

جدایی آلفا آمیلاز و سرم آلبومین گاوی در سیستم‌های دو فاز پلی اتیلن گلیکول و نمک‌های فسفات در آب

حمید مدرس*⁺

تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی شیمی، صندوق پستی ۴۴۱۳-۱۵۸۷۵

علی الیاسی

تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده صنایع شیمیایی

محبوبه ایلی

تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی شیمی، صندوق پستی ۴۴۱۳-۱۵۸۷۵

چکیده: در این تحقیق جدایی آلفا آمیلاز و سرم آلبومین گاوی در سیستم‌های دو فاز آبی بررسی شده است. سیستم‌های دو فاز آبی مورد مطالعه عبارت‌اند از مخلوط‌های پلی اتیلن گلیکول (PEG) و نمک‌های فسفات در آب. با تجزیه این سیستم‌ها، منحنی‌های جدایی فازی تعیین و ترسیم شده و اثر تغییر جرم مولکولی و غلظت PEG، نمک‌های فسفات، pH و افزایش سدیم کلرید بر ضریب تقسیم آلفا آمیلاز و سرم آلبومین گاوی مورد مطالعه قرار گرفته است. نتیجه‌ها نشان می‌دهند که با افزایش جرم مولکولی پلی اتیلن گلیکول از ۲۰۰۰ به ۱۵۰۰۰ تمایل مهاجرت آلفا آمیلاز به فاز بالایی که غنی از PEG است و در اصطلاح فاز سبک نامیده می‌شود به حدود ۲ برابر می‌رسد. و نیز با بالا بردن نسبت فسفات به PEG و افزودن سدیم کلرید، ضریب تقسیم بزرگ‌تر می‌شود. به طوری که برای سیستم PEG ۱۵۰۰۰ و NaH_2PO_4 وقتی که نسبت فسفات به PEG از ۰/۴۸ به ۳/۷۳ افزایش یابد ضریب تقسیم آلفا آمیلاز از ۰/۷۶ به ۱/۴۴ افزایش پیدا می‌کند. همچنین با افزودن نمک سدیم کلرید به مخلوط در حدی که غلظت NaCl به ۰/۲۵ مول بر لیتر برسد، ضریب تقسیم آلفا آمیلاز برای سیستم حاوی PEG ۲۰۰۰ + NaH_2PO_4 تا ۶ برابر افزایش می‌یابد. اما تاثیر pH بر نحوه توزیع آلفا آمیلاز به نوع سیستم بستگی دارد. همچنین نتیجه‌ها نمایانگر آن هستند که کاهش جرم مولکولی PEG و افزایش نسبت فسفات به PEG باعث افزایش ضریب تقسیم سرم آلبومین گاوی می‌شود. به نحوی که با کاهش جرم مولکولی PEG از ۱۵۰۰۰ به ۲۰۰۰، بسته به درصد وزنی نمک فسفات، ضریب جدایی تا ۳ برابر افزایش پیدا می‌کند. افزودن نمک سدیم کلرید به سیستم حاوی سرم آلبومین گاوی، با توجه به پارامترهای متفاوت سیستم باعث افزایش یا کاهش ضریب تقسیم خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: جدایی، سیستم‌های دو فاز آبی، آلفا آمیلاز، سرم آلبومین گاوی، ضریب تقسیم، محلول‌های آبی پلیمری.

KEY WORDS: Partitioning, Aqueous two phase systems, α - Amylase, Bovin serum albumin, Partition coefficient, Aqueous polyethylene glycol solutions.

*E-mail: hmodares@aut.ac.ir

*عده دار مکاتبات

مقدمه

سیستم‌های دو فاز آبی از مناسب‌ترین سیستم‌ها برای جداسازی مواد بیولوژیک هستند. استفاده از چنین سیستم‌هایی برای جداسازی، نخستین بار توسط آلبرتنسن ابداع شد [۱] و بعدها تحقیقات زیادی توسط محققین دیگری نظیر فیشر [۲]، کولا [۳]، کینگ [۴]، هاینر [۵]، یوهانسون [۶] در این مورد انجام شده است.

سیستم‌های دو فاز آبی را می‌توان از اختلاط دو پلیمر مانند پلی اتیلن گلیکول (PEG) و دکستران (DX) که از لحاظ ساختار مولکولی با یکدیگر متفاوت هستند به دست آورد. همچنین می‌توان از یک پلیمر مانند PEG و یک نمک مانند سدیم فسفات برای ایجاد سیستم‌های دو فاز آبی استفاده کرد. از آنجا که چنین سیستم‌هایی اثرهای مخرب بر مواد بیولوژیک ندارند، در نتیجه وسیله‌ی خوبی برای جدایی و خالص سازی آنها هستند [۳]. دیگر مزایای استفاده از این سیستم‌ها عبارت‌اند از:

- ۱- جدایی می‌تواند به‌طور انتخابی صورت گیرد.
- ۲- انتقال جرم سریع بین دو فاز و سرعت رسیدن سیستم به تعادل.
- ۳- امکان انجام عملیات جدایی در دمای معمولی در نتیجه استفاده از تجهیزات ارزان قیمت.
- ۴- سازگاری محیط آبی برای سلول‌ها و پروتئین‌ها [۷].
- ۵- سهولت استفاده از نتیجه‌های آزمایشگاهی در صنعت با افزایش مقیاس خطی تا حدود $10^4 \times 2$ [۴].
- ۶- با صرفه بودن روش از نظر اقتصادی [۸].

هر چند که آلبرتنسن [۱] برای ایجاد سیستم‌های دو فاز آبی به‌طور عمده از پلیمرهای PEG و DX استفاده کرد، اما به دلیل گران بودن DX کاربرد آن در مقیاس صنعتی به صرفه نبوده و لذا مخلوط PEG و نمک استفاده بیشتری داشته که ضمن کاهش قیمت مواد اولیه، به علت ناروانی کمتر و نیز تفاوت چگالی بیشتر بین دو فاز، زمان لازم برای جداسازی کاهش می‌یابد.

در بین سیستم‌های آبی پلیمر + نمک، سیستم (آب + PEG + نمک فسفات) به دلیل مناسب بودن قدرت یونی، برای استخراج مواد بیولوژیک بیشتر از بقیه مورد توجه قرار گرفته است [۹]. بدیهی است که روش‌های استخراج به‌وسیله‌ی سیستم‌های دو

فازی آبی، نیاز به دانستن رفتار فازی و خواص مخلوط‌های مورد استفاده دارد. هدف از این تحقیق بررسی تعادل‌های مایع - مایع سیستم‌های دو فاز آبی شامل PEG و نمک‌های فسفات و نیز جدایی α - آمیلاز و سرم آلبومین گاوی در این سیستم‌هاست که با تغییر جرم مولکولی و غلظت پلیمر و نمک‌های فسفات، نسبت حجمی دو فاز در حال تعادل، pH مخلوط و افزودن سدیم کلرید به مخلوط، تغییرات ضریب جدایی مواد مورد اشاره بررسی شده است.

در کار حاضر برای بررسی رفتار پروتئین‌ها در مجاورت PEG و الکترولیت‌ها از آلفا آمیلاز و سرم آلبومین گاوی (BSA) استفاده شده است. آلفا آمیلاز مانند کلیه آنزیم‌ها یک زنجیره پلی‌پپتیدی دارد و مثل یک پلیمر خطی بزرگ عمل می‌کند. این ماده در صنعت و پزشکی کاربرد فراوان دارد. برای مثال، در صنایع تهیه دکستروز از نشاسته، نوشابه‌سازی، قند، پخت نان و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

سرم آلبومین گاوی شباهت زیادی به سرم آلبومین موجود در بدن انسان دارد و به دلیل فراوانی و قیمت به نسبت کم، ماده‌ای مناسب برای انجام کارهای تحقیقاتی در بیوشیمی و بیوتکنولوژی است. این ماده پروتئینی کروی به طول ۱۵ سانتی‌متر و عرض $3/8$ نانومتر با وزن مولکولی 65000 دالتون است که به راحتی تغییر ماهیت نمی‌دهد (تا 60 درجه سانتی‌گراد مقاوم است).

باید توجه داشت که علیرغم انجام تحقیقات بسیار گسترده در زمینه جدایی، هنوز مکانیسم جدایی مواد بیولوژیک در سیستم‌های آبی دو فاز به‌طور کامل شناخته شده نیست و برای بسیاری از سیستم‌ها تاثیر عامل‌هایی از قبیل نوع پلیمر و نمک، جرم مولکولی پلیمر و غلظت آن، pH سیستم، غلظت نمک و دما بر ضریب تقسیم ماده بیولوژیک بین دو فاز آبی معلوم نبوده و زمینه مناسبی برای انجام تحقیقات تکمیلی وجود دارد که در این مقاله تلاش می‌شود به برخی از نکات بالا پاسخ داده شود.

