

مطالعه تجربی توزیع پذیری آنزیم آلفا آمیلاز در سامانه دوفازی-آبی بر پایه پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ / سولفات منیزیم

سید محسن دهنوی^۱، نغمه حدیدی^{۲*}، غلامرضا پازوکی^۳، منوچهر وثوقی^۴

۱. پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

۲. گروه تحقیقات بالینی، اپیدمیولوژی و آمار زیستی، بخش تحقیقات بالینی و میکروسکوپ الکترونی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳. گروه بیوتکنولوژی و محیط زیست، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

۴. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

چکیده

در سال های اخیر سامانه دوفازی-آبی به عنوان روشی برای جداسازی فرآورده های بیولوژیکی استفاده شده است. در این تحقیق از سامانه پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ / سولفات منیزیم برای جداسازی آنزیم آلفا آمیلاز استفاده شد. ابتدا با روش نقطه ابری در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد نمودار بینودال سامانه مورد نظر رسم شد و با معادله مرچوک برازش گردید. همچنین توزیع پذیری آنزیم آلفا آمیلاز در نقاط کاری مختلف در ناحیه دوفازی بررسی و خطوط رابط رسم شد و مقادیر ضرایب توزیع پذیری و بازدهی محاسبه شد. نتایج ضرایب توزیع پذیری آنزیم نشان داد که آنزیم تمایل دارد به فاز بالا مهاجرت کند و میانگین ضریب توزیع پذیری ۱/۱۵ و میانگین بازدهی استخراج حدود ۷۱٪ است. همچنین با افزایش مقدار پلیمر (نمک ثابت) و با افزایش مقدار نمک (پلیمر ثابت) ضریب توزیع پذیری افزایش یافت. مقادیر انرژی آزاد گیبس آلفا آمیلاز نشان داد فرایند توزیع پذیری به سمت فاز بالا خودبه خود است.

مشخصات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۲۷ مرداد ۱۳۹۷

دریافت پس از اصلاح: ۲۰ آبان ۱۳۹۷

پذیرش نهایی: ۱۶ دی ۱۳۹۷

کلمات کلیدی:

آلفا آمیلاز

سامانه دوفازی-آبی

ضریب توزیع پذیری

پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰

سولفات منیزیم

* عهده دار مکاتبات

hadidi@gmail.com

حقوق ناشر محفوظ است.

۱- مقدمه

مرز بین ناحیه تک فازی (پایین منحنی) و ناحیه دو فازی (بالای منحنی) است و خطوط رابط دو گره روی بینودال را به هم وصل می کنند که نشان دهنده غلظت نهایی اجزای سازنده در فازهای بالا و پایین هستند [7]. برای رسم منحنی بینودال از روش نقطه ابری^۵ در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد استفاده شده است که در ادامه به شرح این روش پرداخته شده است [10].

در ابتدا یک محلول با غلظت وزنی مشخص نمک ساخته (غلظت نمک می تواند با توجه به حلالیت نمک بین ۴۰ تا ۵۰ درصد در صد وزنی نمک متغییر باشد) داخل بورت ریخته می شود. محلول آبی پلیمر با غلظت مشخص (مثلا بین ۴۰ تا ۵۰ درصد وزنی پلیمر) نیز درون بشر ریخته می شود. در ابتدا هر دو محلول شفاف هستند. سپس محلول نمک به صورت قطره قطره به محلول درون بشر (پلیمر + آب) که به وسیله همزن مغناطیسی در حال مخلوط شدن است، اضافه می شود. محلول تک فازی شفاف است و نور از داخل آن عبور می کند، درحالی که محلول دوفازی کدر است. بنابراین مادامیکه افزودن اولین قطره نمک باعث کدر شدن محلول شود، اضافه کردن نمک را قطع نموده و حجم محلول ریخته شده یادداشت می شود. این نقطه اولین نقطه منحنی بینودال است. سپس برای تعیین نقطه بعدی روی نمودار، به محلول کدر قطره قطره آب یون زدوده اضافه کرده تا محلول شفاف (تک فازی) شود. دوباره عمل اضافه کردن محلول نمک را ادامه داده تا محلول درون بشر کدر گردد. نقاط بعدی نمودار هم با روشی مشابه به دست می آیند.

