنگ پلاستیکی با سرسوزن کوتاه و بلند به دقت کشیده شد. در نهایت آنالیز فعالیت آنزیمی و غلظت پروتئین درمورد هر نمونه انجام شد.

جدول (۱) ترکیب درصد اجزاء سیستم‌های دوفازی برای جداسازی آنزیم لیپاز

نوع سیستم	درصد وزنی به وزنی پلیمر	درصد وزنی به وزنی نمک
PEG4000 + اگزالات پتاسیم	۱۸/۲	۱۲/۵
PEG8000 + اگزالات پتاسیم	۱۸/۲	۱۲/۵
PEG4000 + تارتارات سدیم	۱۸/۱	۱۴/۸
PEG8000 + تارتارات سدیم	۱۸/۱	۱۴/۸

از آنجا که یکی از چالش‌های مهم در جداسازی آنزیم‌ها در استفاده از سیستم‌های دو فازی آبی، تعیین سیستم مناسب برای استخراج آنزیم است لذا ابتدا از بین چهار سیستم PEG4000+اگزالات، PEG8000+اگزالات، PEG4000+ تارتارات، PEG8000+تارتارات، سیستم دوفازی مناسب انتخاب گردید. سپس جهت بررسی تعیین شرایط بهینه فرایند استخراج، پارامترهائی نظیر اثر غلظت نمک، میزان آنزیم، pH و نسبت حجمی فازها مورد مطالعه قرار گرفت. کلیه آزمایشات در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با سه بار تکرار انجام شد.

۲-۴- روش‌های آنالیز:

اندازه گیری فعالیت آنزیم لیپاز با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از پارا نیترو فنیل پالمیتات (*p*NPP) انجام شد [۱۳]. برای این منظور یک حجم از محلول ۱۴/۳ میلی مولار پارا نیترو فنیل پالمیتات (محلول در ایزوپروپا نول) با ۹ حجم محلول بافری (pH =۷) ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCl، حاوی ۲۰ میلی مولارکلسیم کلرید و ۰/۲۵درصد (وزنی به حجمی) پلی ونیل الکل مخلوط گردید. سپس ۳/۵ میلی لیتر از محلول فوق با ۲۰۰ میکرولیتر محلول آنزیمی جهت انجام واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. در نهایت میزان پارا نیترو فنل آزاد شده از واکنش آنزیم و سوبسترا در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه گیری شد. بر اساس

تعریف یک واحد فعالیت آنزیمی (U/ml)، مقدار آنزیمی است که یک میکرومول پارا نیترو فنل را در هر دقیقه تحت شرایط فوق تولید کند.

غلظت پروتئین‌ها به روش برادفورد [۱۴] با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. جذب محلول حاوی ۴/۵ میلی لیتر از معرف بیوره و ۰/۵ میلی لیتر از نمونه پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. مقدار پروتئین بر حسب (mg/ml) گزارش گردید.

نتایج با چند پارامتر شامل ضریب تفکیک پروتئین (*Kp*)، ضریب تفکیک فعالیت آنزیمی (*Ke*)، درصد استخراج آنزیم (*Y*)، فاکتور تخلیص (*PF*) و فعالیت ویژه (*SA*) در سیستم-های دو فاز آبی به صورت زیر تعریف و تحلیل شدند [۱۵].

$$K_{\mathrm{p}} = C_{\mathrm{p,t}} / C_{\mathrm{p,b}} \qquad (۱)$$

$C_{\mathrm{p,t}}$ و $C_{\mathrm{p,b}}$ بترتیب غلظت پروتئین در فاز بالا و پائین هستند.

$$K_{\mathrm{e}} = A_{\mathrm{t}} / A_{\mathrm{b}} \qquad (۲)$$

A_{t} و A_{b} به ترتیب فعالیت آنزیم لیپاز در فاز بالا و پائین را نشان می‌دهند.

$$Y\,(\%) = \frac{100}{((RK_e)^{-1}+1)} \qquad (۳)$$

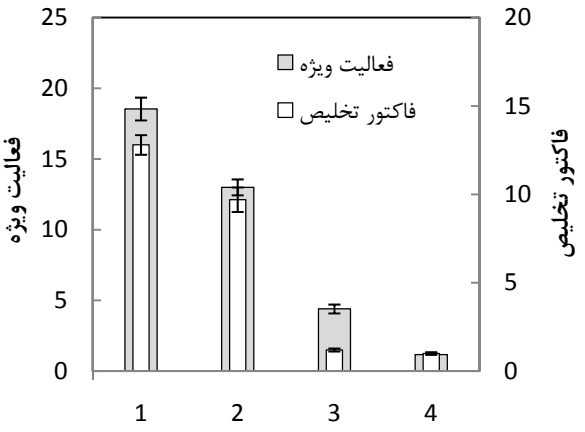
نسبت حجمی فازها (R) به صورت نسبت حجم فاز غنی از پلیمر (حجم فاز بالا) به حجم فاز غنی از نمک (حجم فاز پائین) تعریف می‌گردد.

$$PF_{\mathrm{t}} = SA_{\mathrm{t}} / SA_{\mathrm{i}} \qquad (۴)$$

SA_{t} و SA_{i} به ترتیب فعالیت ویژه آنزیم در فاز بالا و محلول اولیه آنزیمی است. نسبت فعالیت آنزیمی به غلظت پروتئین در نمونه فعالیت ویژه آنزیمی نامیده می‌شود.

۳ - نتایج و بحث

در تحقیق حاضر برای جداسازی آنزیم لیپاز تولیدی توسط قارچ *Aspergillus niger* از سیستم دو فازی پلیمر (پلی اتیلن گلیکول)- نمک به دلیل مزایایی مانند ویسکوزیته کم (در مقایسه با سیستم‌های پلیمر-پلیمر) و هزینه ناچیز (در مقایسه با پلیمرهایی مانند پلی پروپیلن گلایکول و دکستران) استفاده شد. استفاده از پلیمرهایی که دارای گرانروی بالا می‌باشند موجب کاهش شدید فعالیت آنزیم لیپاز در فاز غنی از پلیمر می‌شود [۱۰]. از آنجا که نمک‌های اگزالات پتاسیم و



شکل ۱ - اثر نوع سیستم‌های دوفازی آبی (۱) PEG4000 + نمک اگزالات پتاسیم ، (۲) PEG8000 + نمک اگزالات پتاسیم، (۳) PEG4000 + نمک تارتارت سدیم و پتاسیم ، (۴) PEG8000 + نمک تارتارت سدیم و پتاسیم بر فعالیت ویژه و فاکتور تخلیص آنزیم لیپاز استخراجی از سوسپانسیون تخمیری

تارتارات سدیم پتاسیم جزء نمک‌های آلی بوده و نسبت به سیستم‌های متداولی که معمولا شامل نمک‌های سولفات و فسفات می‌باشند کمتر بررسی شده بودند، انتخاب گردیدند. استفاده از نمک‌های آلی در جداسازی آنزیم‌ها به دلیل حفظ ماهیت پروتئینی آنزیم و کمک به ایجاد پیکره بندی باز آنزیم و حفظ جایگاه‌های فعال آنزیمی و در نتیجه حفظ میزان فعالیت آنزیمی مورد توجه می‌باشد [۱۶].

۳-۱- تأثیر نوع سیستم دوفازی بر میزان استخراج نزیم

شکل ۱ تأثیر نوع سیستم‌های دو فازی آبی بر فعالیت ویژه و فاکتور تخلیص آنزیم لیپاز در سیستم‌های نمکی اگزالات پتاسیم و تارتارات سدیم و پتاسیم را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که با افزایش وزن مولکولی پلیمرها، پارامترهای فوق کاهش یافتند.

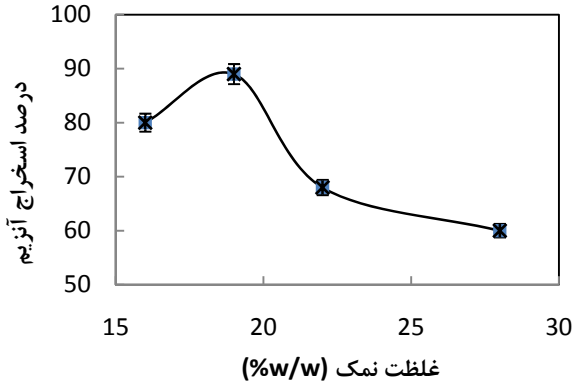
خود موجب افزایش هیدراتاسیون (آب پوشی) پروتئین‌ها می‌شود[۱۸]. همچنین با افزایش زنجیره پلیمری PEG رفتار آبگریزی آن افزایش می‌یابد. بنابراین با افزایش وزن مولکولی پلیمر ضریب جداسازی کاهش می‌یابد. باید توجه نمود که استفاده از پلیمرهایی با وزن‌های مولکولی خیلی کم نیز توصیه نمی‌گردد زیرا با کاهش بیش از حد وزن مولکولی پلیمر، سایر پروتئین‌ها (غیر از آنزیم) در فاز پلیمری تجمع می‌یابند، در نتیجه جداسازی و تخلیص آنزیم از سایر پروتئین‌ها دشوار خواهد شد [۱۷]. از آنجا که در سیستم شامل نمک اگزالات پتاسیم و پلی اتلین گلیکول ۸۰۰۰ ، ضریب جداسازی سایر

پروتئین‌ها نسبت به آنزیم افزایش یافت بنابراین فاکتورهای فعالیت ویژه آنزیمی و فاکتور تخلیص آنزیم نسبت به سایر پروتئین‌ها در این سیستم کاهش پیدا کرد (شکل ۱). به همین دلیل در ادامه تحقیق، سیستم نمک اگزالات پتاسیم و پلیمر پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی ۴۰۰۰ انتخاب گردید.

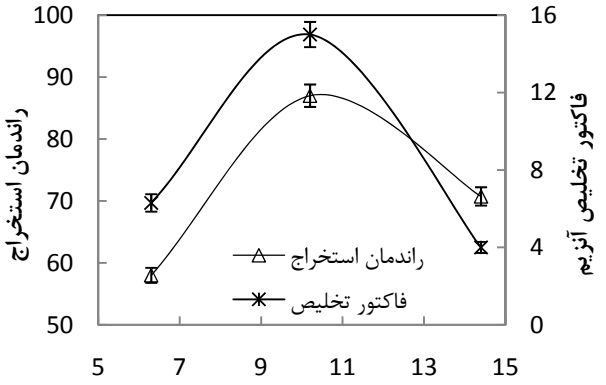
۳-۲- اثر غلظت نمک بر میزان استخراج آنزیم لیپاز

برای بررسی اثر غلظت نمک بر میزان استخراج آنزیم لیپاز در سیستم دوفازی آبی حاوی نمک اگزالات پتاسیم و PEG 4000 ، غلظت محلول نمکی از ۱۶ تا ۲۸ درصد وزنی افزایش داده شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک درصد استخراج آنزیم به طور محسوسی کم می‌شود (شکل ۲).

افزایش غلظت نمک در فاز پایین روی برهمکنش های آبگریز پروتئین‌ها و فاز پلیمری تأثیر می‌گذارد. وقتی که ضریب جداسازی آنزیم در فاز پلیمری بیشینه باشد حاکی از آن است که توازن خوبی بین آب گریزی پلیمر و خاصیت salting out نمک وجود دارد. از آنجا که یون های نمک با گروه‌های باردار با بار مخالف پروتئین‌ها برهمکنش دارند، با تشکیل لایه‌های دوتایی از گروه‌های یونی موجب دهیدراته شدن (حذف مولکول آب) پروتئین‌ها می‌شوند. این خاصیت آب پوشی یون های نمک و دهیدراته کردن پروتئین‌ها باعث گسترش نواحی آب گریز پروتئین‌ها می‌شود [۱۹].



شکل ۲ - اثر غلظت نمک بر درصد استخراج آنزیم لیپاز در سیستم‌های دوفازی آبی PEG4000 + نمک اگزالات پتاسیم



شکل ۳ - تأثیر بار حجمی سوسپانسیون آنزیمی بر راندمان استخراج و فاکتور تخلیص آنزیم لیپاز در سیستم‌های دوفازی آبی PEG4000 + نمک اگزالات پتاسیم

۳-۳- تأثیر بار حجمی سوسپانسیون آنزیمی بر استخراج لیپاز

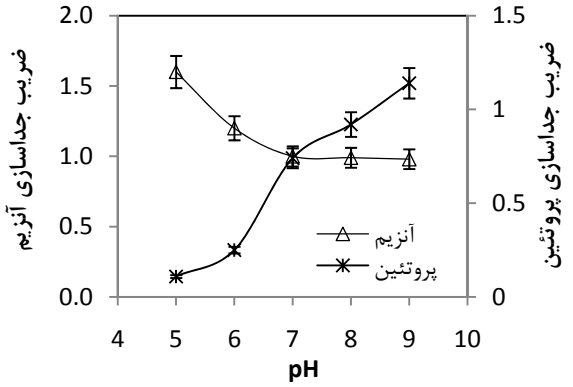
تأثیر بار حجمی سوسپانسیون آنزیمی اضافه شده به سیستم دو فازی در استخراج و تخلیص محصول هدف حائز اهمیت می‌باشد. میزان بار حجمی سوسپانسیون آنزیمی اضافه شده به سیستم دوفازی نه تنها موجب تغییر نسبت‌های فازی بلکه موجب تغییر در رفتار ماکرومولکولهای تشکیل دهنده دو فاز و بنابراین موجب تغییر رفتار تفکیک پذیری پروتئین‌های هدف نیز می‌شود [۲۰]. شکل ۳ تأثیر میزان سوسپانسیون آنزیمی اضافه شده را بر استخراج لیپاز در سیستم دوفازی آبی نشان می‌دهد.

افزایش بیش از حد مقدار آنزیم لیپاز و سایر اجزای موجود در سوسپانسیون تخمیری می‌تواند موجب تغییر نسبت حجمی دو فاز و کاهش کارایی سیستم‌های دو فازی آبی شود. در این تحقیق مقادیر مختلفی از سوسپانسیون آنزیمی به سیستم‌های دو فازی حاوی درصدهای یکسانی از محلول‌های پلیمری و محلول‌های نمکی اضافه شد و بررسی‌ها نشان داد که در میزان بار حجمی ۱۰/۲ ٪ نتایج بهتری برای جداسازی آنزیمی حاصل شد (شکل ۳).

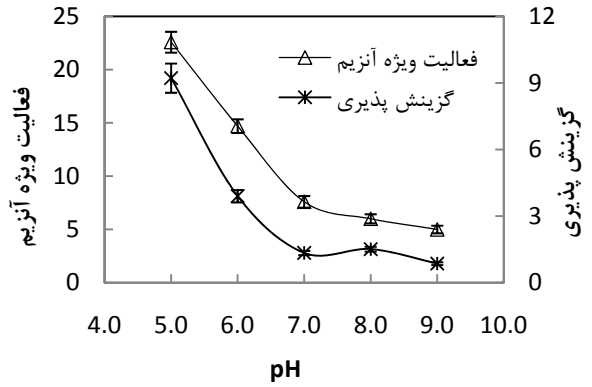
۳-۴- اثر pH بر میزان استخراج آنزیم

برای مطالعه تأثیر pH بر میزان استخراج آنزیم، pH سیستم دو فازی پلیمر PEG4000 و نمک اگزالات پتاسیم در محدوده ۵ تا ۹ تنظیم شد. نتایج نشان داد که با افزایش pH از ۵ تا ۹ ضریب جداسازی آنزیمی کاهش و ضریب جداسازی پروتئین افزایش یافت (شکل ۴).

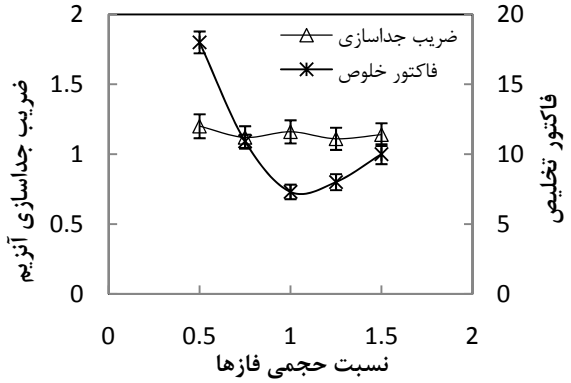
این بدان معنی است که با افزایش pH، آنزیم لیپاز بیشتری در فاز غنی از نمک تجمع یافت. در حالی‌که سایر پروتئین‌ها در فاز غنی پلیمر تجمع یافتند. در pH=۵ بیشترین مقدار فعالیت ویژه آنزیمی و همچنین گزینش پذیری حاصل گردید (شکل ۵). لذا این pH برای سیستم‌های دو فازی استخراج آنزیم لیپاز تولید شده مناسب تشخیص داده شد.



شکل ۴- تأثیر pH بر ضریب جداسازی آنزیم و پروتئین در سیستم‌های دوفازی آبی PEG4000 + نمک اگزالات پتاسیم



شکل ۵ - تأثیر pH بر گزینش پذیری و فعالیت ویژه آنزیم لیپاز در سیستم‌های دوفازی آبی PEG4000 + نمک اگزالات پتاسیم



شکل ۶ –اثر نسبت حجمی فازها بر ضریب جداسازی آنزیم لیپاز و فاکتور تخلیص در سیستم‌های دوفازی آبی PEG4000 + نمک اگزالات پتاسیم

نتایج مشابهی توسط Giovana و همکاران در مورد بررسی اثر pH در استخراج آنزیم لیپاز حاصل از مخمر *acepacia Burkholderi* ارائه شده است به طوری که در محدوده pH بین ۷-۵، ۸۰٪ از فعالیت آنزیمی لیپاز حفظ گردید و در pH های بازی فعالیت آنزیمی کاهش یافت. تأثیرpH بر آنزیم ناشی از ایجاد تغییر در حالت‌های یونیزاسیون مواد تشکیل دهنده سیستم می‌باشد بنابراین pH عامل مهمی در استخراج آنزیم‌ها محسوب می‌گردد [۲۱].

اگر میکروارگانیسم ها در شرایط قلیایی رشد کنند، آنزیم تولید شده دارایpH بهینه قلیایی خواهد بود و اگر در شرایط اسیدی رشد کنند آنزیم تولید شده دارای pH بهینه اسیدی خواهد بود [۱۹]. به طور کلی پروتئین از آمینواسیدهایی تشکیل شده است که دارای گروه‌های باردار با بار مثبت یا منفی (بسته به برخورداری از گروه‌های اسیدی یا بازی) هستند و مجموع بار الکتریکی گروه‌های آمینو اسید بار خالص پروتئین را تشکیل می‌دهد. در صورتی که pH محیط برابر با pH نقطه ایزوالکتریک باشد، مجموع بارالکتریکی گروه‌های آمینو اسید معادل صفر است. اگر مقدار pH یک محلول آبی حاوی پروتئین بالای نقطه ایزوالکتریک باشد، پروتئین دارای بار منفی خواهد بود و در غیر این صورت بار مثبت دارد. چنانچه pH سیستم بالاتر از نقطه ایزوالکتریک پروتئین هدف فرآیند استخراج تنظیم گردد، با برهم کنش الکتریکی بین پروتئین حامل بار منفی و پلی اتیلن گلایکول، استخراج بهتر انجام می‌شود اما افزایش بیش از حد pH ممکن است نتیجه معکوس در پی داشته باشد [۲۲].

۳-۵- اثر نسبت حجمی فازها بر میزان استخراج آنزیم لیپاز

برای بررسی اثر نسبت حجمی فازهای تشکیل دهنده سیستم استخراج آنزیم، نسبت‌های حجمی مختلف ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵ و ۱/۵ از دو فاز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با تغییر نسبت حجمی فازها ضریب جداسازی آنزیم تغییر چندانی نمی‌کند (شکل ۶).

باید توجه نمود که رفتار تفکیک پذیری پروتئین‌ها تحت تأثیر نسبت حجمی دوفاز نیست [۲۴-۲۳]. زیرا تفکیک پذیری نسبی پروتئین تغییر نمی‌کند. این حقیقت که نسبت حجمی دو فاز می‌تواند فاکتور تخلیص استخراج آنزیمی را تحت تأثیر قرار دهد از این نظر حائز اهمیت است که با کاهش بیش از حد نسبت حجمی مقدار فاکتور خلوص کاهش می‌یابد. این امر به دلیل ترسیب و تقلیب برخی پروتئین‌ها در فصل مشترک دو فاز و ناشی از کاهش حجم فاز بالایی (غنی از پلیمر) است. زیرا با کاهش شدید حجم آزاد در فاز بالایی میزان لیپاز موجود در این فاز کاهش می‌یابد [۱۵]. لذا برای ارزیابی اثر نسبت حجمی دو فاز بر میزان استخراج آنزیم تنها به یک فاکتور نباید بسنده نمود و پارامترهای دیگری مانند فاکتور تخلیص و فعالیت ویژه آنزیمی نیز به طور همزمان باید

در نظر گرفته شوند [۱۵]. همان‌طور که مشاهده گردید در نسبت حجمی دو فاز معادل ۰/۵ بیشترین مقدار فاکتور تخلیص آنزیمی بدست آمد (شکل ۶) و در این نسبت حجمی از سیستم دوفازی میزان تخلیص لیپاز بیشتر بوده است.

۴- نتیجه گیری

هدف از بررسی توزیع بیومولکول در سیستم‌های دوفازی آبی دستیابی به شرایط مناسب برای افزایش بازدهی جداسازی بیومولکول ها خصوصاً آنزیم‌ها از محیط تخمیر است. ملایمت سیستم‌های دوفازی آبی در مقایسه با سیستم‌های استخراج با حلال آلی، نسبت به مواد بیولوژیک باعث می‌شود این مواد در اثر جداسازی آسیب ندیده و تغییر شکل ندهند. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که ترکیب فازی سیستم‌های دو فازی آبی اثر معنا داری بر تفکیک آنزیم لیپاز دارند. در این تحقیق سیستم دو فازی حاوی پلی اتیلن گلایکول با وزن مولکولی ۴۰۰۰ + نمک اگزالات پتاسیم برای استخراج آنزیم لیپاز حاصل از براث تخمیری قارچ *Aspergillus niger* مناسب تشخیص داده شد. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که آنزیم لیپاز به شدت تمایل به تفکیک در فاز غنی از PEG داشته و پارامترهائی نظیر pH سیستم و نسبت حجمی فازی تشکیل دهنده سیستم بر این تفکیک اثر گذار هستند .

مراجع

[1] A. Houde, A. Kademi, and D. Leblanc (2004) “Lipases and their industrial applications” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118, 155-170.

[2] N.G. Edwinoliver, K. Thirunavukarasu, R.B. Naidu, M.K. Gowthaman, T.N. Kambe, and N.R. Kamini (2010) “Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis” *Bioresours Technology* 101, 6791–6796.

[3] P. Ellaiah, T. Prabhakar, B. Ramakrishna, A. Thaer Taleb, and K. Adinarayana (2004) “Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*” *Process Biochemistry* 39, 525–528.

[4] N.D. Mahadik, U.S. Puntambekar, K.B. Bastawde, J.M. Khire, and D.V. Gokhale (2002) “Production of acidic lipase by Aspergillus niger in solid state fermentation” *Process Biochemistry* 38, 715-721.

[5] E. Rigo, J.L. Ninowa, M.D. Luccio, J.V. Oliveira, A.E. Polloni, D. Remonatto, F. Arbter, R. Vardanega, D. de Oliveira, and H. Treichel (2010) “Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements” *LWT - Food Science Technology* 43, 1132-1137.

[6] K. Naganagouda, and V.H. Mulimani (2008) “Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* a-galactosidase” *Process Biochemistry* 43, 1293–1299.

[7] B.Y. Zaslavsky (1995) “Aqueous two-phase partitioning:physical chemistry and bioanalytical applications” pp. 221-290. Marcel Dekker Inc., NY, USA.

[8] G. Khayati, and M. Anvari (2012) “Aqueous two-phase systems composed of different molecular weight of polyethylene glycol and diammonium phosphate for extraction of Bovine Serum Albumin” *Italian Journal of Food Science* 24, 279-283.

[9] G. Khayati (2013) “Optimization of Propionic Acid Extraction by Aqueous Two-Phase System Using Response Surface Methodology” *Chemical Engineering Communications* 200, 667–677.

[10] K.L. Berna, and T. Leman (2013) “Initial purification of catalase from *Phanerochaete chrysosporium* by partitioning in poly(ethylene glycol)/salt aqueous two phase systems” *Separation and Purification Technology* 105, 8–14.

[11] K.E. Nandini, and N.K. Rastogi (2011) “Liquid–Liquid Extraction of Lipase Using Aqueous Two-Phase System” *Food Bioprocess Technol*ogy 4, 295–303.

[12] N.R. Kamini, J.G.S. Mala, and R. Puvanakrishnan (1998) “Lipase production from *Aspergillus niger* by solid state fermentation using gingelly oil cake” *Process Biochemistry* 33, 505–511.

[13] M. Kordel, B. Hofmann, D. Schomburg, and R.D. Schmid (1991) “Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data” *Journal of Bacteriology* 173, 4836-4841.

[14] M.M. Bradford (1972) “A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding” *Anal. Biochem.* 72, 248.

[15] W.O. Chien, T.T. Beng, and L.H. Siew (2009) “Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems” *Process Biochemistry* 44, 1083–1087.

[16] T. Tianwei, and H. Qing (2002) “Purification of glycyrrhizin from Glycyrrhiza uralensis Fisch with ethanol/phosphate aqueous two phase system” *Biotechnology Letters* 24, 1417–1420.

[17] J.G. Huddleston, K.W. Ottomar, D.M. Ngonyani, and A. Lyddiatt (1991) “Influence of system and molecular parameters upon fractionation of intracellular proteins from *Saccharomyces* by aqueous two-phase partition” *Enzyme Microbiology and Technology* 13, 24–32.

[18] J.C. Lee, and L.L. Lee (1981) “Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols” *Journal of Biological Chemistry* 256, 625-631.

[19] B. Ozturk (2001) "Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports" thesis of Department: Biotechnology and Bioengineering.

[20] S.N.D. Tanuja, K.S.M. Srinivas, S. Raghava Rao, and M. K. Gowthaman (1997) "Aqueous two-phase extractionfor downstream processing of amyloglucosidase" *Process Biochemistry* 32, 635-641.

[21] S.P. Giovana, C.S. Carlos, and M.A. Ranulfo (2012) "Extraction of Lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and Its Biochemical Characterization" *Brazilian Archives of biology and Technology* 55, 7-19.

[22] Y. Liu, M.Z. Chen, and X. Xiao (2011) "Advances in Aqueous Two-Phase Systems and Applications in Protein Separation and Purification" *Canadian Journal on Chemical Engineering & Technology* 2, 1-7.

[23] H. Walter, and G. Johansson (1994) "Aqueous two-phase systems, Methods in Enzymology" 2nd ed. Academic Press, London, UK.

[24] H. Hustedt, K.H. Kroner, and M.R. Kula (1985) "Applications of phase partitioning in biotechnology" pp.529-587. In: H. Walter, D. E. Brooks, and D. Fischer(eds.) Partitioning in Aqueous Two Phase Systems. Theory,Methods, Uses, and Applications to Biotechnology. Academic Press, Orlando, FL, USA.

Lipase extraction from *Aspergillus niger fermentation* broth using aqueous two-phase partitioning

Gholam Khayati [1,*] , Sahebe Alizadeh[1]

1. Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Guilan, Rasht, Iran

ABSTRACT

Purification of a desired protein from fermentation broth containing a wide variety of biomolecules is one of the major challenges in the biotechnology industry. The aim of this work was partitioning of lipase using aqueous two phase systems (ATPS). ATPS has proved to be a valuable tool for separating and purifying mixtures of biomolecules. In this study, the various aqueous two phase systems containing poly ethylene glycol 4000, 8000 and potassium oxalate and sodium-potassium tartrate were examined for extraction of lipase from fermentation broth. The results show that, the best operating system was contained the 17.5%(w/w) PEG4000,19.5%(w/w) potassium oxalate , 10.2%(w/w) crude fermentation broth loading and pH=5, resulted in partition coefficient (K_e) of 1.29 ,enzyme activity recovery of 84.93% , purification factor of 17.59 and specific activity of 22.22.

All right reserved.

ARTICLE INFO

Article history:
Received: Dec. 26, 2013
Revised: Dec. 6, 2014
Accepted: Feb. 4, 2015

Key words:
lipase,
extraction,
aqueous two-phase system,
poly ethylene glycol

* Corresponding author
khayati@guilan.ac.ir