بخش تجربی

مواد شیمیایی

نیز از شرکت مرک آلمان سرم آلبومین گاوی (Bovin Serum یا Albumine یا BSA) از شرکت SIGMA و هیدرازینیم سولفات از شرکت BDH انگلستان تهیه شدند.

K_2HPO_4 و NaH_2PO_4 ، $Na_2PO_4 \cdot 12H_2O$ ، PEG ۱۵۰۰۰ محلول ۰/۱ نرمال تیترازول ید، باریم کلرید، سدیم مولیدات و سولفوریک اسید ۱۰N از شرکت مرک آلمان و PEG ۲۰۰۰ از Riedel-Dehaen، α -Amilaz حاصل از منبع Aus Bacillus Subtilis

جدول ۱- غلظت (گرم بر لیتر) تعادلی اجزاء در سیستم $PEG 15000 + Na_2PO_4 + H_2O$ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد.

سیستم	کل سیستم		فاز بالا		فاز پایین	
	Na_2PO_4	PEG ۱۵۰۰۰	Na_2PO_4	PEG ۱۵۰۰۰	Na_2PO_4	PEG ۱۵۰۰۰
۱	۱۱/۶	۵/۳۷	۴/۹۰	۱۷/۳۱	۱۲/۶۴	۱/۷۰
۲	۹/۸۰	۸/۶۰	۵/۵۱	۱۵/۵۹	۱۱/۸۸	۲/۷۴
۳	۸/۱۰	۱۱/۳۲	۶/۰۱	۱۴/۲۵	۱۱/۲۵	۳/۷۲

جدول ۲- غلظت (گرم بر لیتر) تعادلی اجزاء در سیستم $PEG 15000 + NaH_2PO_4 + H_2O$ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد.

سیستم	کل سیستم		فاز بالا		فاز پایین	
	NaH_2PO_4	PEG ۱۵۰۰۰	NaH_2PO_4	PEG ۱۵۰۰۰	NaH_2PO_4	PEG ۱۵۰۰۰
۴	۱۷/۴۴	۴/۶۷	۴/۴۹	۲۶/۹۰	۱۶/۰۲	۲/۰۳
۵	۱۲/۵۰	۱۲/۱۱	۵/۰۲	۲۳/۸۱	۱۴/۵۹	۳/۶۲
۶	۸/۸۰	۱۸/۳۵	۶/۲۶	۲۰/۳۰	۱۳/۳۸	۵/۲۵

جدول ۳- غلظت (گرم بر لیتر) تعادلی اجزاء در سیستم $PEG 2000 + Na_2PO_4 + H_2O$ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد.

سیستم	کل سیستم		فاز بالا		فاز پایین	
	Na_2PO_4	PEG ۲۰۰۰	Na_2PO_4	PEG ۲۰۰۰	Na_2PO_4	PEG ۲۰۰۰
۷	۱۴/۲۰	۹/۹۰	۷/۸۹	۱۷/۸۷	۱۷/۰۱	۲/۹۶
۸	۱۲/۸۰	۱۱/۳۱	۸/۸۷	۱۵/۶۰	۱۶/۲۷	۳/۴۹
۹	۱۱/۱۰	۱۳/۵۰	۹/۴۹	۱۴/۳۲	۱۵/۵۴	۴/۵۷

جدول ۴- غلظت (گرم بر لیتر) تعادلی اجزاء در سیستم $PEG 2000 + NaH_2PO_4 + H_2O$ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد.

سیستم	کل سیستم		فاز بالا		فاز پایین	
	NaH_2PO_4	PEG ۲۰۰۰	NaH_2PO_4	PEG ۲۰۰۰	NaH_2PO_4	PEG ۲۰۰۰
۱۰	۱۷/۸۰	۷/۴۵	۴/۷۵	۲۸/۶۸	۱۸/۶۳	۰/۳۵
۱۱	۱۳/۷۰	۱۴/۲۷	۵/۳۰	۲۶/۷۴	۱۷/۵۵	۱/۵۷
۱۲	۱۰/۱۰	۲۰/۴۶	۵/۷۵	۲۵/۲۲	۱۶/۸۳	۲/۴۸

روش انجام آزمایش

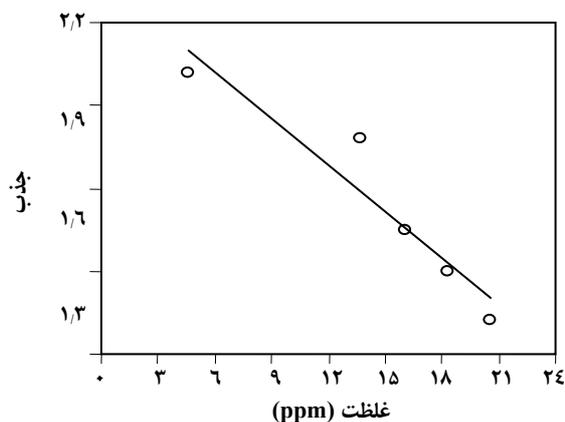
دستگاهها

محلول‌هایی از PEG در آب با غلظت‌های مشخص به روش وزن سنجی تهیه و به هر یک از این محلول‌ها، محلول غلیظ از نمک‌های فسفات اضافه شد (جدول‌های ۱ تا ۴) و این اضافه کردن تا کدر شدن محلول در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد ادامه یافت.

در این تحقیق برای اندازه‌گیری‌ها از طیف سنج UV-VIS مدل Camspec M۳۵۰، رفراکتومتر مدل A-Kruss ۹۰۱۲۶۴ و ترازوی Mettler H۳۱ با دقت ± 0.1 میلی گرم استفاده شد.

استفاده از تیتراژ کردن [۱۰] و طیف سنج نوری UV اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری غلظت نمک فسفات با طیف سنج UV نیاز به آماده‌سازی نمونه‌ها دارد. برای این کار ابتدا ۶/۲۵ گرم سدیم مولیبدات را با اضافه کردن تدریجی سولفوریک اسید ۵ مولار حل کرده تا حجم محلول به ۲۵۰ میلی‌لیتر برسد. سپس ۰/۷۵ گرم استاندارد جذب UV فسفات رسم شد (شکل ۱) و با استفاده از آن غلظت نمک فسفات در نمونه‌های مجهول تعیین شد.

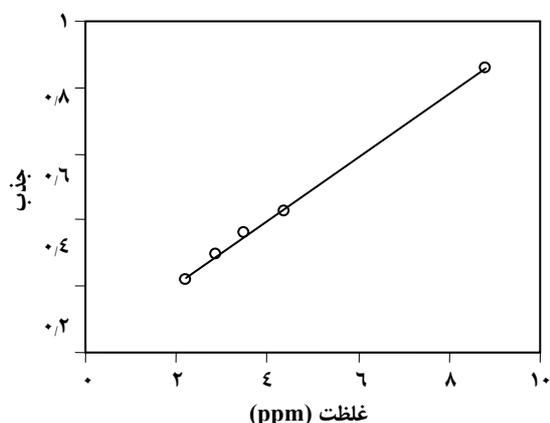
برای اندازه‌گیری غلظت PEG در فاز بالا یا سبک (غنی از پلیمر) از روش رفرکتومتری استفاده شد [۱۱] اما برای تعیین غلظت PEG در فاز پایین یا سنگین، به علت کم بودن غلظت آن از روش تشکیل کمپلکس که قادر است غلظت‌های کمتر از ۰/۵ درصد وزنی را نیز تعیین کند، استفاده شد [۱۲]. در این روش به محلول حاوی PEG که غلظت آن کمتر از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است، ۱ میلی‌لیتر محلول باریم کلرید ۵ w/w درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر



شکل ۲- منحنی استاندارد تعیین غلظت PEG برحسب جذب (A) در مقابل غلظت PEG (C) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. ○ معرف داده تجربی است.