سامانه های دوفازی-آبی^۱ از اختلاط دو پلیمر نظیر پلی اتیلن گلیکول (PEG) و دکستران (DEX) یا یک پلیمر و یک نمک در محلول آبی تشکیل می شود. از هر دو سامانه پلیمر-پلیمر و پلیمر-نمک برای جداسازی سلول ها، اجزای سلولی، آمینواسیدها، پروتئین ها و آنزیم ها استفاده می شود [1-4]. سامانه های دوفازی-آبی بدلیل قیمت اقتصادی پایین، گرانروی کم و زمان بسیار کوتاه برای جداسازی فازها دارای کاربرد بیشتری نسبت به دیگر روش های استخراج نظیر کروماتوگرافی، صاف کردن و سانتریفوژ می باشد [5,6]. سامانه های دوفازی-آبی به آسانی می توانند در مقیاس بزرگ مورد استفاده قرار بگیرند، بطوریکه می توان مقیاس آن ها را تا $10^4 \times 2$ برابر مقیاس آزمایشگاهی افزایش داد [7]. در این سامانه ها دو فاز بالا و پایین حاوی ۹۰-۶۰ آب می باشد. بنابراین کشش سطحی بین دو فاز خیلی کم است. همچنین بدلیل اینکه محلول های آبی محیط مناسبی برای ترکیبات زیستی می باشند، این سامانه ها برای خالص سازی مولکول های زیستی مناسب هستند [8]. بدلیل ظرفیت بالا و سازگاری این سامانه ها با مواد زیستی قدرت تفکیک و بازدهی این سامانه ها بالا می باشد. همچنین به کمک تجهیزات استخراج مایع-مایع که از روش های متداول در مهندسی شیمی است می توان به راحتی این ترکیبات را جداسازی نمود. بنابراین سامانه های دوفازی-آبی یک محیط مناسب برای خالص سازی و جداسازی مواد زیستی از محیط کشت اولیه می باشند [9]. در این تحقیق توزیع پذیری آنزیم آلفا آمیلاز در سامانه دوفازی-آبی شامل پلی اتیلن گلايکول ۲۰۰۰-منیزیم سولفات در دمای ۲۳ سانتی گراد اندازه گیری و مطالعه شده است.

۲- مواد و روش ها

مشخصات موادی که در این مطالعه استفاده شده اند، در جدول ۱ گزارش شده است. مواد بدون خالص سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفته اند و از آب یون زدوده^۲ برای تهیه تمام محلول ها استفاده شده است.

نمودارهای بینودال در هر سامانه محدوده عملیاتی آن سامانه را مشخص می کند و در یک دمای مشخص برای آن سامانه منحصر به فرد است. سامانه دوفازی-آبی دارای منحنی بینودال و خطوط رابط^۳ می باشد. منحنی بینودال نشان دهنده

¹ Aqueous Two-Phase Systems

² Deionized water

³ Tie lines

⁴ Node

⁵ Cloud point method

جدول (۱). ویژگی‌های مواد مورد مصرفی در تحقیق

نام ماده	فرمول شیمیایی	وزن مولکولی (گرم/مول)	خلوص	منبع تهیه
پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$	۱۸۰۰	۰/۹۹	شرکت میلی پور مرک
سولفات منیزیم	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۲۴۶/۴۸	۰/۹۹	شرکت میلی پور مرک
آنزیم آلفا آمیلاز	-	۵۱-۵۴ kDa	۰/۹۹	شرکت سیگما-آلدریج

ریخته می‌شود. نمونه اصلی و نمونه شاهد که هر دو داخل قیف جداکننده هستند به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود تا جدایش فازی کامل گردد و دو فاز شفاف به دست آیند. پس از آن که مخلوط به دو فاز مجزا تقسیم شد، دو فاز به راحتی توسط شیر قیف جداکننده از هم جدا می‌شوند و وزن فاز بالا و پایین به دقت یادداشت می‌شوند. ضریب توزیع پذیری (K) طبق رابطه (۲) تعریف می‌شود:

$$K = \frac{[\alpha - \text{Amylase}]_T}{[\alpha - \text{Amylase}]_B} \quad (2)$$

