فصل ۱

مروری بر جداسازی‌های زیستی

زیست فن‌آوری شاخه‌ای از علم است که به سرعت در حال پیشرفت می‌باشد. فن‌آوری‌های DNA و هیبریدوما[1] محور بحث‌های مطرح شده در مجلات علمی می‌باشند و مباحث مرتبط با شرکت‌های مهندسی ژنتیک نیز در صفحات تجاری آورده می‌شود. با توجه به علاقمندی‌های موجود در این زمینه و توجهات شایان ذکر به این علم، به نظر می‌رسد که آینده‌ی درخشانی در انتظار زیست فن‌آوری باشد.

توجهات بسیار زیاد اخیر در این زمینه، به گونه‌ای است که صنایع قدیمی بر پایه‌ی زیست فناوری در سایه‌ی پیشرفت‌های جدید کمرنگ شده است. از طریق زیست فناوری و با استفاده از ریز جانداران کشت داده شده و سلول‌های حیوانی و گیاهی، محصولاتی ارزشمند برای انسان تولید می‌شود. با توجه به این تعریف، زیست فناوری علمی است به قدمت تاریخ، به طوری که اسنادی مربوط به ۴۲۲۸ سال قبل از میلاد مسیح برای آن موجود می‌باشد. نان، پنیر و ماست محصولاتی قدیمی هستند که بر پایه‌ی زیست فناوری تولید می‌شوند.

امروزه زیست فناوری محدود به زمینه‌هایی می‌شود که در آن‌ها گونه‌های خاصی از مواد شیمیایی تولید می‌شوند. بر مبنای این تعریف محدود، می‌توان گفت که قدمت زیست فناوری در حدود ۱۰۰ سال می‌باشد. در ابتدا افراد فعال در این زمینه، مواد شیمیایی آلی را از طریق تخمیر تولید می‌کردند. به عنوان مثال، استون تولید شده از این طریق به عنوان پایه‌ی صنایع نظامی و دفاعی در جنگ جهانی اول مورد استفاده قرار گرفت. از این محصولات اولیه، فقط اسید سیتریک و اسید گلوتامیک باقی مانده‌اند و سایر مواد اکنون از نفت و یا سایر مواد شیمیایی تولید می‌شوند.

در حدود ۴۰ سال پیش، آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان محصول اصلی زیست فناوری، تولید مواد شیمیایی آلی را تحت‌الشعاع قرار داد. این تغییرات مزایای فراوانی در پی داشت و با تولید آمینواسیدها، آنزیم‌ها و مخمرها، محصولات تکمیل‌تر شدند؛ این تغییرات با تولید سایر پروتئین‌های مفید پزشکی و علف‌کش‌های با پایه‌ی میکروبی بیشتر تقویت شدند. با این وجود آنتی‌بیوتیک‌ها کماکان به عنوان یک مسئله‌ی مهم در مرکز توجهات قرار گرفته‌اند، به طوری که مرزهای دانش زیست فناوری در این زمینه دائماً در حال پیشرفت و گسترش است.

در این فصل در دو قسمت جداگانه، مرور کوتاهی بر این زمینه‌ی در حال رشد خواهد شد. در قسمت ۱ـ۱، خصوصیات کلی فرایندهای جداسازی در زیست فناوری شرح داده خواهد شد. این خصوصیات نمایانگر جداسازی محدوده‌ی وسیعی از مولکول‌هاست که به طرز غیرمعمولی شکننده

1. Hybridoma

می‌باشند. تقطیر، که از مهمترین روش‌های جداسازی متداول و قدیمی به حساب می‌آید، تقریباً در این مبحث کاربردی ندارد؛ در نقطه‌ی مقابل روش‌های آزمایشگاهی نظیر کروماتوگرافی و الکتروفورز از اهمیت خاصی برخوردار هستند.