محلول دیدید اضافه می‌شود. پس از ۱۵ دقیقه که واکنش کامل شد، محلول‌ها را صاف کرده و جذب خوانده می‌شود. واکنش PEG با باریم کلرید و پتاسیم یدید در دو مرحله رخ می‌دهد. در مرحله نخست کمپلکس محلول اکسونیم بین یون‌های باریم و PEG تشکیل می‌شود. این کمپلکس با افزودن محلول $[I_3^- - I^+]$ کمپلکس از محلول خارج می‌شوند. پس از جداسازی رسوب با

سپس با استفاده از سانتریفوژ معمولی آزمایشگاهی با حداکثر دور ۴۸۰۰ rpm مخلوط به دو فاز تفکیک و برای اطمینان از تفکیک کامل، ۲۴ ساعت در حالت ساکن نگه داشته شد تا دو فاز به‌طور کامل شفاف به‌دست آید. از فازهای سبک (بالا) و سنگین (پایین) به‌وسیله سرنگ نمونه‌برداری شد و غلظت نمک فسفات با



شکل ۱- منحنی استاندارد تعیین غلظت فسفات، بر حسب جذب (A) در مقابل غلظت Na_2PO_4 (C) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. ○ معرف داده تجربی است.

هیدرازینیم سولفات در آب مقطر حل و به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۱/۱۰۹۹ گرم KH_2PO_4 با خلوص آنالیتیک در آب مقطر حل و به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. با رقیق کردن محلول KH_2PO_4 به میزان‌های متفاوت، محلول‌های استاندارد پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات تهیه شد. محلول‌های استاندارد ضمن خنثی بودن نباید بیش از ۰/۱ میلی‌گرم فسفر به صورت اورتوفسفات در هر ۲۵ میلی‌لیتر داشته باشند. ۲۵ میلی‌لیتر از هر محلول به یک بالن حجم سنجی ۵۰ میلی‌لیتر منتقل و به آن ۵ میلی‌لیتر محلول مولیبدات ۲ میلی‌لیتر محلول هیدرازینیم سولفات اضافه و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و به‌طور کامل مخلوط شد. بالن به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و پس از خارج کردن به سرعت در ظرف محتوی آب و یخ خنک شد. سپس به‌وسیله طیف سنج UV-Vis جذب محلول (A) در طول موج ۸۳۰ نانومتر در مقابل نمونه شاهد (آب مقطر) اندازه‌گیری شد. با استفاده از این محلول‌های استاندارد، منحنی

است. ضریب خاموشی پروتئین‌های خالص در ۲۸۰ نانومتر بوده و به‌عنوان یک نشان ویژه و مشخص می‌تواند برای تعیین مقدار کمی پروتئین مورد استفاده قرار گیرد. با این وجود، ضریب خاموشی در ۲۸۰ نانومتر از حدود تقریبی ۰/۵ تا ۱/۵ برای محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین تغییر می‌کند. این مساله تعیین غلظت یک پروتئین ویژه در مخلوطی از پروتئین‌ها را دچار مشکل می‌کند.

به‌طور عمومی مقدار میانگین ضریب خاموشی ۱/۰ برای محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تعیین غلظت پروتئین‌های

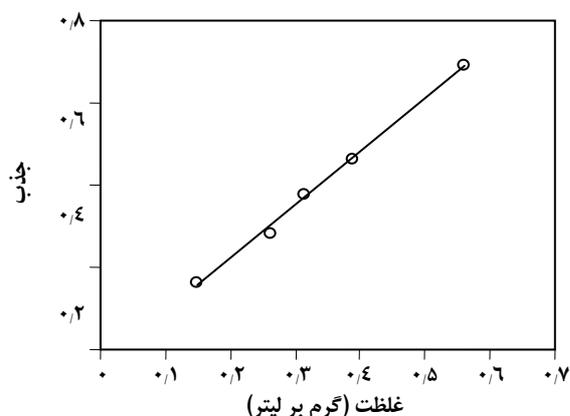
غلظت آنزیم در دو فاز سبک و سنگین اندازه‌گیری و ضریب تقسیم فازی از رابطه‌ی زیر محاسبه شد:

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (1)$$

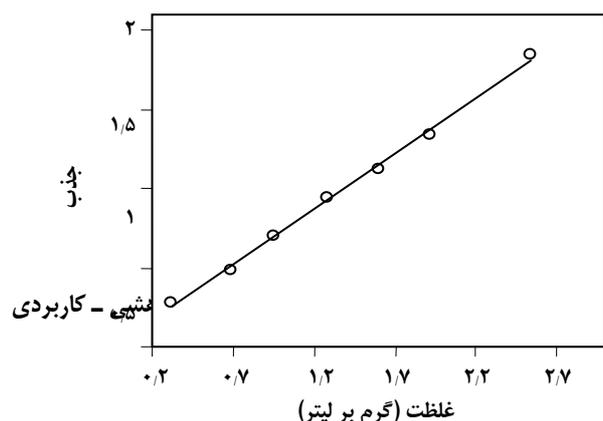
در این رابطه C_T غلظت آنزیم در حالت تعادل در فاز بالا و C_B غلظت آن در فاز پایین و K ضریب تقسیم است. در جدول ۶ ضریب تقسیم آلفا آمیلاز در سیستم‌های:



در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آورده شده است.



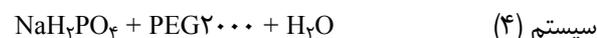
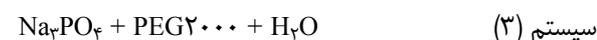
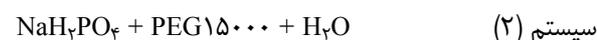
شکل ۳- منحنی استاندارد تعیین غلظت آلفا آمیلاز برحسب جذب در مقابل غلظت آلفا آمیلاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. \circ معرف داده تجربی است.



اندازه‌گیری جذب UV محلول در طول موج حداکثر جذب UV (۵۳۵ نانومتر) غلظت ی‌دید آزاد اندازه‌گیری می‌شود و با رسم منحنی استاندارد (شکل ۲) به همین شیوه غلظت PEG نیز تعیین می‌شود. برای تعیین غلظت پروتئین از روش جذب UV در ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. اسیدهای آمینه آروماتیک موجود در اغلب پروتئین‌ها نور را در ناحیه ۲۵۰ تا ۳۰۰ نانومتر جذب می‌کنند. طیف UV بیشتر پروتئین‌ها جذب پهنی را به طور معمول اطراف مرکز ۲۷۵ تا ۲۸۵ نانومتر نشان می‌دهند و اندازه‌گیری با طیف‌سنج UV در ۲۸۰ نانومتر اغلب روش مورد استفاده برای تعیین غلظت پروتئین‌ها مخلوط به کار برده می‌شود که در عمل دقت مناسبی را نشان می‌دهد، افزون بر این مهم‌ترین حسن این روش سهولت و سرعت در اندازه‌گیری غلظت پروتئین است. منحنی‌های استاندارد تعیین غلظت آلفا آمیلاز و BSA به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ آورده شده است.

نتیجه‌ها و بحث

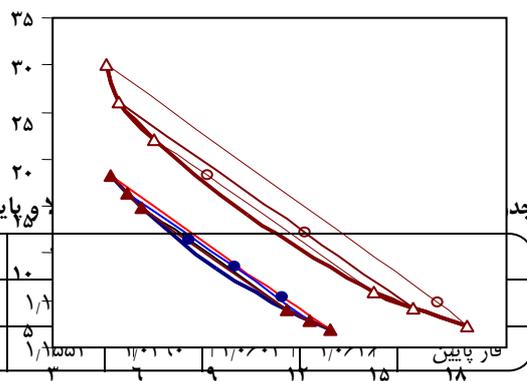
در جدول‌های ۱ تا ۴ غلظت تعادلی اجزاء در سیستم‌های مورد آزمایش یعنی:



گزارش شده است. برای به‌دست آوردن نمودار جدایی فازی سیستم‌های ذکر شده، ابتدا چگالی فازهای بالا و پایین به روش پیکنومتری تعیین شد که نتیجه‌ها در جدول ۵ آورده شده است. سپس غلظت‌های تعادلی برحسب درصد وزنی تعیین شد که شکل‌های ۵ تا ۶ این نتیجه‌ها را نشان می‌دهند.

برای بررسی ضریب جدایی آلفا آمیلاز در سیستم‌های دو فازی آبی به سیستم‌های مورد بررسی، آلفا آمیلاز اضافه شد تا غلظت آن به ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسید. در این کار فقط از نمک NaH_2PO_4 استفاده شد زیرا نمک‌های دیگر مانند Na_3PO_4 به علت ایجاد pH بالا (حدود ۱۲) باعث تغییر ساختار آلفا آمیلاز و تخریب آن می‌شود. اما در مورد BSA چنین محدودیتی وجود ندارد، بنابراین از نمک‌های Na_3PO_4 ، NaH_2PO_4 و K_2HPO_4 استفاده شد. غلظت BSA در این سیستم‌ها ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. پس از افزودن آلفا آمیلاز یا BSA به سیستم‌های دو فازی، مخلوط هم‌زده شده و ۲۴ تا ۴۸ ساعت به آن زمان داده شد تا دو فاز به‌طور کامل از هم جدا شده و آنزیم در هر دو فاز توزیع شود.