که در آن $[\alpha - \text{Amylase}]_T$ و $[\alpha - \text{Amylase}]_B$ نشان‌دهنده غلظت تعادلی آنزیم آلفا آمیلاز در فازهای بالا و پایین است. با توجه به تعریف ضریب توزیع پذیری از رابطه فوق میزان بازیابی^۹ یا بازده استخراج^{۱۰} به ترتیب برای فاز بالا و فاز پایین از روابط (۳) و (۴) به دست می‌آیند.

$$YT(\%) = \frac{100}{1 + V_B / (V_T K)} \quad (3)$$

$$YB(\%) = \frac{100}{1 + V_T K / V_B} \quad (4)$$

پس از جداسازی دو فاز، غلظت پلیمر، نمک و آنزیم در هر فاز مشخص نیست. در این مرحله برای به دست آوردن غلظت پلیمر و نمک از روش وزنی مرچوک استفاده می‌شود. با توجه به اینکه ترکیب درصد فاز بالا و پایین بر روی نمودار بینودال قرار دارند، با حل همزمان چهار معادله زیر می‌توان پارامترهای مجهول $[\text{Salt}]_B$ ، $[\text{PEG}]_B$ ، $[\text{Salt}]_T$ ، $[\text{PEG}]_T$ که به ترتیب غلظت پلیمر در فاز بالا و پایین و غلظت نمک در فاز بالا و پایین را نشان می‌دهند، را از روش مرچوک به دست آورد [11]:

از روی حجم‌های یادداشت شده و با داشتن چگالی محلول‌ها می‌توان نمودار بینودال برحسب درصد وزنی اجزا را رسم کرد [10].

پس از رسم داده‌های تجربی، منحنی بینودال را معمولاً با روابطی برازش^۶ می‌کنند. یکی از معروفترین این روابط معادله مرچوک است که به صورت زیر نوشته می‌شود [11]:

$$[\text{PEG}] = A \times \exp(B \times [\text{Salt}]^{0.5} - C \times [\text{Salt}]^3) \quad (1)$$

که در این رابطه $[\text{PEG}]$ و $[\text{Salt}]$ به ترتیب درصد وزنی پلیمر و نمک برای داده‌های تجربی باینودال بوده و A و B و C پارامترهای برازش شونده^۷ هستند. برای بررسی توزیع پذیری آنزیم در سامانه دوفازی-آبی، چند نمونه خوراک با غلظت‌های مختلف از اجزای سازنده (پلیمر و نمک) در ناحیه دوفازی ساخته شده است. به‌طور مثال روش تهیه یک محلول ۴۰ گرمی در ناحیه دوفازی با درصد وزنی ۶ نمک سولفات منیزیم، پلیمر ۲۴ درصد و آب ۷۰ درصد در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد در ادامه شرح داده شده است. برای این منظور ۲۸ گرم آب را به همراه ۲/۴ گرم نمک با ترازو به دقت وزن کرده و درون بشر ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه توسط همزن مغناطیسی هم زده می‌شود تا نمک حل گردد. سپس ۹/۶ گرم پلیمر را وزن کرده و به محلول درون بشر اضافه کرده تا به مدت ۲۰ دقیقه دیگر هم زده شود و مخلوط کدر دوفازی به دست آید. مقداری از این مخلوط مثلاً ۱۵ گرم را به‌عنوان نمونه شاهد جدا نموده و درون قیف جداکننده^۸ ریخته تا جدایش فازی اتفاق بیفتد. به مخلوط باقی‌مانده (۲۵ گرم) مقدار بسیار کمی آنزیم آلفا آمیلاز (به عنوان مثال ۰/۰۱ گرم) اضافه می‌شود و مجموعه به مدت ۲۰ دقیقه دیگر هم زده می‌شود. سپس این مخلوط نیز به داخل قیف جداکننده دیگر

⁶ Fit⁷ Fitting parameter⁸ Decantor⁹ Yield recovery¹⁰ Extraction efficiency

داده شده اند. $[Salt]_1$ و $[PEG]_2$ به ترتیب نشان دهنده درصد وزنی نمک و پلیمر هستند.