در بخش ۱ـ۲ سعی خواهد شد که یک دسته‌بندی عمومی و کلی مطرح شود. البته واضح است که این عمومیت دادن پیشنهادی است و باعث عدم تمرکز بر روی فناوری‌های مهم خاصی می‌شود. غلظت‌های بسیار رقیق و میزان تولید نسبتاً کم نیز از ویژگی‌های روش‌های جداسازی زیستی می‌باشد. فصول مختلف این کتاب نیز براساس دسته‌بندی بیان شده در این بخش ارائه شده است.

۱ـ ۱ـ مشخصات جداسازی‌های زیستی

یک مشخصه‌ی عمده و بارز زیست فناوری تنوع بسیار زیاد محصولات تولید شده می‌باشد. به عنوان مثال، یک شرکت پتروشیمی در حدود ۱۰ گونه محصول تولید می‌کند، درحالی‌که یک شرکت تولیدی دارویی بیش از ۲۰۰ نوع محصول تولید می‌کند. ممکن است که تمامی این ۲۰۰ محصول به صورت کاملاً زیستی تولید شده باشند؛ اما در بسیاری از موارد از تبدیلات زیستی تنها به صورت جزیی استفاده شده است.

تنوع این محصولات در جدول ۱-۱-۱ آورده شده است. هر چند که این فهرست ۱۰ سال قدمت دارد، با این وجود از بسیاری از شرکت‌های زیست فن‌آوری موجود، قدیمی‌تر می‌باشد. اگر یک فهرست تازه‌تر و به روز تهیه گردد، محصولاتی نظیر انسولین (که از لحاظ ژنتیکی اصلاح شده است)، هورمون‌های رشد گاوی و انسانی و همچنین انترفرون‌ها[1] نیز به این فهرست افزوده خواهد شد و محتویات این فهرست نیز روز به روز اضافه می‌گردد.

جدول ۱ـ۱ـ۱ـ انواع مولکول‌های تولید شده توسط تخمیر

نوع مولکول	تعداد گونه‌ها
آنتی‌بیوتیک‌ها	۸۵
آمینواسیدها	۱۸
آنزیم‌ها	۱۵
اسیدهای آلی و حلال‌ها	۱۱
ویتامین‌ها، مخمرها، فاکتورهای رشد و نوکلئوتیدها	۶
متفرقه ـ دکسترانها، بیواکسیدان‌های استروئیدی	۸
	۱۴۳

این تنوع محصولات باعث گستردگی طیف وسیعی از روش‌های جداسازی مورد استفاده می‌شود.

1. Interferones

مقایسه‌ی فرایندهای جداسازی مورد استفاده در صنعت تخمیر به همراه طبقه‌بندی‌های جامع و کامل در جدول ۱ـ۱ـ۲ آورده شده است. این جدول نشان می‌دهد که ۸۰٪ از روش‌های جداسازی در فن‌آوری‌های زیستی قابل استفاده می‌باشند. تمامی روش‌های عملیاتی مرسوم شامل حالت‌های پایدار و ناپایدار، تجهیزات پیوسته و ناپیوسته و جریان‌های همسو و غیرهمسو نیز می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. مقیاس این فرایندهای جداسازی، به شکل وسیعی گسترده می‌باشد. در مراحل اولیه، هدف اصلی نشان دادن و اثبات کارایی فرایند پیشنهاد شده می‌باشد تا بتوان اطلاعات مربوط به فرایند را کسب کرد و همچنین مقادیر کمی نیز جهت ارزیابی بازار و مطالعات کلینیکی تولید کرد. این کار در فازهای آزمایشگاهی و نیمه صنعتی انجام می‌شود. در مرحله‌ی بعدی، هدف اصلی تولید در مقیاس‌های بزرگ و صنعتی و معرفی فرایند به صنعت جهت تولیدات تجاری می‌باشد. این فعالیت‌ها در چارچوب مطالعات نیمه صنعتی و اقتصادی انجام می‌پذیرد.