شکل ۴- منحنی استاندارد تعیین غلظت BSA، بر حسب جذب در مقابل غلظت BSA در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد. ○ معرف داده تجربی است.



شکل ۵ - نمودارهای تعادلی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بر حسب درصد وزنی PEG (w_1) در مقابل درصد وزنی Na_2PO_4 (w_2). برای سیستم $Na_2PO_4 + PEG 15000 + H_2O$ ▲ غلظت‌های تعادلی و ● غلظت کل مخلوط می‌باشد. برای سیستم $NaH_2PO_4 + PEG 15000 + H_2O$ △ غلظت تعادلی و ○ غلظت کل سیستم می‌باشند.

جدول ۱- ویرایش در سیستم‌های ۱ تا ۱۲ (مربوط به جدول‌های ۱ تا ۴) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد.

۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۱۰
۱/۰۹۲۰	۱/۰۹۷۶	۱/۱۰۱۹	۱/۰۵۶۸	۱/۰۵۹۱	۱/۰۶۳۷	۱/۰۸۸۷	۱/۰۹۵۵	۱/۱۰۰۰
۱/۱۳۴۵	۱/۱۴۸۳	۱/۱۵۷۳	۱/۰۶۱۹	۱/۰۷۵۶	۱/۰۸۷۵	۱/۱۲۳۸	۱/۱۳۲۵	۱/۱۴۱۰

جدول ۶- ضریب‌های تقسیم (K) آلفا آمیلاز در سیستم‌های $PEG 15000 + NaH_2PO_4 + H_2O$ و $PEG 20000 + NaH_2PO_4 + H_2O$ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد. w_1 و w_2 به ترتیب درصد‌های وزنی پلیمر و نمک فسفات در سیستم هستند. C_B و C_T به ترتیب غلظت آلفا آمیلاز در فاز بالا و فاز پایین بر حسب گرم بر لیتر است.

w_1	w_2	C_T	C_B	K
PEG 15000	NaH_2PO_4			
۴/۶۷	۱۷/۴۴	۰/۲۳	۰/۱۶	۱/۴۴
۱۲/۱۱	۱۲/۵۰	۰/۲۰	۰/۱۹	۱/۰۵
۱۸/۳۵	۸/۸۰	۰/۲۵	۰/۳۳	۰/۷۶
PEG 20000	NaH_2PO_4			
۷/۴۵	۱۷/۸۰	۰/۳۰	۰/۶۰	۰/۵۰
۱۴/۲۷	۱۳/۷۰	۰/۱۸	۰/۴۱	۰/۴۵
۲۰/۴۶	۱۰/۱۰	۰/۱۲	۰/۳۰	۰/۴۱

جدول ۷- ضریب‌های تقسیم (K) آلفا آمیلاز در مجاورت نمک سدیم کلرید در سیستم‌های $PEG 15000 + NaH_2PO_4 + H_2O$ و $PEG 20000 + NaH_2PO_4 + H_2O$ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد. w_1 و w_2 به ترتیب درصد‌های وزنی پلیمر و نمک فسفات در سیستم هستند. C_B و C_T به ترتیب غلظت آلفا آمیلاز در فاز بالا و فاز پایین بر حسب گرم بر لیتر است.

w_1	w_2	C_T	C_B	K
PEG 15000	NaH_2PO_4			
۴/۶۷	۱۷/۴۴	۰/۴۸	۰/۷۶	۶/۳۰
۱۲/۱۱	۱۲/۵۰	۰/۳۶	۰/۱۱	۳/۲۰

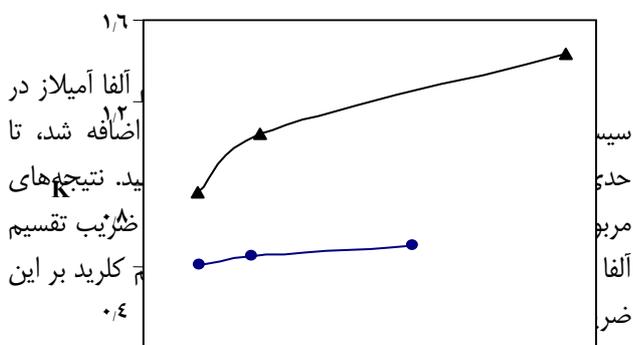
۱۸,۳۵	۸,۸۰	۰,۳۶	۰,۲۰	۱,۷۷
PEG۲۰۰۰	NaH ₂ PO ₄			
۷,۴۵	۱۷,۸۰	۰,۰۸	۰,۰۸	۳,۱۰
۱۴,۲۷	۱۳,۷۰	۰,۲۸	۰,۱۸	۱,۵۶
۲۰,۴۶	۱۰,۱۰	۰,۲۳	۰,۱۹	۱,۱۷

جدول ۸ - اثر pH بر ضریب تقسیم (K) آلفا آمیلاز در سیستم $PEG_{2000} + (K_2HPO_4 \text{ و } NaH_2PO_4) + H_2O$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. w_1 درصد وزنی و w_2 درصد وزنی نمک فسفات و C_T و C_B به ترتیب غلظت آلفا آمیلاز در فاز بالا و فاز پایین بر حسب (گرم بر لیتر) هستند.

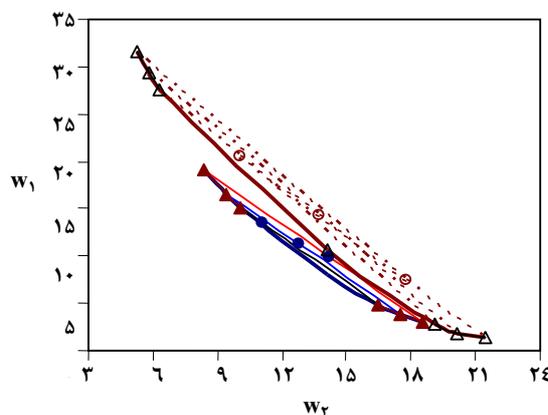
		pH=۴/۷۵			pH=۵/۷۵			pH=۶/۸		
w_1	w_2	C_T	C_B	K	C_T	C_B	K	C_T	C_B	K
۲۰	۱۰	۰,۲۸۶	۰,۵۸۳	۰,۵۶۳	۰,۶۱۰	۰,۶۰۴	۱,۰۱۳	۰,۳۳۶	۰,۴۳۳	۰,۷۸۰
۲۵	۱۰	۰,۱۰۰	۰,۵۷۸	۰,۵۲۱	۰,۴۰۲	۰,۶۱۳	۰,۷۸۰	۰,۳۱۳	۰,۴۷۱	۰,۶۳۰
۳۰	۱۰	۰,۳۳۲	۰,۵۹۰	۰,۴۹۰	۰,۳۳۲	۰,۶۱۹	۰,۵۴۰	۰,۳۲۰	۰,۷۸۴	۰,۵۰۰

جدول ۹ - اثر pH بر ضریب تقسیم (K) آلفا آمیلاز در سیستم $PEG_{1500} + (K_2HPO_4 \text{ و } NaH_2PO_4) + H_2O$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. w_1 درصد وزنی و w_2 درصد وزنی نمک فسفات و C_T و C_B به ترتیب غلظت آلفا آمیلاز در فاز بالا و فاز پایین بر حسب گرم بر لیتر هستند.

		pH=۴/۷۵			pH=۵/۷۵			pH=۶/۸		
w_1	w_2	C_T	C_B	K	C_T	C_B	K	C_T	C_B	K
۱۶	۱۰	۰,۱۴۸	۰,۱۰۹	۱,۳۵۶	۰,۳۷۴	۰,۴۲۰	۰,۹۹۱	۰,۲۹۴	۰,۳۷۰	۰,۹۶۰
۲۰	۱۰	۰,۱۵۹	۰,۱۳۸	۱,۱۵۰	۰,۳۲۰	۰,۵۱۰	۰,۷۲۰	۰,۳۳۲	۰,۵۰۰	۰,۶۶۳
۲۴	۱۰	۰,۱۸۶	۰,۱۵۲	۰,۸۸۶	۰,۲۷۴	۵۲۰	۰,۵۸۰	۰,۳۰۱	۰,۵۴۶	۰,۵۵۲