داده های جدول ۲ با رابطه سه پارامتری (۱) (مدل مرچوک) که برای تعیین منحنی بینودال برای سامانه های دوفازی-آبی پلیمر/نمک پیشنهاد شده، برازش شده اند. نمودارهای بینودال مربوطه برای سامانه فوق الذکر در شکل ۱ نشان داده شده است.

داده های جدول ۲ با رابطه سه پارامتری (۱) (مدل مرچوک) که برای تعیین منحنی بینودال برای سامانه های دوفازی-آبی پلیمر/نمک پیشنهاد شده، برازش شده اند. نمودارهای بینودال مربوطه برای سامانه فوق الذکر در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول (۲). داده های تجربی تعادل فازی در دمای ۲۳ درجه

سانتی گراد، نمک (۱) و پلیمر (۲)

سولفات منیزیم + پلی اتیلن گلاکول ۲۰۰۰	
% پلیمر	% نمک
۳۸/۴۰	۲/۲۴
۳۴/۵۰	۳/۴۳
۳۱/۷۰	۴/۰۵
۲۷/۲۷	۵/۵۵
۲۳/۹۵	۷/۱۰
۲۰/۳۷	۹/۰۸
۱۷/۲۵	۱۱/۱۶
۱۴/۵۴	۱۳/۲۵
۱۲/۵۱	۱۴/۸۷
۱۱/۴۵	۱۵/۷۸
۱۰/۲۸	۱۶/۷۸
۹/۰۸	۱۷/۸۶
۸/۴۷	۱۸/۴۲
۷/۹۳	۱۸/۹۰
۷/۴۶	۱۹/۳۳
۶/۶۷	۲۰/۰۵
۶/۳۱	۲۰/۴۱
۵/۹۸	۲۰/۷۶
۵/۶۷	۲۱/۰۷
۵/۳۸	۲۱/۳۸

$$[PEG]_T = A \times \exp(B \times [Salt]_T^{0.5} - C \times [Salt]_T^3) \quad (5)$$

$$[PEG]_B = A \times \exp(B \times [Salt]_B^{0.5} - C \times [Salt]_B^3) \quad (6)$$

$$[PEG]_T = \frac{[PEG]_M}{\alpha} - \frac{1-\alpha}{\alpha} [PEG]_B \quad (7)$$

$$[Salt]_T = \frac{[Salt]_M}{\alpha} - \frac{1-\alpha}{\alpha} [Salt]_B \quad (8)$$

$$\alpha = \frac{M_{Top}}{M_{Total}} \quad (9)$$

که علاوه بر پارامترهای معرفی شده در بالا، $[PEG]_M$ و $[Salt]_M$ به ترتیب غلظت پلیمر و نمک در خوراک اولیه و α نسبت جرم فاز بالا (M_{Top}) به جرم کل مخلوط اولیه (M_{Total}) هستند. روابط (6,5)، روابط داده های تعادلی هستند که با رابطه مرچوک برازش شده اند. طول خط رابط (TLL) از رابطه (۱۰) به دست می آید:

$$TLL = \sqrt{([PEG]_T - [PEG]_B)^2 + ([Salt]_T - [Salt]_B)^2} \quad (10)$$

برای اندازه گیری غلظت آنزیم در فازهای بالا و پایین از دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV-2100, UNICO) استفاده شد. برای این منظور ابتدا بیشینه طول موج جذب آلفا آمیلاز مشخص گردید. این کار از طریق اسکن محلول رقیق آلفا آمیلاز و آب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (M501, CamSpec) انجام شد و طول موج ۲۸۰ نانومتر به عنوان طول موجی که بیشینه جذب آنزیم در آن اتفاق می افتد، مشخص شد.

۳- یافته ها

داده های تجربی مربوط به نمودار تعادل فازی (مرز ناحیه تک فازی و دوفازی) که با استفاده از روش نقطه ابری در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد به دست آمده اند، در جدول ۲ نمایش

برای فهم بهتر فرآیند توزیع پذیری آنزیم آلفا آمیلاز (K) در سیستم دوفازی آبی مذکور از نقطه نظر ترمودینامیکی، انرژی گیبس آنزیم آلفا آمیلاز Δg_m^0 برای این سیستم محاسبه شد. بر این اساس Δg_m^0 مطابق رابطه زیر محاسبه می شود [12]:

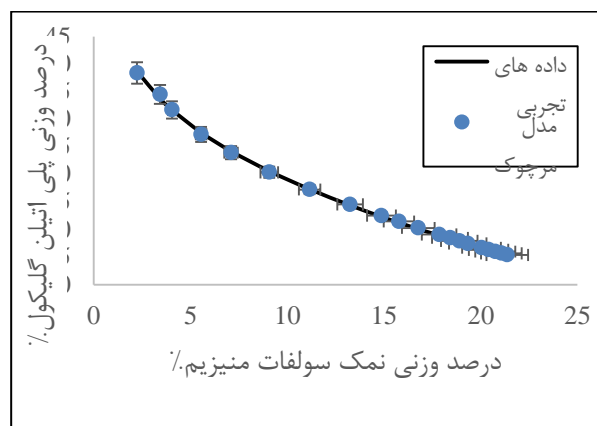
$$\Delta g_m^0 = -RT \ln(K) \quad (11)$$

که در این رابطه Δg_m^0 انرژی گیبس آنزیم آلفا آمیلاز، R مقدار ثابت، T دمای مطلق و K ضریب توزیع پذیری می باشد.

مقدار Δg_m^0 در جدول ۵ گزارش شده است.

۴- بحث

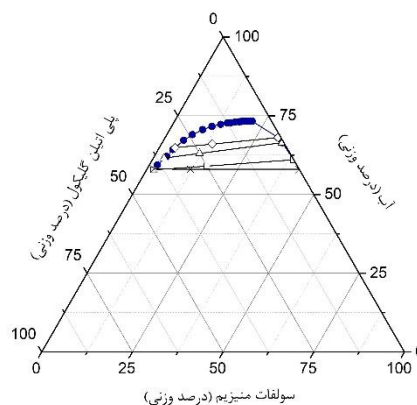
با توجه به جدول ۳ و مقادیر بالای R^2 و به نسبت پایین RMSD می توان نتیجه گرفت که نتایج تجربی به خوبی با رابطه مرچوک منطبق شده اند. بنابراین انتظار می رود این رابطه برای سایر سامانه های پلی اتیلن گلیکول / سولفات منیزیم نیز معتبر باشد. با توجه به نتایج جدول ۵ مشخص است که در این سامانه آنزیم بیشتر تمایل به فاز بالا دارد (ضریب توزیع پذیری بزرگتر از واحد) و میانگین ضرایب توزیع پذیری خوراکها حدود ۱/۱۵ است. بازدهی فاز بالای آنزیم هم دارای مقادیر بالایی است (بیشتر از بازدهی فاز پایین) که این امر برای جداسازی آنزیم مطلوب است. مقدار میانگین بازدهی در فاز بالا برای این سامانه حدود ۷۱٪ است. همچنین مشاهده می شود که با افزایش مقدار پلیمر (نمک ثابت) ضریب توزیع پذیری افزایش می یابد. با افزایش مقدار نمک (پلیمر ثابت) هم ضریب توزیع پذیری افزایش می یابد. همچنین مقادیر انرژی گیبس آنزیم آلفا آمیلاز نشان می دهد فرایند توزیع پذیری این آنزیم به سمت فاز بالا خودبخود انجام می شود.



شکل (۱) نمودار بینودال به همراه داده های تجربی برای سامانه دوفازی-آبی پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰/منیزیم سولفات

نتایج برآزش با رابطه مرچوک در جدول ۲ نشان داده شده است. از پارامتر ضریب همبستگی R^2 و خطای جذر میانگین مربعات (\sqrt{RMSD}) برای ارزیابی نتیجه برآزش داده های تجربی و مدل های معرفی شده، استفاده شده است. مشخصات خوراک های تهیه شده در جدول ۴ آمده است. نمودار خطوط رابط مربوط به داده های جدول ۴ در شکل ۲ آمده است.

توزیع پذیری آنزیم آلفا آمیلاز در خوراک های جدول فوق بررسی شده، مشخصات فیزیکی فازها و مقادیر بازدهی فاز بالا برای هر نمونه مشخص شده و در جدول ۵ آمده است.