جدول ۱ـ۱ـ۲ـ طیف جداسازی‌های مورد استفاده در بیوتکنولوژی

دسته‌بندی	مورد استفاده برای تمامی مواد شیمیایی متداول	مورد استفاده در جداسازی‌های زیستی
جداسازی فیزیکی	۷	۷
جداسازی‌های کنترل شونده از طریق تعادل	۲۲	۱۸
جداسازی‌های کنترل شونده توسط شدت	۱۳	۱۰
	۴۲	۳۵

در مواجهه با چنین تنوع و گستردگی، چگونه می‌توان امیدوار به موفقیت بود؟

از طریق شناسایی دو خصوصیت مهم این فرایندهای جداسازی که در اکثر آن‌ها نیز مشترک است، می‌توان به جلو پیش رفت و امیدوار به کسب موفقیت بود. اول اینکه معمولاً ما با یک سوسپانسیون رقیق شروع می‌کنیم و سعی می‌کنیم که یک محصول خشک با خلوص زیاد تولید کنیم. جامدات موجود در این سوسپانسیون ممکن است حاوی ریز جانداران صدمه ندیده، قارچ‌ها و باکتری‌های تکه شده، سایر ذرات جامد نامحلول و سوبسترای باقی‌مانده باشند. مایع سوسپانسیون نیز می‌تواند شامل پروتئین‌های حل شده از محیط کشت باقیمانده، مواد واسط مسیرهای متابولیک و سایر محصولات مطلوب باشد. در بیشتر موارد، محصول نهایی مورد نظر ما بلورهای بدون رنگ و بسیار پایدار می‌باشند.

دوم، تغییرات بسیار زیادی که بر روی خوراک‌های رقیق در جهت تولید محصولات خالص انجام می‌شود، نشان می‌دهد که این جداسازی‌ها بسیار پیچیده و گران قیمت می‌باشند. عملیات بازیابی و خالص‌سازی ممکن است بیش از سایر قسمت‌های فرایند نیازمند تجهیزات پیچیده و نیروی انسانی باشد. واحد بازیابی معمولاً نیازمند سرمایه‌گذاری زیادی است و به همین دلیل، هزینه‌های جداسازی قسمت قابل توجهی از قیمت نهایی محصول را شامل می‌شود. بنابراین، فرایندهای بازیابی و خالص‌سازی باید به خوبی

مطالعه و طراحی شوند.

با پاسخ دادن به سؤالات زیر طراحی‌هایمان را می‌توانیم بهبود دهیم:

۱) ارزش محصول چیست؟

۲) کیفیت قابل قبول محصول چیست؟

۳) در هر جریان فرایندی، محصول کجا قرار دارد؟

۴) در هر جریان فرایندی، ناخالصی‌های موجود کجا قرار دارند؟

۵) خواص نامتداول فیزیکی ـ شیمیایی محصولات و ناخالصی‌های عمده کدامند؟

۶) از نظر اقتصادی، جداسازی‌های جایگزین مختلف چگونه هستند؟

با در نظر گرفتن دقیق پرسش‌های فوق، نکاتی حاصل می‌شوند که منجر به فرایندهای بهینه برای بازیابی محصول با کیفیت مناسب خواهند شد که در عین حال، با حداقل تلاش به میزان بالایی از بازیابی دست خواهیم یافت.

۱ـ۲ـ یک فرایند ایده‌آل

تنوع و گستردگی محصولات و جداسازی‌های موجود در فن‌آوری‌های زیستی سبب می‌شود که نتوان به یک شباهت کلی مابین بسیاری از فرایندهای مورد استفاده دست یافت و در بسیاری از موارد استثناهای زیادی نیز وجود دارد. با این وجود، این شباهت‌ها یک روش برای فکر کردن در اختیار ما قرار می‌دهد، همانگونه که «جدول تناوبی» یک رابطه‌ای را بین عناصر برقرار می‌کند.

با توجه به تجربه‌های حاصل شده می‌توان گفت که اغلب جداسازی‌های زیستی دارای چهار مرحله‌ی شبیه به یکدیگر می‌باشند که در پی یکدیگر رخ می‌دهند:

۱) جداسازی مواد نامحلول: فیلتراسیون و سانتریفوژ فرایندهای جداسازی اصلی مورد استفاده در این قسمت می‌باشند. در این مرحله، محصولات با غلظت نسبتاً کم و کیفیت پایین حاصل می‌شوند.

۲) جداسازی محصول: در این مرحله، مواد مختلف که خواصی متفاوت با محصول مطلوب دارند، جدا می‌شوند. افزایش قابل توجهی در غلظت و کیفیت محصول معمولاً اتفاق می‌افتد. جذب سطحی و استخراج با حلال نمونه‌هایی از این دست فرایندها می‌باشند.

۳) خالص‌سازی اولیه: این روش‌های جداسازی به صورت بسیار گزینشی نسبت به محصولات عمل کرده و ناخالصی‌های با خواص فیزیکی و شیمیایی مشابه در مقایسه با محصول را از آن جدا می‌کنند. به عنوان مثال می‌توان از کروماتوگرافی، الکتروفورز و رسوب گیری به عنوان موارد خوبی نام برد.

۴) خالص‌سازی نهایی[1]: استفاده‌ی نهایی محصول معمولاً تعیین‌کننده‌ی آخرین مرحله می‌باشد. در این

1. Polishing

مرحله معمولاً تبلور می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. همچنین اغلب محصولات نیز باید خشک شوند.

پایه‌ی اصلی و ساختار این کتاب بر مبنای این چهار مرحله طراحی شده است.

یکی از راه‌های ارزیابی این چهار مرحله در نظر گرفتن غلظت و کیفیت محصولات تولید شده است. برای نمونه نمایی از فرآورش یک محصول خالص در جدول ۱ـ۲ـ۱ آورده شده است. دقت شود که بیشترین افزایش در غلظت به مرحله‌ی جداسازی محصول مربوط می‌شود؛ اما کیفیت محصولات به شدت در مرحله‌ی خالص‌سازی اولیه افزایش می‌یابد. در برخی فرایندهای اخیر، این توالی متداول ساده‌تر شده و دو مرحله‌ی اول به صورت یک تک مرحله در نظر گرفته می‌شود. به عنوان مثال استخراج از محلول خروجی از تخمیر و تبادل یونی بسترسیال، به ترتیب در فصول ۵ و ۶ توضیح داده شده است.

جدول ۱ـ۲ـ۱ـ نمایی از فرآورش و خصوصیات آنتی‌بیوتیک‌ها*

مرحله	محصول		
	نوع فرایند	غلظت (g/lit)	کیفیت (٪)
واکنش زیستی	تخمیر	۵ ـ ۰/۱	۱/۰ ـ ۰/۱
جداسازی مواد نامحلول	فیلتراسیون	۵ ـ ۱/۰	۲/۰ ـ ۰/۲
جداسازی محصول	استخراج	۵۰ ـ ۵	۱۰ ـ ۱
خالص‌سازی اولیه	کروماتوگرافی	۲۰۰ ـ ۵۰	۸۰ ـ ۵۰
خالص‌سازی نهایی	تبلور	۲۰۰ ـ ۵۰	۱۰۰ ـ ۹۰

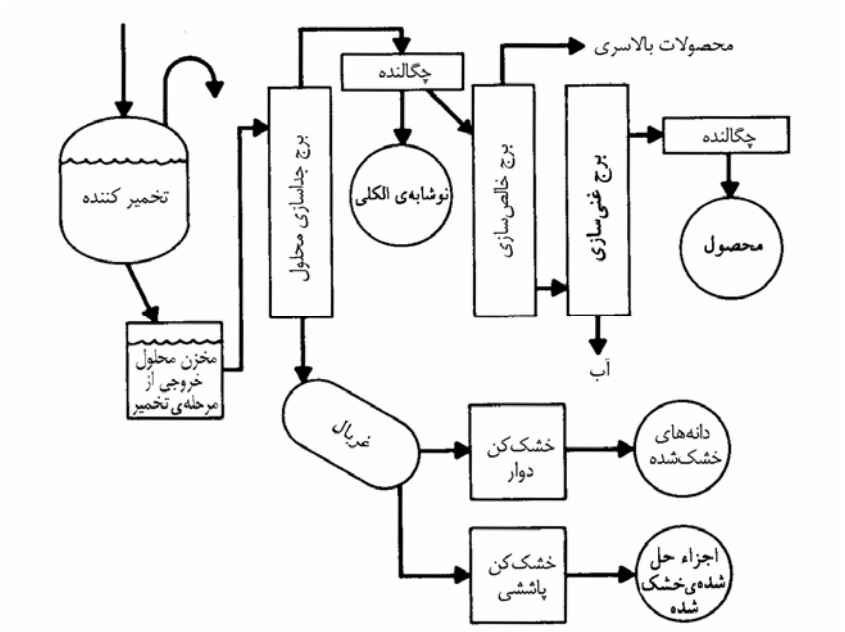
*** غلظت‌ها و کیفیت‌های نشان داده شده به صورت نسبی بیان شده‌اند. کیفیت ممکن است بیانگر خلوص محصولات، فعالیت و یا درجه‌ی تأثیر باشد.**

طرح‌هایی که برای محصولات خارج سلولی[1] بکار می‌روند، برای بازیابی مواد داخل سلولی[2] باید اصلاح شوند. این عمل با بکارگیری یک مرحله جهت آزادسازی محصولات مطلوب از ریزجاندارها تکمیل می‌گردد. این آزادسازی معمولاً پس از جداسازی اولیه مواد نامحلول انجام می‌شود که باعث کاهش حجم می‌گردد. از آنجایی که پس از این آزادسازی، هنوز مخلوطی ناهمگون از مواد محلول و نامحلول وجود دارد، یک مرحله‌ی اضافیِ جداسازی ذرات جامد برای حذف کردن لاشه‌ی سلول که نامحلول نیز می‌باشد، لازم و ضروری است. خروجی مایع که حاوی مواد مطلوب می‌باشد، به عنوان خوراک مرحله‌ی جداسازی محصول بکار رفته و مابقی مراحل فرایند تغییر نمی‌کند.

با در نظر گرفتن نمودارهایی برای چهار فرایند مختلف، می‌توان دریافت که چگونه این فرایند چهار مرحله‌ای در عمل اجرا می‌شود.

1. Extracellular
2. Intracellular

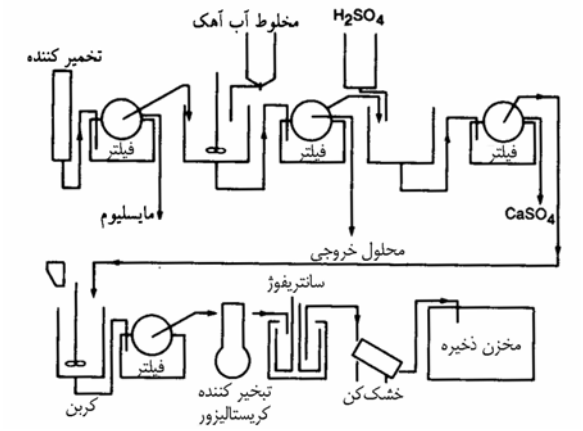
در نموداری که در شکل ۱ـ۲ـ۱ دیده می‌شود، تمامی مراحل به خوبی برای تولید اتانول دیده می‌شود. پس از مرحله‌ی تخمیر، مخمر و جامدات باقیمانده از محیط کشت در «مخزن عصاره»[1] تخلیه می‌شوند که در آنجا اتانول و آب تبخیر می‌شوند. مواد فرارتر در ستون خالص‌سازی جدا می‌شوند. این مرحله نمایانگر قسمت جداسازی محصول می‌باشد. در نهایت مراحل خالص‌سازی اولیه و نهایی از طریق جدا کردن باقیمانده‌ی الکل فرار از بقیه محتویات، آب، در برج غنی‌سازی انجام می‌شود.



شکل ۱ـ۲ـ۱ـ تولید اتانول از طریق تخمیر. در این فرایند، اتانول و آب از محیط تخمیر جدا می‌شوند. در ادامه‌ی این تقطیر اولیه، خالص‌سازی بیشتر انجام می‌شود.

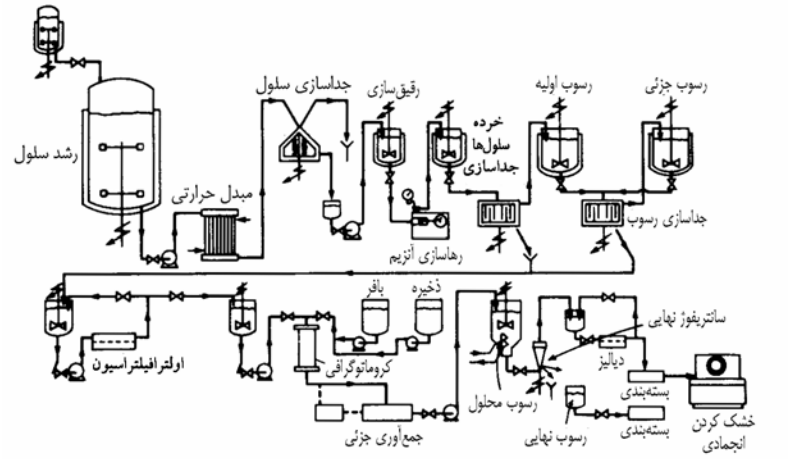
چهار مرحله‌ی مذکور برای واحد اسید سیتریک در شکل ۱ـ۲ـ۲ نشان شده است. پس از تخمیر، اولین مرحله فیلتراسیون است که برای جداسازی ذرات نامحلول انجام می‌شود. با اضافه کردن آهک، نمک کلسیم، اسید سیتریک رسوب می‌کند که بیانگر جداسازی محصول از ناخالصی‌های محلول می‌باشد. سپس سیترات دوباره به اسید تبدیل شده که به منزله‌ی خالص‌سازی آن می‌باشد و در ادامه سولفات کلسیم توسط فیلتراسیون جدا می‌شود. مرحله‌ی خالص‌سازی نهایی نیز توسط تبلور انجام می‌شود.

1. Beer Still



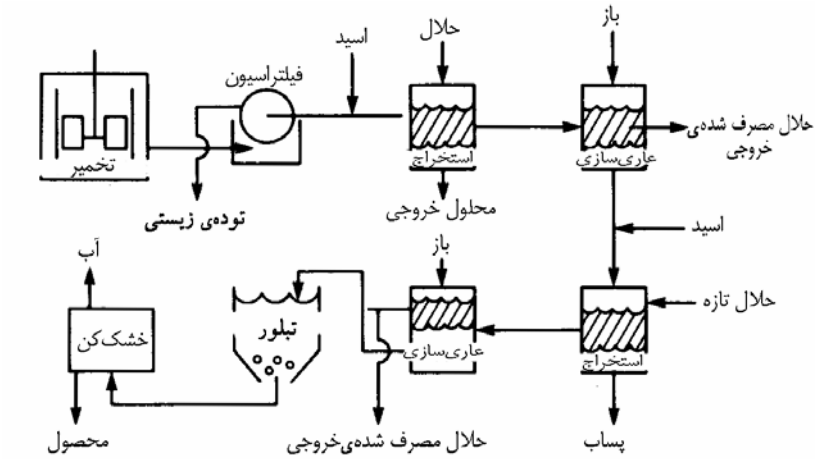
شکل ۱ـ۲ـ۲ـ ساخت اسید سیتریک. پس از تخمیر، اولین مرحله فیلتراسیون است. سپس از طریق تغییرات *pH* محصول جدا شده و خالص‌سازی انجام می‌شود و خالص‌سازی نهایی توسط تبلور انجام می‌شود.

در شکل ۱ـ۲ـ۳ تولید یک آنزیم از باکتری نشان داده شده که یک توالی شبیه به موارد قبل را تداعی می‌کند. با استفاده از سانتریفوژ، غلظت سلول‌ها بالا رفته و از طریق شکستن سلول‌ها با استفاده از هموژن کردن، آنزیم‌ها رها می‌شوند، سپس دیواره و پوسته‌ی سلول‌های تخریب شده توسط فیلتراسیون جدا می‌شود. مراحل جداسازی محصول شامل یک رسوب‌گیری کلی به همراه یک رسوب‌گیری جزیی است. در این مرحله، اغلب پروتئین‌های نامطلوب جدا می‌شوند. خالص‌سازی آنزیم با استفاده از اولترافیلتراسیون و کروماتوگرافی انجام می‌شود. مرحله‌ی خالص‌سازی نهایی نیز شامل رسوب‌گیری، سانتریفوژ و خشک کردن انجمادی می‌باشد.



شکل ۱ـ۲ـ۳ـ تولید آنزیم. در این فرایند، یک آنزیم درون سلولی از طریق هموژن کردن آزاد می‌شود، با استفاده از رسوب‌گیری جدا شده و در نهایت توسط رسوب‌گیری جزیی خالص‌سازی انجام می‌شود. مرحله‌ی خالص‌سازی نهایی توسط کروماتوگرافی انجام می‌شود.

در نهایت، فرایند تولید پنی‌سیلین در شکل ۱ـ۲ـ۴ نشان داده شده است. همانند گذشته، مرحله‌ی اول خارج ساختن مواد نامحلول با استفاده از فیلتراسیون می‌باشد. محلول فیلتر شده اسیدشویی شده و استخراج از آن با استفاده از یک حلال آلی انجام می‌شود. عاری‌سازی محلول استخراج شده، با استفاده از یک بافر و به منظور افزایش غلظت انجام می‌گردد. pH محلول تولید شده با استفاده از اسید تنظیم شده و در طی یک مرحله استخراج دیگر با حلال آلی، مرحله‌ی خالص‌سازی اولیه انجام می‌شود. خالص‌سازی نهایی شامل تبلور و خشک کردن بلورهای پنی‌سیلین می‌باشد. مانند موارد قبل تمام چهار مرحله در این فرایند نیز مشاهده می‌شود.



شکل ۱ـ۲ـ۴ـ تولید پنی‌سیلین. پس از مرحله‌ی تخمیر، توده‌ی زیستی تولید شده توسط فیلتراسیون جدا می‌شود. آنتی بیوتیک که در محلول فیلتر شده وجود دارد، توسط استخراج جدا و خالص می‌شود. در نهایت خالص‌سازی نهایی توسط تبلور انجام شده و محصول خشک می‌شود.

۱ـ۳ـ نتیجه‌گیری

از آنجایی که جداسازی‌های زیستی بسیار گسترده و متنوع می‌باشد، از یک فرایند چهار مرحله‌ای ایده‌آل استفاده کردیم تا بتوان بر مبنای آن ساختار کتاب را شکل داد. در ابتدا با سه فصل درباره جداسازی مواد نامحلول بحث را آغاز می‌کنیم که شامل فیلتراسیون، سانتریفوژ و شکست سلولی می‌باشد. هنگامی که محصول مطلوب یک ماده در درون سلول است، شکست سلولی یک فرایند ضروری است. در ادامه استخراج و جذب سطحی به عنوان روش‌های جداسازی محصولات بیان خواهند شد.

روش‌های خالص‌سازی اولیه همراه با تمامی جزئیات بحث نخواهند شد. در این زمینه، روش‌های جداسازی زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرد، درحالی‌که فقط چهار روش از آن‌ها در این کتاب با جزئیات کامل مورد بحث قرار می‌گیرند: کروماتوگرافی، رسوب‌گیری، اولترافیلتراسیون و الکتروفورز. این فرایندها