در آزمایش‌های دیگر برای بررسی اثر pH بر ضریب تقسیم آلفا آمیلاز، مطابق روش قبل مخلوط‌هایی از آلفا آمیلاز با غلظت ۰,۲۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و در pH های متفاوت ضریب تقسیم تعیین شد که نتیجه‌های آنها در جدول‌های ۸ و ۹ آورده شده است. برای رسیدن به pH ۶/۸ - ۴/۷ از نسبت‌های متفاوت نمک‌های تک بنیانی NaH_2PO_4 و دو بنیانی K_2HPO_4 استفاده شد [۱۳]. برای این کار ضمن آن که درصد وزنی نمک فسفات (مخلوط NaH_2PO_4 و K_2HPO_4) در ۱۰ درصد ثابت نگه داشته شد،



شکل ۶ - نمودارهای تعادلی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر حسب درصد وزنی PEG (w_1) در مقابل درصد وزنی Na_2PO_4 (w_2). برای سیستم $Na_2PO_4 + PEG_{2000} + H_2O$ غلظت‌های تعادلی و ● غلظت کل مخلوط می‌باشد. برای سیستم $NaH_2PO_4 + PEG_{2000} + H_2O$ غلظت تعادلی و ○ غلظت کل سیستم هستند.

نسبت دو نمک نیز تغییر داده شد.

مشابه آزمایش‌های ذکر شده برای اندازه گیری ضریب تقسیم BSA بین دو فاز آبی انجام گرفت. ضریب‌های تقسیم BSA در چهار سیستم متفاوت در جدول ۱۰ آورده شده است. برای بررسی اثر نمک NaCl بر سیستم‌های ذکر شده، سدیم کلرید به مقداری اضافه شد که غلظت آن در سیستم به ۰/۲۵ مولار رسید.

نتیجه‌های به دست آمده برای ضریب تقسیم BSA در این سیستم‌ها در جدول ۱۱ آورده شده است. قابل ذکر است که کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار شد و میانگین انحراف استاندارد در آزمایش‌ها ۴/۸ درصد بود.

منحنی جدایی فاز که منطقه دو فاز را از یک فاز تفکیک می‌کند در شکل‌های ۵ و ۶ آورده شده است. این شکل‌ها نشان می‌دهند که افزایش جرم مولکولی پلیمر و نیز افزایش بار آنیون سبب جابه‌جایی نمودارهای فاز به غلظت‌های کمتر از نمک و

شکل ۷- ضریب تقسیم آلفا آمیلاز (K) در سیستم $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{PEG}$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقابل درصد وزنی NaH_2PO_4 (w_1) به درصد وزنی PEG (w_2) مربوط به w_1 با جرم مولکولی ۲۰۰۰ و w_2 مربوط به PEG با جرم مولکولی ۱۵۰۰۰ هستند.

جدول ۱۰- ضریب‌های تقسیم (K) برای BSA در سیستم‌های متفاوت آب + نمک فسفات + PEG در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. w_1 و w_2 به ترتیب درصد‌های وزنی PEG و نمک فسفات در C_T و C_B به ترتیب درصد‌های وزنی BSA در فاز بالا و فاز پایین بر حسب گرم بر لیتر هستند.

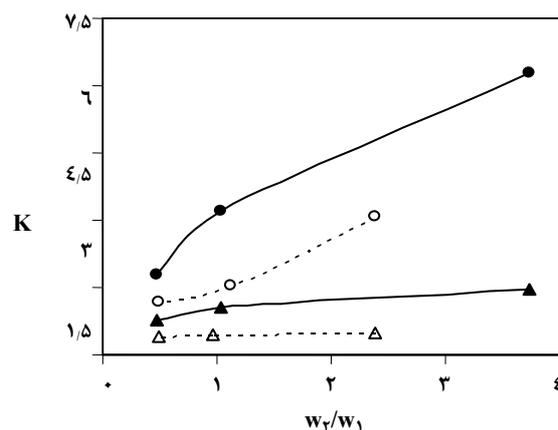
w_1	w_2	C_T	C_B	K
PEG ۱۵۰۰۰	Na_2PO_4			
۵/۳۷	۱۱/۶۰	۰/۵۴	۰/۶۷	۰/۸۱
۸/۶۰	۹/۸۰	۰/۳۶	۰/۶۹	۰/۵۲
۱۱/۳۲	۸/۱۰	۰/۲۱	۰/۸۲	۰/۲۶
PEG ۱۵۰۰	NaH_2PO_4			
۴/۶۷	۱۷/۴۴	۰/۰۸	۰/۹۱	۰/۰۹
۱۲/۱۱	۱۲/۵۰	۰/۰۸	۱/۰۷	۰/۰۷
۱۸/۳۵	۸/۸۰	۰/۰۳	۰/۶۴	۰/۰۲
PEG ۲۰۰۰	Na_2PO_4			
۹/۹۰	۱۴/۲۰	۱/۰۱	۰/۴۸	۲/۱۰
۱۱/۳۱	۱۲/۸۰	۰/۶۶	۰/۳۶	۱/۸۰
۱۳/۵۰	۱۱/۱۰	۰/۵۸	۰/۳۹	۱/۴۷
PEG ۲۰۰۰	NaH_2PO_4			
۷/۴۵	۱۷/۸۰	۰/۰۵	۰/۴۳	۰/۱۲
۱۴/۲۷	۱۳/۷۰	۰/۰۳	۰/۳۴	۰/۰۹
۲۰/۴۶	۱۰/۱۰	۰/۰۲	۰/۳۳	۰/۰۶

جدول ۱۱- ضریب‌های تقسیم (K) برای BSA در سیستم‌های متفاوت آب + نمک فسفات + PEG در مجاورت نمک سدیم کلرید با غلظت ۰/۲۵ مولار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. w_1 و w_2 به ترتیب درصد‌های وزنی PEG و نمک فسفات در C_T و C_B به ترتیب غلظت BSA در فاز بالا و فاز پایین بر حسب گرم بر لیتر هستند.

w_1	w_2	C_T	C_B	K
PEG۱۵۰۰۰	Na_3PO_4			
۵/۳۷	۱۱/۶۰	۰/۳۸	۰/۹۳	۰/۴۱
۸/۶۰	۹/۸۰	۰/۲۶	۰/۸۸	۰/۳۰
۱۱/۳۲	۸/۱۰	۰/۱۸	۰/۹۴	۰/۱۹
PEG۱۵۰۰۰	NaH_2PO_4			
۴/۶۷	۱۷/۴۴	۰/۱۴	۱/۰۳	۰/۱۴
۱۲/۱۱	۱۲/۵۰	۰/۰۸	۰/۷۱	۰/۱۰
۱۸/۳۵	۸/۸۰	۰/۰۲	۰/۵۶	۰/۰۵
PEG۲۰۰۰	Na_3PO_4			
۹/۹۰	۱۴/۲۰	۰/۶۵	۰/۴۱	۱/۶۱
۱۱/۳۱	۱۲/۸۰	۰/۵۵	۰/۳۷	۱/۴۸
۱۳/۵۰	۱۱/۱۰	۰/۳۹	۰/۳۱	۱/۲۴
PEG۲۰۰۰	NaH_2PO_4			
۷/۴۵	۱۷/۸۰	۰/۴۱	۰/۷۱	۰/۵۸
۱۴/۲۷	۱۳/۷۰	۰/۲۱	۰/۶۰	۰/۳۵
۲۰/۴۶	۱۰/۱۰	۰/۰۲	۰/۲۲	۰/۱۰

پلیمر می‌شود، زیرا آنیون‌های چند ظرفیتی کوچک مانند PO_4^{3-} با اکسیژن اتری در PEG اتصال برقرار می‌کنند و در این کار موثرتر از آنیون‌های یک ظرفیتی هستند [۱۳].