شکل (۲) نمودار خطوط رابط نمونه خوراک های جدول ۴ سامانه پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰/منیزیم سولفات

¹¹ Determination coefficient

¹² Root mean square deviation

جدول (۳) پارامترهای رابطه مرچوک (Error! Reference source not found.) و مقادیر R^2 و RMSD سامانه‌های دوفازی-آبی

RMSD	R^2	C	B	A	سامانه دوفازی-آبی
۰/۲۶۹۸	۰/۹۹۹۴	$۷/۶۳ \times ۱۰^{-۵}$	-۰/۳۷۹۲	۶۸/۳۴	پلی اتیلن گلايکول ۲۰۰۰ + منیزیم سولفات + آب

جدول (۴) داده‌های به دست آمده از روش وزنی مرچوک برای سامانه دوفازی-آبی سولفات منیزیم (۱) و پلی اتیلن گلايکول ۲۰۰۰ (۲) در دمای ۲۳ °C

شماره نمونه	ترکیب خوراک		ترکیب فاز بالا		ترکیب فاز پایین		جرم فاز بالا/ طول خط رابط	
	% نمک	% پلیمر	% نمک	% پلیمر	% نمک	% پلیمر	جرم کل مخلوط	طول خط رابط
۱	۱۴	۲۰	۳۱/۱۵	۳۰/۷۹	۰/۸۲	۰/۶۴	۴۰/۲۰	۰/۶۴
۲	۱۲	۲۵	۳۳/۰۸	۳۵/۵۱	۰/۴۹	۰/۷۰	۴۶/۱۹	۰/۷۰
۳	۱۶	۲۵	۳۸/۹۴	۴۰/۲۸	۰/۰۷	۰/۶۲	۵۴/۶۴	۰/۶۲
۴	۱۲	۳۰	۴۲/۰۲	۳۹/۹۹	۰/۰۲	۰/۷۵	۵۶/۵۷	۰/۷۵

جدول (۵) مقادیر مشخصات فیزیکی و نتایج توزیع پذیری آلفا آمیلاز در سامانه دوفازی-آبی منیزیم سولفات (۱) و پلی اتیلن گلايکول ۲۰۰۰ (۲) در دمای ۲۳ °C

شماره نمونه	ترکیب خوراک		چگالی فازها		pH		ضرب توزیع پذیری	انرژی گیبس آنزیم	بازده استخراج فاز بالا %
	% نمک	% پلیمر	بالا	پایین	بالا	پایین			
۱	۱۴	۲۰	۱/۱۸	۱/۰۹	۶/۲	۶/۲	۱/۰۵	-۱۲۰/۹۴	۶۵/۹
۲	۱۲	۲۵	۱/۲۰	۱/۰۷	۶/۷	۶/۷	۱/۱۷	-۳۸۹/۱۸	۷۶/۲
۳	۱۶	۲۵	۱/۲۱	۱/۰۶	۶/۴	۶/۴	۱/۲۰	-۴۵۱/۹۴	۶۹/۴
۴	۱۲	۳۰	۱/۲۲	۱/۰۶	۶/۵	۶/۵	۱/۲۹	-۶۳۱/۲۱	۸۲/۶

۵- نتیجه گیری

۱/۳ و بیشترین مقدار بازدهی فاز بالا ۸۲٪ مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش مقدار پلیمر (نمک ثابت) و مقدار نمک (پلیمر ثابت) ضریب توزیع پذیری افزایش می‌یابد. همچنین با توجه به مقادیر انرژی آزاد گیبس می‌توان بیان داشت توزیع پذیری آنزیم آلفا آمیلاز به سمت فاز بالا خودبخود است.

در این تحقیق ابتدا نمودارهای بینودال مربوط به سامانه دوفازی-آبی شامل نمک منیزیم سولفات و پلیمر پلی اتیلن گلايکول ۲۰۰۰ با استفاده از روش نقطه ابری در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد به دست آمد و بر اساس داده‌های تجربی ضرایب مربوط به مدل مرچوک برای نمودار بینودال تعیین شد. در ادامه توزیع پذیری و بازدهی استخراج آنزیم آلفا آمیلاز در سامانه دوفازی-آبی مذکور در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد بررسی شد. بیشترین مقدار ضریب توزیع پذیری در این سامانه