در این شکل‌ها خطوط اتصال فاز (۱) که دو سر آن ترکیب درصد فازهای در حال تعادل را مشخص می‌کنند، نیز رسم شده‌اند. نقاط روی هر خط اتصال فاز ترکیب درصد کل سیستم را نشان می‌دهد که در آن سیستم به دو فاز با ترکیب درصدهای مشخص شده در دو سر خط اتصال فاز شکسته می‌شود. مقایسه منحنی‌های جدایی فاز در شکل ۵ نشان می‌دهد که برای وزن مولکولی یکسان از PEG۱۵۰۰۰ نمک NaH_2PO_4 ناحیه دو فاز را در مقایسه با نمک Na_3PO_4 افزایش داده است. بنابراین، برای جداسازی پروتئین به روش جدایی فاز در محلول‌های آبی از PEG، استفاده از نمک NaH_2PO_4 ارجحیت دارد. منحنی‌های جدایی فاز در شکل ۶ نشان می‌دهند که در سیستم حاوی PEG۲۰۰۰ ناحیه دو فاز برای NaH_2PO_4 بازم افزایش بیشتری در مقایسه با شکل ۵ برای PEG۱۵۰۰۰ دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پلیمر با وزن مولکولی کمتر برای گسترده‌تر کردن دامنه ناحیه دو فاز مناسب‌تر است، لیکن در مورد اثر وزن مولکولی پلیمر در جداسازی پروتئین‌ها باید به ضریب تقسیم پروتئین در دو فاز (که تابعی از مجموعه عامل‌های متفاوت است) توجه شود.



شکل ۸ - اثر افزایش سدیم کلرید بر ضریب تقسیم آلفا آمیلاز (K) در مقابل درصد وزنی NaH_2PO_4 (w_2) به درصد وزنی PEG (w_1) برای سیستم‌های $NaH_2PO_4 + PEG15000 + H_2O$ و $NaH_2PO_4 + PEG2000 + H_2O$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. ● مربوط به سیستم حاوی PEG۱۵۰۰۰ با سدیم کلرید و ▲ مربوط به این سیستم و بدون سدیم کلرید است. ○ مربوط به سیستم حاوی PEG۲۰۰۰ با سدیم کلرید و △ مربوط به این سیستم و بدون سدیم کلرید هستند.

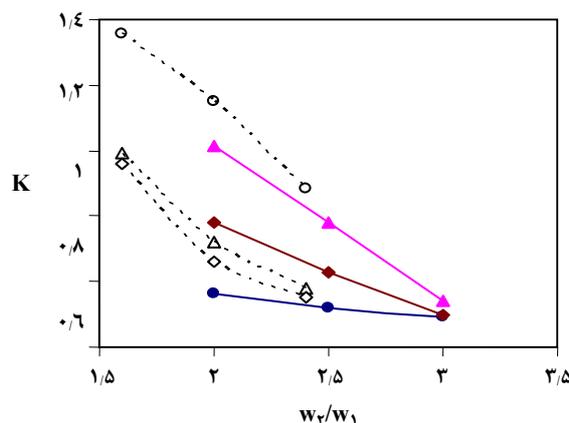
با توجه به نتیجه‌های ارایه شده در جدول ۶ معلوم می‌شود که ضریب تقسیم آلفا آمیلاز در سیستم‌های دو فاز با PEG ۱۵۰۰۰ بزرگ‌تر از ضریب‌های تقسیم مشابه در سیستم‌های حاوی PEG ۲۰۰۰ است. به نحوی که افزایش جرم مولکولی پلی اتیلن گلیکول از ۲۰۰۰ به ۱۵۰۰۰ تمایل مهاجرت آلفا آمیلاز به فاز بالا را حدود ۲ برابر افزایش می‌دهد و این نشان دهنده آن است که آلفا آمیلاز در سطح خود دارای گروه‌های غیرقطبی است و یا به عبارت دیگر، آب‌گریزی بیشتری دارد و در نتیجه با افزایش وزن مولکولی PEG تمایل آلفا آمیلاز به ورود در فاز بالا افزایش می‌یابد. در مورد سیستم سرم آلبومین گاوی، با کاهش جرم مولکولی پلیمر از ۱۵۰۰۰ به ۲۰۰۰، بسته به درصد وزنی نمک، ضریب جدایی تا ۳ برابر نیز افزایش پیدا می‌کند.

نکته دیگر آن که ضریب تقسیم آلفا آمیلاز با افزایش نسبت وزنی NaH_2PO_4 به PEG، افزایش پیدا می‌کند. افزایش غلظت فسفات باعث افزایش غلظت آن در فاز پایین می‌شود، زیرا غلظت فسفات در فاز بالا به تقریب ثابت و برابر حد حلالیت آن در فاز غنی از PEG است و افزایش غلظت در فاز پایین سبب پدیده نمک‌رانی^(۲) و خروج پروتئین‌ها از فاز غنی از فسفات به فاز غنی از PEG می‌شود. در نتیجه میزان پروتئین در فاز بالا افزایش یافته و ضریب تقسیم آن بالا می‌رود [۱۴]. دلیل دیگری که می‌توان بر

(۱) Tie-lines

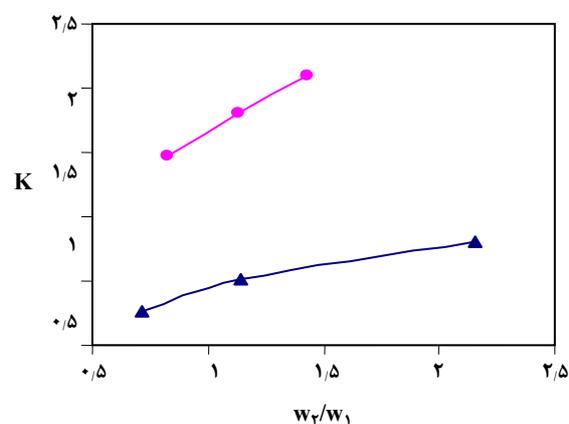
این نکته ذکر کرد، این است که نمک‌ها برهم‌کنش‌های آب‌گریز را تسهیل می‌کنند، در نتیجه با افزایش غلظت نمک این برهم‌کنش‌ها بیشتر می‌شوند و سبب سهولت و بیشتر شدن برهم‌کنش آلفا آمیلاز با PEG در فاز بالا و افزایش مقدار آن در این فاز می‌شود. نتیجه‌های ارایه شده در جدول ۷ نشان می‌دهد که با افزودن سدیم کلرید (با غلظت ۰/۲۵ مولار) به سیستم‌های مورد بررسی ضریب تقسیم آلفا آمیلاز افزایش پیدا می‌کند. این نکته به نحو آشکاری در شکل ۸ نشان داده شده است.

اثرهای تغییر pH بر ضریب جدایی آلفا آمیلاز در شکل ۹ آورده شده است. همان‌طور که در این شکل مشخص است، در این سیستم‌ها pH بهینه برای ضریب تقسیم $\text{pH}=5.75$ است. خاصیت آب‌گریزی PEG ۲۰۰۰ در مقایسه با PEG ۱۵۰۰۰ به شدت کاهش یافته و در اینجا فقط عامل آب‌گریزی تعیین کننده روند تغییرها نیست، بلکه وقتی pH از ۴/۷۵ به ۵/۷۵ افزایش می‌یابد، پروتئین منفی‌تر شده و به ورود به فاز بالا تمایل بیشتری پیدا می‌کند. گفتنی است که جدایی یون‌های فسفات به طرف فاز پایین یک



شکل ۹- اثر pH بر ضریب تقسیم آلفا آمیلاز (K) در مقابل درصد وزنی NaH_2PO_4 (w_2) به درصد وزنی PEG (w_1) در سیستم‌های $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{PEG} 15000 + \text{H}_2\text{O}$ و $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{PEG} 2000 + \text{H}_2\text{O}$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. ● و ▲ به ترتیب مربوط به pH های ۴/۷۵ و ۵/۷۵ و ۶/۸ در سیستم حاوی PEG ۲۰۰۰ و نشانه‌های متناظر توخالی مربوط به همان pH ها در سیستم حاوی PEG ۱۵۰۰۰ هستند.

(۲) Salting-out



شکل ۱۰- ضریب تقسیم BSA (K) در مقابل درصد وزنی Na_2PO_4 (w_2) به درصد وزنی PEG (w_1) در سیستم $\text{Na}_2\text{PO}_4 + \text{PEG} + \text{H}_2\text{O}$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. ● مربوط به سیستم حاوی PEG ۲۰۰۰ و ▲ مربوط به سیستم حاوی PEG ۱۵۰۰۰ هستند.

ضریب تقسیم کاهش می‌یابد. به‌طور کلی جدایی پروتئین‌ها در بسیاری از مواقع به pH سیستم بستگی دارد. تغییر pH گاهی باعث تغییر بار خالص پروتئین از مقدارهای مثبت در pH های پایین به مقدارهای منفی در pH های بالا می‌شود [۱]. pH بسته به نوع پروتئین و ترکیب درصد سیستم، به صورت‌های متفاوتی روی ضریب تقسیم اثر می‌گذارد. ممکن است در برخی موردها باعث افزایش ضریب تقسیم و در موردهای دیگر باعث کاهش آن شود [۱ و ۸] در حالی که در برخی موارد تاثیری ندارد، به‌نحوی که گاهی با افزایش تدریجی pH یک سیستم، ابتدا ضریب تقسیم زیاد و با ادامه افزایش pH ضریب تقسیم کاهش می‌یابد و برای برخی دیگر رفتار معکوس مشاهده می‌شود [۱۴ و ۱۶].

در مورد BSA شکل‌های ۱۰ و ۱۱ نشان می‌دهند که این پروتئین در سیستم‌های حاوی PEG۲۰۰۰ نسبت به سیستم‌های حاوی PEG۱۵۰۰۰ ضریب‌های تقسیم بالاتری دارد که علت آن می‌تواند بر اساس تغییر در حجم حذف شده حول هر مولکول PEG توضیح داده شود. حجم حذف شده حول یک مولکول^(۱)، حجمی است که بر حسب اندازه مولکول و نیروهای دافعه‌ای که از آن ناشی می‌شود اجازه نمی‌دهد که مولکول‌های دیگر در آن وارد شوند. به عبارت دیگر به ازای هر مولکول چنین حجمی از حجم سیستم حذف می‌شود زیرا، دستیابی سایر مولکول‌ها به آن غیرممکن است [۱ و ۱۳]. بنابراین، PEG با جرم مولکولی کمتر، اثرهای حجم حذف شده کمتری را در سیستم اعمال می‌کند و در نتیجه

(۱) Excluded volume

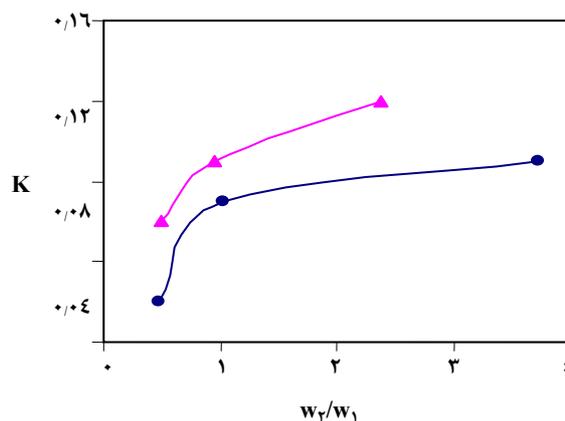
شکل ۱۲- ضریب تقسیم BSA (K) در مقابل درصد وزنی نمک فسفات (w_2) به درصد وزنی PEG (w_1) در سیستم $\text{PEG} + \text{H}_2\text{O} + \text{PEG} + \text{H}_2\text{O}$ فسفات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. ● مربوط به سیستم حاوی PEG۲۰۰۰ با نمک Na_2PO_4 و ▲ مربوط به همین سیستم با نمک Na_2PO_4 هستند. ○ و △ برای سیستم حاوی PEG۱۵۰۰۰ با نمک‌های NaH_2PO_4 و Na_2PO_4 هستند.

مولکول‌های پروتئین می‌توانند آسان‌تر و به تعداد بیشتری حول مولکول‌های PEG قرار گیرند. البته اثرهای حجم حذف شده PEG تا زمانی موثر است که برهم‌کنش‌های قوی‌تری مانند تمایل به تشکیل پیوندهای آب‌گریز بین مولکول‌های پروتئین و PEG وجود نداشته باشند.

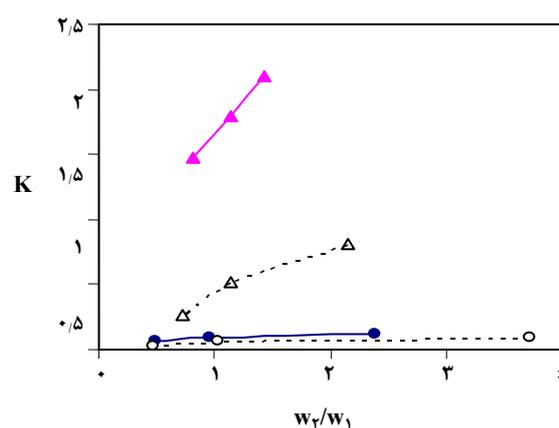
برای مثال، در مورد مولکول‌های BSA که با وجود داشتن بارهای مثبت و منفی در سطح خود در شرایط عادی نمی‌تواند

پتانسیل الکتریکی با بار منفی را در این فاز ایجاد می‌کند که این پتانسیل منفی سبب رانش مواد بیولوژیک با بار منفی به فاز بالا می‌شود [۱۵].

از طرفی با افزایش بیشتر pH زمانی که مقدار آن به ۶٫۸ می‌رسد، پروتئین منفی‌تر شده و با توجه به آب‌گریزی نسبی فاز بالا، تمایل پروتئین با بار منفی زیاد به فاز آب‌گریز کاهش یافته و



شکل ۱۱- ضریب تقسیم BSA (K) در مقابل درصد وزنی NaH_2PO_4 (w_2) به درصد وزنی PEG (w_1) در سیستم $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{PEG} + \text{H}_2\text{O}$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. ● مربوط به سیستم حاوی PEG۲۰۰۰ و ▲ مربوط به سیستم حاوی PEG۱۵۰۰۰ هستند.



$\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{PEG}15000 + \text{H}_2\text{O}$ و $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{PEG}20000 + \text{H}_2\text{O}$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. ● مربوط به سیستم حاوی سدیم کلرید و ▲ مربوط به سیستم بدون سدیم کلرید برای $\text{PEG}20000$ و نشانه‌های ○ و △ برای سیستم حاوی $\text{PEG}15000$ هستند.

دارد، pH در حدود ۱۲ است ولی وقتی نمک NaH_2PO_4 وجود دارد، در حدود ۴٫۴ است. با افزایش pH ، پروتئین منفی‌تر شده و تمایل آن به ورود به فاز بالا که چگالی بار مثبت بیشتری دارد، افزایش می‌یابد [۱۵]. اثر دوم مربوط به میزان حلال‌پوشی و تفکیک نمک Na_2PO_4 است که خیلی بیشتر از تفکیک نمک NaH_2PO_4 است و همین مسأله سبب بیشتر شدن خروج پروتئین‌ها از فاز غنی از نمک به فاز غنی از پلیمر می‌شود [۱۴].

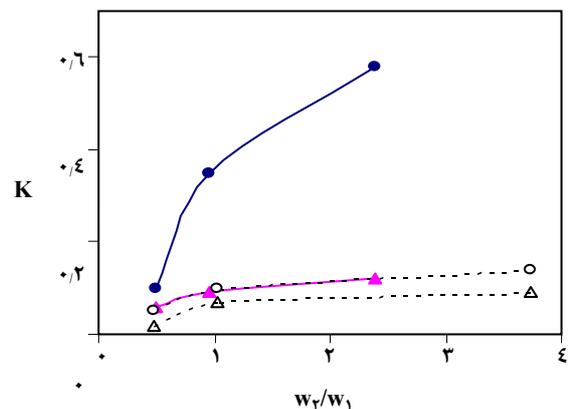
شکل‌های ۱۳ و ۱۴ اثر افزایش نمک سدیم کلرید را بر روی ضریب تقسیم BSA در سیستم‌های تحت بررسی نشان می‌دهد. در سیستم‌هایی که قدرت یونی بالایی ندارند، ضریب تقسیم BSA با افزایش سدیم کلرید تا غلظت‌های کمتر از ۰٫۲ مولار کاهش می‌یابد و افزایش بیشتر سدیم کلرید، باعث افزایش ضریب تقسیم می‌شود. آلبرتسن [۱] این پدیده را این‌گونه توجیه کرده که در غلظت کمتر از ۰٫۲ مولار، توزیع ماده بیولوژیک به شدت به بار آن وابسته بوده و به آب‌گریزی وابستگی کمی دارد و این امر باعث باقی‌ماندن ماده بیولوژیک در فازی می‌شود که یون‌های بیشتری وجود دارد. اما در غلظت‌های بیش از ۰٫۲ مولار سدیم کلرید، جدایی بیومولکول فقط به وسیله‌ی عامل آب‌گریزی آن تعیین می‌شود و به نظر می‌رسد که به‌طور کامل مستقل از بار آن باشد.

در سیستم حاوی آلفا آمیلاز نتیجه‌ها نشان می‌دهند که ضریب

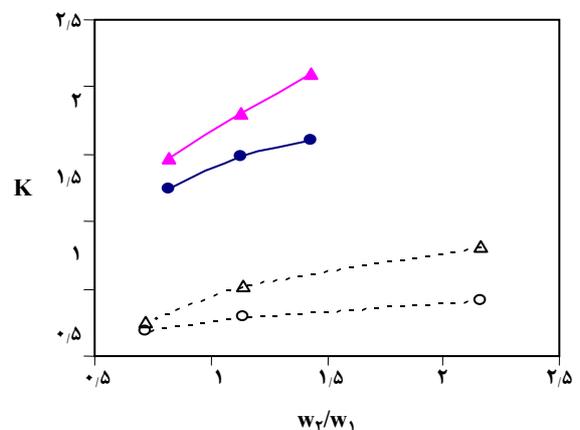
پیوندهای آب‌گریز قوی تشکیل دهند و بر اثرهای حجم حذف شده غالب شوند، مشاهده می‌شود که با افزایش نسبت فسفات به PEG ضریب تقسیم افزایش می‌یابد که علت آن را می‌توان به خروج پروتئین‌ها به وسیله‌ی نمک به فاز بالا مربوط دانست. این نکته را شکل‌های ۱۰ و ۱۱ به خوبی نشان می‌دهند.

همچنین از مقایسه نتیجه‌های آرایه شده در جدول ۱۰ و نیز شکل ۱۲ نتیجه می‌شود که برای سیستم حاوی سرم آلبومین گاوی نمک Na_2PO_4 نسبت به نمک NaH_2PO_4 در شرایط مشابه تاثیر بیشتری بر افزایش ضریب تقسیم دارد به نحوی که حتی تا بیش از ۳ برابر نیز می‌تواند ضریب تقسیم را افزایش دهد. این پدیده را می‌توان ناشی از دو اثر دانست.

اثر نخست تفاوت الکتروستاتیکی ایجاد شده به وسیله NaH_2PO_4 ، به این معنا که در سیستم وقتی نمک Na_2PO_4 وجود



شکل ۱۳- ضریب تقسیم BSA (K) در مقابل درصد وزنی نمک فسفات (w_2) به درصد وزنی PEG (w_1) در سیستم‌های



شکل ۱۴- ضریب تقسیم BSA (K) در مقابل درصد وزنی نمک فسفات (w_2) به درصد وزنی PEG (w_1) در سیستم‌های دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. ● مربوط به سیستم حاوی سدیم کلرید و ▲ مربوط به سیستم بدون سدیم کلرید برای $\text{PEG}20000$ و ○ و △ برای $\text{PEG}15000$ هستند.

کلرید بر ضریب تقسیم پروتئین‌های مذکور مورد مطالعه و بررسی گرفت. نتیجه‌ها نشان داد که با افزایش جرم مولکولی PEG از ۲۰۰۰ به ۱۵۰۰۰ تمایل آلفا آمیلاز به مهاجرت به فاز بالا تا حدود ۲ برابر افزایش می‌یابد و نیز با بالا بردن نسبت فسفات به PEG و افزودن سدیم کلرید، ضریب تقسیم بزرگ‌تر می‌شود. به طوری که برای سیستم PEG ۱۵۰۰۰ و NaH_2PO_4 وقتی که نسبت فسفات به PEG از ۰/۴۸ به ۳/۷۳ افزایش یابد، ضریب تقسیم آلفا آمیلاز از ۰/۷۶ به ۱/۴۴ افزایش پیدا می‌کند. از مقایسه جدول ۱۰ و شکل ۱۲ نتیجه می‌شود که برای سیستم حاوی سرم آلبومین گاوی نمک Na_3PO_4 نسبت به نمک NaH_2PO_4 در شرایط مشابه تاثیر بیشتری بر افزایش ضریب تقسیم دارد، به نحوی که حتی تا بیش از ۳ برابر نیز می‌تواند ضریب تقسیم را افزایش دهد.

همچنین با افزودن نمک سدیم کلرید به سیستم در حدی که غلظت NaCl به ۰/۲۵ مولار برسد، ضریب تقسیم آلفا آمیلاز تا ۶ برابر افزایش می‌یابد. اما تاثیر pH بر نحوه توزیع آلفا آمیلاز به نوع سیستم بستگی دارد. همچنین نتیجه‌ها نمایانگر آن هستند که کاهش جرم مولکولی PEG و افزایش نسبت فسفات به PEG باعث افزایش ضریب تقسیم BSA می‌شود، به نحوی که با کاهش جرم مولکولی PEG از ۱۵۰۰۰ به ۲۰۰۰، بسته به درصد وزنی نمک، ضریب جدایی تا ۳ برابر افزایش پیدا می‌کند. در حالی که افزودن نمک سدیم کلرید با توجه به پارامترهای متفاوت سیستم باعث افزایش یا کاهش ضریب تقسیم BSA خواهد شد.

تاریخ دریافت: ۸۲، ۱۱، ۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۴، ۶، ۷

تقسیم آلفا آمیلاز با افزایش سدیم کلرید افزایش پیدا می‌کند. هنگامی که این نمک به سیستم دو فازی اضافه شود، نمک‌ها بیشتر وارد فاز پایین شده و از آنجا که این نمک قدرت حلال‌پوشی زیادی دارد، مقدار زیادی از حلال اطراف آن را فراگرفته و در نتیجه مولکول‌های حلال کمتری در اطراف آلفا آمیلاز قرار می‌گیرد. از آنجا که آلفا آمیلاز خاصیت آب‌گریزی بالایی دارد، به آسانی می‌تواند وارد فاز آب‌گریز یا غنی از PEG شود، در نتیجه ضریب تقسیم افزایش یابد.

نتیجه‌گیری نهایی

در این تحقیق جدایی آلفا آمیلاز و سرم آلبومین گاوی در سیستم‌های دو فازی آبی پلی اتیلن گلیکول و نمک‌های فسفات در آب مورد بررسی قرار گرفت.

منحنی‌های جدایی فازی برای سیستم‌های:



تعیین شد. در ادامه، جدایی آلفا آمیلاز و BSA در محلول‌های آبی پلیمری همراه با نمک فسفات مورد بررسی قرار گرفت و اثر تغییر جرم مولکولی و غلظت پلیمر PEG، نمک فسفات، pH و سدیم

مراجع

- [1] Albertson, P. A., "Partitioning of Cell Particles and Macromolecules", 3rd ed., John-Wiley & Sons (1986).
- [2] Walter, M., Brooks, D. E., Fischer, D., "Partition in Aqueous Two-Phase Systems", 1st ed., Academic Press, Inc. (1985).
- [3] Kula, M. R., Kronner, K. H., Hustedt, H., *Adv. Biochem. Eng.*, **24**, 73 (1982).
- [4] King, R. S., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M., *AIChE J.*, **34** (10), 1585 (1988).
- [5] Haynes, C. A., Beynon, R. A., King, R. S., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M., *J. Phys. Chem.*, **93** (14), 5612 (1989).
- [6] Johansson, G., Reczey, K., *J. Chrom. B.*, **711**, 161 (1998).
- [7] Johansson, M-O., Karlstrom, G., Tjerneld, F., *Bioseparation*, **7**, 259 (1999).
- [8] Sebastio, M. J., Martel, P., Babtista, A., Peterson, S. B., Cabral, J. M., *Biotech. Bioeng.*, **56**, 3 (1997).

- [9] Sarmento, M. J., Pires, M. J., Cabral, J. M. S., *J. Chrom. A.*, **668**, 117 (1994).
- [10] Vogel, A. I., "Text-book of Quantitative Inorganic Analysis", 3rd ed., London, Longmans (1961).
- [11] Cheluget, E. L., Marx, S., Weber, M. E., Vera, J. H., *J. Solution Chem.*, **23**, 275 (1994).
- [12] Lei, X., Diamond, A. D., Hsu, J. T., *J. Chem. Eng. Data*, **35**, 420 (1990).
- [13] Asenjo, J. A., Schmidt, A. S., Hachem, F. and Andrews, B. A., Model for Predicting the Partition Behavior of Proteins in ATPS, *J. Chem. A*, **47**, 668, (1994).
- [14] Rees, A., Sternberg, M. J. E., Wetzel, R., "Protein Engineering", 1st ed., New York, Oxford University Press Inc. (1994).
- [15] Videira, M., Aires-Barros, M. R., *J. Chrom. A*, **668**, 237 (1994).
- [16] Harris, J. M., "Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications", Plenum Press (1992).
- [17] Rito-Palomares, M., Hernandez, M., *J. Chrom. B*, **81**, 711 (1998).