مراجع

- Equilibria, A new biocompatible gentle aqueous biphasic system in cefalexin partitioning containing nonionic Tween 20 surfactant and three organic / inorganic different salts". *Fluid Phase Equilibria*, 379, 62–71.
11. J.C.Merchuk, B.A.Andrews & J.A. Asenjo (1998) "Aqueous two-phase systems for protein separation Studies on phase inversion". *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711(1-2)285-293
 12. H. Yang, L. Chen, C. Zhou, X. Yu, A. E. A. Yagoub, H. Ma (2018) "Improving the extraction of L-phenylalanine by the use of ionic liquids as adjuvants in aqueous biphasic systems", *Food Chemistry*, 245 , 346-352.
 1. P.-Å., Albertsson (1956)" Chromatography and partition of cells and cell fragments". *Nature*, 177, pp.771–774.
 2. P.-Å.Albertsson (1958")Particle fractionation in liquid two-phase systems The composition of some phase systems and the behaviour of some model particles in them application to the isolation of cell walls from microorganisms". *Biochimica et Biophysica Acta*, 27, 378–395.
 3. P.-Å.Albertsson (1958) " Partition of proteins in liquid polymer-polymer two-phase systems". *Nature*, 182, 709–711.
 4. P.-Å.Albertsson. & E.J. Nyns (1959) "Counter-current distribution of proteins in aqueous polymer phase systems". *Nature*, 184, 1465–1468.
 5. G.Pazuki, M.Vossoughi & V.Taghikhani , (2010)" Partitioning of Penicillin G Acylase in Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol) 20000 or 35000 and Potassium Dihydrogen Phosphate or Sodium Citrate". *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55(1), 243–248.
 6. S. Abdolrahimi, B.Nasernejad, & G. Pazuki, (2014) "Influence of process variables on extraction of Cefalexin in a novel biocompatible ionic liquid based-aqueous two phase system". *Physical Chemistry Chemical Physics*.17, 655-669.
 7. R.Hatti-Kaul (2001) "*Aqueous two-phase systems*, New Jersey: Springer. Available at: <http://link.springer.com/10.1385/1592590284>.
 8. H.Hustedt , K.H.Kroner & M.R.Kula (1985)" Applications of phase partitioning in biotechnology". *Partitioning in aqueous two-phase systems*, 529–587.
 9. J.A.Asenjo & B.A.Andrews (2011) "Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective". *Journal of Chromatography A*, 1218(49), 8826–8835.
 10. M.Taghavivand & Pazuki, G. (2014)" Fluid Phase

Experimental study of partitioning of α -Amylase in aqueous two phase systems based on Poly (ethylene) glycol 2000/ Magnesium sulfate

Seyed Mohsen Dehnavi ¹, Naghmeh Hadidi ^{2,*}, Gholamreza Pazuki ³, Manouchehr Vossoughi ⁴

1. Institute for Nanoscience and Nanotechnology, Sharif University of Technology, Tehran, Iran.
2. Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3. Department of Chemical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran.
4. Department of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran.

ABSTRACT

In recent years, the aqueous two phase systems (ATPS) are applied for separation of biological products as a new method. In this research, the ATPS based on poly (ethylene glycol) 2000 and magnesium sulfate are applied for separation of α -amylase. The binodal curve is firstly obtained by using cloud point method at 23 °C and is correlated by the Merchuk equation. Also, partitioning of α -amylase in two phase region at various working points is investigated and tie lines, partition coefficients and recovery are obtained. The results show that the bimodal curve is fitted with the Merchuk equation well. After partitioning of α -amylase enzyme in the ATPS, α -amylase tends to the top phase and the average of the partition coefficients the extraction recoveries are 1.15 and 71%, respectively. Also, the partition coefficient of α -amylase is increased with increasing concentration of polymer (at constant concentration of salt) and concentration of salt (at constant concentration of polymer). The values of Gibbs free energy of α -amylase show that partitioning process is spontaneously toward top phase.

ARTICLE INFO

Article history:

Received: August 18, 2018

Received in revised form: November 11, 2018

Accepted: January 6, 2019

Key words:

α -amylase, Aqueous two phase systems, Partition coefficient, Poly (ethylene glycol) 2000, Magnesium sulfate salt.

All right reserved.

hadidi@gmail.com

* عهده دار مکاتبات: