

## بررسی برهم‌کنش مهمان - میزبان در فرایند استخراج پروتئین آلبومین سرم گاوی با استفاده از سامانه‌های میسلی معکوس

شهریار عصفوری<sup>۱\*</sup>، حسین فراست زاده<sup>۲</sup>

۱. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران (osfour@pgu.ac.ir)  
۲. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.

چکیده	مشخصات مقاله
<p>در این مطالعه اثر میسل‌های معکوس کاتیونی بر ساختار پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) مورد تحقیق قرار گرفت. طیف UV، فرایند کپسوله‌سازی و تراکم BSA را به ترتیب به صورت یک اوج در حوالی طول موج ۲۷۹ نانومتر و پراکنش نور نشان داد. از طیف‌سنجی سیرکولاردیکرویزم برای یافتن ساختارهای دوم پروتئین در میسل‌های معکوس و فاز آبی نرمال استفاده گردید. نتایج نشان داد که شکل بی‌نظم و متراکم، صفحات نامنظم و رندم کوئل، افزایش یافته در صورتیکه فرم مارپیچ آلفا کاهش یافته است. علاوه بر این، طیف سنجی FTIR به همراه فناوری افراز برای تعیین حالت‌های آب در میسل معکوس بکار گرفته شد. بر اساس آنالیز داده‌ها، کمتر از ۵۰٪ آب موجود برای انحلال پروتئین در دسترس می‌باشد. به طور کلی، نتایج نشان داد که محیط محدود و عدم وجود آب کافی دو عامل مهم تراکم پروتئین در این سامانه‌ها محسوب می‌شوند.</p>	<p><b>تاریخچه مقاله:</b> دریافت: ۹ تیر ۹۱ دریافت پس از اصلاح: ۹ مهر ۹۱ پذیرش نهایی: ۲۳ مهر ۹۱</p> <p><b>کلمات کلیدی:</b> میسل معکوس جداسازی بیولوژیک ساختار پروتئین حالت آب آلبومین سرم گاوی سیرکولاردیکرویزم</p>
حقوق ناشر محفوظ است.	* عهده دار مکاتبات

## ۱- مقدمه

با پیشرفت علوم زیستی و توسعه فناوری‌های نوین در حوزه‌های دارورسانی، مهندسی ژنتیک، دارو و درمان تعدد و تنوع محصولات حاصل از فرایندهای زیستی رو به افزایش بوده است. ضمن این که بخش عمده هزینه تولید یک محصول زیستی مربوط به طراحی فرایند جداسازی و خالص‌سازی آن از محیط کشت اولیه می‌باشد [۱]. هنگام تولید یک فرآورده زیستی، شاخصه‌های کلیدی و مهم که نقش اساسی در طراحی واحدهای فرایندی پایین دستی این محصولات ایفا می‌نماید، غلظت و سطح خلوص این مواد می‌باشد. علاوه بر غلظت پایین محصولات، مشکلات فرایند جداسازی و خالص‌سازی زیستی از قبیل کثرت مواد آلوده‌کننده حاصل از سلول‌ها و یا محیط کشت، سلول‌ها یا پاره‌های سلولی ناشی از فرایند تجزیه و همچنین به طور مشابه برخی از خواص فیزیکی محصول از قبیل ویسکوزیته و دانسیته به شدت بر انتخاب فرایندهای متنوع جداسازی و خالص‌سازی این محصولات اثرگذار می‌باشند. لذا روش‌های معمول در فرایندهای جداسازی و تغلیظ محصولات با تغییر شرایط pH، دما و نوع حلال چندان در این خصوص مؤثر نمی‌باشند [۲].

پروتئین‌ها پلیمرهای خطی از اسیدهای آمینه هستند که با پیوند پپتیدی به هم متصل شده‌اند و از مهمترین پلیمرهای زیستی به شمار می‌روند که در ساختار و عمل یاخته‌ها نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. به توالی پروتئین که به صورت رشته‌ای از اسیدهای آمینه می‌باشد، ساختار اول<sup>۱</sup> گفته می‌شود. ساختار دوم<sup>۲</sup>، به نظم‌های موضعی گفته می‌شود که پروتئین در حین تاشدگی به خود می‌گیرد. این ساختار به فضای قرار گرفتن واحدهای اسید آمینه در کنار هم که به صورت خطی چیده شده‌اند اشاره دارد. برخی از این چیده شدن‌ها حالت منظم و پریودیک دارند مثل مارپیچ آلفا و صفحه‌ی چین‌دار بتا<sup>۳</sup>. علاوه بر این، ساختارهای منظم غیرتکرار شونده‌ی چرخش‌های بتا و رندوم کوئل<sup>۴</sup> نیز در دسته‌ی ساختار دوم پروتئین قرار می‌گیرند. همچنین به حالت سه بعدی که پروتئین بعد از پیچش به خود می‌گیرد، ساختار سوم<sup>۵</sup> و حالت قرارگیری چند زنجیره‌ی پلی پپتیدی در فضای کنار یکدیگر، ساختار چهارم<sup>۶</sup> گفته می‌شود [۳].

از روش‌های موفق که در دهه گذشته برای استخراج و خالص‌سازی مواد زیستی، به ویژه پروتئین‌ها، مورد توجه قرار گرفته است استفاده از میکروامولسیون‌های آب در روغن یا سامانه‌های میسلی معکوس<sup>۷</sup> برای دستیابی به درجه خلوص مورد نظر محصول می‌باشد. میسل‌های معکوس از نظر ساختمانی متشکل از لخته‌هایی هستند که بر اثر خودسامانگی مولکول‌های مواد فعال سطحی در غلظتی معین در حلال‌های آلی که به آن غلظت بحرانی میسلی گفته می‌شود<sup>۸</sup> شکل می‌گیرند. این سامانه‌ها متشکل از یک هسته داخلی آبی هستند که به واسطه یک لایه فیلمی ماده فعال سطحی از حلال آلی جدا می‌شوند. محلول‌های میسلی معکوس به لحاظ ترمودینامیکی پایدار هستند و تشکیل آن‌ها بسیار سریع اتفاق می‌افتد. لذا به مرور زمان جدایی فازی اتفاق نمی‌افتد [۴]. در حالت عادی اندازه قطر هسته آبی درون میسل‌های معکوس معمولاً بین ۰/۵ تا ۱۰ نانومتر می‌باشد. به همین دلیل این محلول‌ها شفاف‌تر از امولسیون‌های عادی که یک حالت کدر دارند به نظر می‌رسند. ضمن این که ویسکوزیته این محلول‌ها نیز در حد ویسکوزیته حلال می‌باشد. نسبت مولی آب به ماده فعال سطحی،  $w_0$ ، تعیین کننده اندازه میسل‌های معکوس می‌باشد و خواص این سامانه‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ به گونه‌ای که هر چقدر که این نسبت بیشتر شود خواص این نانوسامانه آبی که در هسته میسل‌های معکوس قرار دارد به خواص آب توده نزدیک‌تر می‌شود [۵].

تاکنون از سامانه‌های میسلی معکوس استفاده‌های متعددی شده است. برخی از کاربردهای مهم این سامانه‌ها عبارتند از: تولید نانوذرات با توزیع اندازه محدود [۶-۱۰]، تولید کاتالیزورهایی با پایداری بیشتر [۱۱-۱۳]، تولید ذرات پلیمری و متخلخل [۱۴، ۱۵]، سامانه‌های دارورسانی و استفاده از آنها به عنوان نانوراکتورها به ویژه برای واکنش‌های آنزیمی [۱۶-۱۹]. یکی از کاربردهای مهم سامانه‌های میسلی معکوس، استفاده از آن‌ها برای جداسازی و خالص‌سازی ترکیبات زیستی می‌باشد. لوئیزی و همکاران، اولین گروهی بودند که از سامانه‌های میسلی معکوس برای جداسازی و خالص‌سازی پروتئین‌ها استفاده کردند [۲۰]. گوکلن و هاتن، از این سامانه‌ها برای استخراج پروتئین‌ها در مقیاس بزرگ استفاده کردند [۲۱]. آن‌ها در تحقیقی دیگر از سامانه‌های میسلی معکوس برای جداسازی پروتئین‌ها به صورت انتخابی استفاده

<sup>۱</sup> Primary structure<sup>۲</sup> Secondary structure<sup>۳</sup>  $\alpha$ -Helix and  $\beta$ -sheet<sup>۴</sup>  $\beta$ -turn and Random coil<sup>۵</sup> Tertiary structure (Fold)<sup>۶</sup> Quaternary structure<sup>۷</sup> Reverse micelle<sup>۸</sup> Critical Micelle Concentration (CMC)

اگرچه از مواد فعال سطحی کاتیونی به طور گسترده‌ای در فرایندهای جداسازی و خالص‌سازی پروتئین‌ها استفاده می‌شود اما اکثر مطالعات به عمل آمده در خصوص اثر ساختاری میسل‌های معکوس برمولکول‌های زیستی نانوکپسوله شده در سامانه‌های آنیونی، AOT، می‌باشد. بر این اساس در این تحقیق اثر نانو ساختار میسلی معکوس کاتیونی متشکل از ماده فعال سطحی ستیل تری متیل آمونیم برماید<sup>۴</sup> (CTAB) در حلال ایزواکتان، ۱-هگزانول بر ساختار پروتئین آلبومین سرم گاوی به عنوان پروتئین مدل مورد بررسی قرار می‌گیرد.

از طرف دیگر تعیین حالت آب در میسل معکوس از اهمیتی فراوانی برخوردار است. باگچی از لحاظ ترمودینامیکی، دینامیکی و ساختاری خواص آب پیرامون پروتئین و دی ان آ به تله افتاده در میسل‌های معکوس را مورد بررسی قرار داده است [۳۷]. او نشان داد که چگونه آب ممکن است یک نقش مهم در چگونگی حالت ساختاری مولکول‌های زیستی ایفا نماید. به عبارت دیگر آب موجود در سامانه میسلی معکوس ممکن است حالت‌های مختلفی داشته و به صورت‌های آب پیوندی با گروه رأس ماده فعال سطحی، آب توده، آب پیوندی با یون پوششی ماده فعال سطحی و آب مونومری ظاهر شود [۳۸]. بدیهی است که فقط آب توده در دسترس مولکول حل شونده قرار می‌گیرد و آب در سایر حالت‌ها همانند آب یخ زده بوده و افزایش درصد آن موجب متأثر شدن ساختار مولکول حل شونده شود. بنابراین در این تحقیق علاوه بر اثر ساختاری، با بکارگیری یک مدل چهار ناحیه‌ای و استفاده از الگوریتم بهینه‌سازی مارکوارت [۳۹] حالت‌های مختلف آب در میسل معکوس نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد.

## ۲- مواد و روش‌ها

پروتئین آلبومین سرم گاوی (با جرم مولکولی ۶۶ کیلودالتون،  $pI=4/7$ ) از شرکت سیگما خریداری شد. ستیل تری متیل آمونیوم برماید، ایزواکتان و ۱-هگزانول به ترتیب به عنوان ماده فعال سطحی، حلال و کمک حلال از شرکت مرک خریداری شد. سایر مواد شیمیایی از قبیل  $KCl$ ،  $NaOH$  و  $HCl$  نیز از سایر شرکت‌ها خریداری شد. در ادامه تحقیقات قبلی [۴۱، ۴۰]، برای تشکیل سامانه میسلی معکوس از حلال آلی ایزواکتان و کمک حلال ۱-هگزانول (با نسبت حجمی ۴ به ۱ حلال به کمک حلال) و ماده فعال سطحی با غلظت ۳۰ میلی

کردند [۲۲]. رهامان و همکاران اولین گروهی بودند که در سال ۱۹۸۸ موفق شدند با استفاده از سامانه‌های میسلی معکوس فرایند جداسازی پروتئین‌ها از محیط کشت را انجام دهند [۲۳]. از آن تاریخ تاکنون محققان توانسته‌اند با استفاده از این سامانه‌ها ترکیبات زیستی متفاوتی از جمله پروتئین‌های نو ترکیب [۲۴، ۲۵]، آنتی بیوتیک‌ها [۲۶] و مولکول‌های دی ان آ [۲۷] را جداسازی و خالص‌سازی نمایند. به طور کلی برهم‌کنش بین پروتئین و سطح میسل یک ویژگی برجسته برای تحت تأثیر قرار دادن ساختار اشاره شده پروتئین در میسل‌های معکوس محسوب می‌گردد و توسط محل قرار گرفتن پروتئین‌های کپسوله شده و سطح میسل کنترل می‌شود [۲۸]. از طرف دیگر تغییر ساختار پروتئین می‌تواند بر روی خواص آن اثرگذار باشد، بنابراین شناخت این موضوع در بسیاری از موارد، مانند انتقال پروتئین از بیرون بدن به داخل بدن می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد [۲۹].

اگرچه که تاکنون مطالعات متعددی در خصوص تعادلات فازی مولکول‌های زیستی در فرایند استخراج آن‌ها توسط سامانه‌های میسلی معکوس به عمل آمده است [۳۰-۳۲]، ولی مطالعات چندانی در خصوص تغییر صورت‌بندی<sup>۱</sup> این مولکول‌ها در طی این فرایند به عمل نیامده است. در سال ۱۹۹۸ شیوموری و همکاران اثر تغییر ساختار پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) استخراج شده در فرایند استخراج معکوس<sup>۲</sup> از محلول میسلی معکوس AOT توسط فاز فاز آبی حاوی نمک‌های ۵/۰ مولار  $NaCl$  و  $CaCl_2$  را مورد مطالعه قرار دادند [۳۳]. آن‌ها دریافتند که صورت‌بندی پروتئین در خلال این فرایند تغییر محسوسی نمی‌کند. همچنین، نائو و همکاران نیز با استفاده از طیف‌سنجی سیرکولاردیکرویزم<sup>۳</sup> ساختارهای دوم و سوم پروتئین‌های سیتوکرم سی، ریبونوکلئاز آ و لیزوزیم استخراج شده توسط سامانه میسلی معکوس AOT را مورد مطالعه قرار دادند [۲۸]. در تحقیق دیگری هبار و راگوارو با استفاده از طیف‌سنجی سیرکولاردیکرویزم پایداری ساختاری پروتئین آلبومین سرم گاوی حاصل از استخراج معکوس از سامانه میسلی معکوس AOT توسط فاز آبی حاوی نمک  $KCl$  را نشان دادند [۳۴]. علاوه بر این تاکنون تحقیقات دیگری نیز در خصوص تغییرات ساختاری سایر مولکول‌های زیستی نانوکپسوله شده در سامانه‌های میسلی معکوس به عمل آمده است [۳۵، ۳۶].

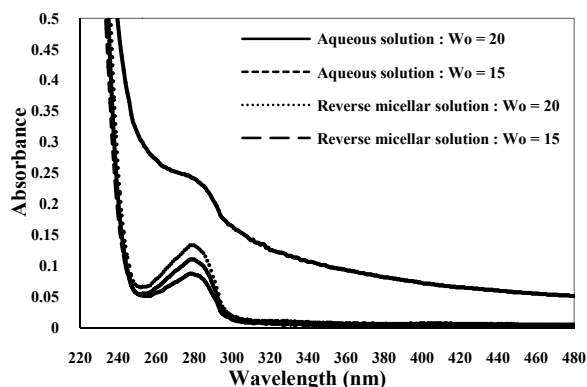
<sup>۱</sup> Conformation

<sup>۲</sup> Back-extraction

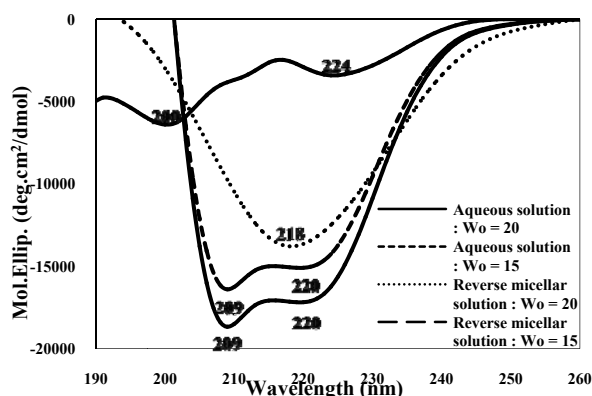
<sup>۳</sup> Circular Dichroism (CD)

<sup>۴</sup> Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

تری متیل آمونیوم برماید / ایزواکتان، ۱- هگزانول (با نسبت حجمی ۴ به ۱) با  $w_o$  های مختلف نشان می‌دهد.



شکل (۱) طیف‌های UV پروتئین آلبومین سرم گاوی در محلول‌های آبی و میسلی معکوس ۳۰ میلی‌مولار ستیل تری متیل آمونیوم برماید / ایزواکتان، ۱- هگزانول (با نسبت حجمی ۴ به ۱) با  $w_o$  های مختلف.



شکل (۲) طیف‌های سیرکولاردیکروویزم آلبومین سرم گاوی در محلول‌های آبی و میسلی معکوس ۳۰ میلی‌مولار ستیل تری متیل آمونیوم برماید / ایزواکتان، ۱- هگزانول (با نسبت حجمی ۴ به ۱) با  $w_o$  های مختلف.

ملاحظه می‌شود که در محلول‌های آبی همه‌ی طیف‌ها در طول موج‌های ۲۰۹ و ۲۲۰ نانومتر دارای یک افزایش منفی در مقدار قطبش‌پذیری هستند که عمق این مینیمم در طول موج ۲۰۹ نانومتر بیشتر است. در صورتی که در شرایط میسل معکوس یک افزایش منفی در ناحیه ۲۱۸ نانومتر مشاهده می‌شود [۲۸]. به عبارت دیگر ساختار دوم آلبومین سرم گاوی در محلول‌های میسلی معکوس نسبت به محلول‌های آبی تغییر کرده است. جدول ۱ نشان دهنده‌ی آنالیز ساختاری طیف سیرکولاردیکروویزم پروتئین نانو کپسوله شده به همراه آنالیز طیف سیرکولاردیکروویزم آن در محیط آبی شاهد با غلظت‌های یکسان و در حالت طبیعی (pH طبیعی) می‌باشد.

مولار در هر یک از  $w_o$  ها استفاده شد. همچنین غلظت پروتئین در فاز آبی نیز ۲۰ گرم بر لیتر انتخاب شد. برای نانوکپسوله سازی پروتئین در سامانه میسلی معکوس از روش تزریق فاز آبی حاوی پروتئین با مقدار مشخص شده‌ی  $w_o$  به درون فاز میسلی معکوس و از تزریق فاز آبی بدون پروتئین برای انتخاب نمونه‌های شاهد استفاده شده است. به طوری که برای  $w_o=20$  و  $w_o=15$  به ترتیب ۱۰۸ و ۸۱ میکرولیتر محلول آبی حاوی پروتئین به ۱۰ میلی‌لیتر محلول آلی تزریق می‌شود. علاوه بر این برای تسریع در فرایند فوق، هریک از نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه توسط دستگاه همزن لوله، به هم زده شد. لازم به ذکر است که این آزمایش‌ها در حالت طبیعی (pH طبیعی فاز آبی) صورت گرفته است. از طیف‌سنج UV مدل ۲۵۰ Analytic-Jena با سلول‌های کوارتز با طول مسیر ۱ سانتی‌متر برای اطمینان از حضور مولکول پروتئین در فاز میسلی معکوس و تعیین غلظت آن استفاده شد. همچنین به منظور بررسی اثر انحلال مولکول پروتئین در یک فاز آبی بسیار محدود، هسته آبی میسل‌های معکوس، خصوصیات ساختار دوم پروتئین آلبومین سرم گاوی از طیف‌سنج سیرکولاردیکروویزم مدل ۲۱۵ ساخت شرکت Aviv آمریکا استفاده شد. به منظور ثبت طیف‌ها، پهنای باند برابر با ۱ نانومتر، پهنای شکاف برابر با ۰/۰۴۲ میلی‌متر، دما برابر با ۲۵°C و محدوده‌ی طول موج برای نواحی فرابنفش-دور، بین ۱۹۰-۲۶۰ نانومتر تنظیم شد. علاوه بر این، برای تعیین وضعیت آب در این سامانه‌ها از طیف‌سنج FTIR، مدل VECTORS 22 شرکت Bruker آلمان با سلول مجهز به پنجره  $CaF_2$  و طول مسیر ۰/۰۵ میلی‌متر استفاده شد.

### ۳- نتایج و بحث

شکل ۱ نشان دهنده‌ی طیف جذب UV پروتئین در سامانه میسلی معکوس و فاز آبی شاهد می‌باشد. وجود اوج طیف جذب در محدوده طول موج ۲۷۸ تا ۲۷۹ نانومتر مبین حضور پروتئین در فاز مورد نظر می‌باشد. همان گونه که مشخص است منحنی جذب در سامانه میسلی معکوس از محور افقی فاصله گرفته است که این فاصله در اثر پراکنش نور بوده و متأثر از تراکم و لخته شدن مولکول‌های به تله افتاده در این سامانه‌ها می‌باشد [۴۲].

شکل ۲ طیف‌های سیرکولاردیکروویزم آلبومین سرم گاوی را در محلول‌های آبی و میسلی معکوس ۳۰ میلی‌مولار ستیل

## بررسی برهم کنش مهمان- میزبان در فرایند استخراج پروتئین آلبومین سرم گاوی با استفاده از ...

می باشد، در حالی که برای محلول های میسلی معکوس این طیف بازتر شده و به رندم کوئل نزدیک تر می شود.

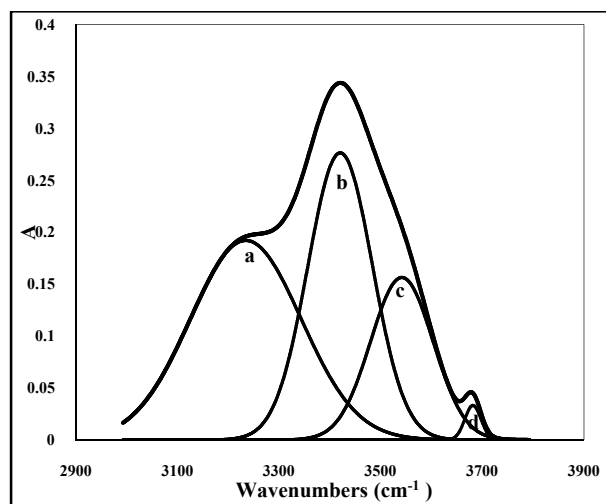
با توجه به نتایج می توان مشاهده نمود که درصد ساختار ماریچج آلفا در محلول های آبی بیشتر از دیگر ساختارهای دوم

جدول (۱) درصد ساختارهای دوم پروتئین سرم آلبومین گاوی در محلول های آبی و میسلی معکوس (طول موج های ۲۶۰-۱۹۰ nm).

محلول میسلی معکوس		محلول آبی		انواع ساختارهای دوم
$w_o=15$	$w_o=20$	$w_o=15$	$w_o=20$	
٪ ۱۲/۷	٪ ۲۵/۶	٪ ۵۱/۲	٪ ۵۸/۴	ماریچج آلفا
٪ ۲۳/۸	٪ ۱۳/۶	٪ ۴/۵	٪ ۳/۱	صفحات بتای موازی ناهمسو
٪ ۱۱/۹	٪ ۹/۸	٪ ۵/۸	٪ ۴/۷	صفحات بتای موازی
٪ ۱۷	٪ ۱۷/۴	٪ ۱۵/۳	٪ ۱۴/۲	چرخش بتا
٪ ۳۴/۶	٪ ۳۳/۶	٪ ۲۳/۲	٪ ۱۹/۶	رندم کوئل

همانگونه که توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است [۳۸]، با افزایش طیف جذب FTIR به منحنی های کوچکتر می توان حالت های مختلف آب را در سامانه های میسلی معکوس پیدا کرد. افزایش طیف جذب بدست آمده با بکارگیری یک مدل چهارناحیه ای و استفاده از الگوریتم بهینه سازی مارکوارت [۴۳] انجام شد و نتایج به صورت چهار منحنی گوسین در زیر منحنی جذب اصلی در شکل ۳ نشان داده شده است. طول موج نقاط حداکثری هر یک از این چهار منحنی بدست آمده به ترتیب عبارتند از ۳۲۳۷، ۳۴۱۶، ۳۵۳۶ و ۳۶۸۲ نانومتر. این طول موج ها به ترتیب به مد کششی هیدروکسیل آب پیوند یافته با گروه رأس ماده فعال سطحی، آب توده، آب پیوند یافته با یون پوششی برماید ماده فعال سطحی و آب مونومری نسبت داده می شوند [۳۹]. نسبت سطح هریک از منحنی های حاصل به سطح منحنی اصلی بیانگر کسر مولی آب در همان حالت است. بنابراین، درصد آب پیوند یافته با گروه رأس ماده فعال سطحی، آب پیوند یافته با یون پوششی ماده فعال سطحی، آب مونومری و آب توده به ترتیب عبارتند از: ۳۴٪/۲۴٪، ۱٪ و ۴۱٪. آزمایش فوق در  $w_o=15$  نیز تکرار گردید و نتایج در جدول ۲ آورده شد. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص است که از آب موجود در سامانه های میسلی معکوس، در هر حالت حداکثر ۴۱٪ آن در اختیار ماده حل شونده است. لذا علاوه بر محیط محدود داخلی میسل معکوس، عدم وجود آب کافی در این سامانه ها می تواند یکی از دلایل تراکم مولکول های زیستی نانوکپسوله شده در سامانه های فوق باشد. این موضوع قبلاً در شرایطی متفاوت از سامانه میسلی معکوس و مولکول زیستی نیز مشاهده شده است [۴۲].

به گونه ای که در محلول های آبی درصد ساختار ماریچج آلفا از دیگر ساختارهای دوم بیشتر است و این در شرایطی است که در فاز میسلی معکوس از درصد ساختار ماریچج آلفا کم شده و به دیگر ساختارها به ویژه به ساختار رندم کوئل اضافه شده است. علاوه بر این، مشاهده می شود که با کاهش  $w_o$  در فاز میسلی معکوس ساختار غالب پروتئین در فاز آبی، ماریچج آلفا، نیز به شدت کاهش یافته و سایر ساختارها شکل می گیرند. شکل شماره ۳ باند کششی گروه هیدروکسیل<sup>۲۴</sup> در سامانه میسلی معکوس بدون پروتئین را نشان می دهد.



شکل (۳) طیف FTIR باند کششی گروه هیدروکسیل آب در سامانه میسلی معکوس ستیل تری متیل آمونیوم برماید/ایزواکتان، ۱- هگزانول در  $w_o=20$ . سطوح a, b, c, d به ترتیب متناظر با آب پیوندی با گروه رأس ماده فعال سطحی، آب توده، آب پیوندی با یون پوششی ماده فعال سطحی و آب مونومری می باشند.

- [2] B. V. Kilikian<sup>1</sup>, M. R. Bastazin<sup>1</sup>, N. M. Minami<sup>1</sup>, E. M. R. Gonaves and A. P. Junior (2000), "Liquid-liquid extraction by reversed micelles in biotechnological processes", *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17, 1-12.

[۳] پرویز شهبازی، و ناصر ملکینیا (۱۳۶۲)، بیوشیمی عمومی، انتشارات دانشگاه تهران، تهران. ص ۲۲۵-۱۶۰.

- [4] T. F. Tadros (2005), *Applied Surfactants*, Wiley Publications, New York, USA.

- [5] S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna and T.M. Aminabhavi (2004), "Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery" *Journal of Controlled Release*, 100, 5-28.

- [6] N. Hagura, W. Widiyastuti, F. Iskandar and K. Okuyama (2010), "Characterization of silica-coated silver nanoparticles prepared by a reverse micelle and hydrolysis-condensation process", *Chemical Engineering Journal*, 156, 200-205.

- [7] A. B. Smetana, J. S. Wang, J. Boeckl, G. J. Brown and C. M. Wai (2007), "Fine-tuning size of gold nanoparticles by cooling during reverse micelle synthesis", *Langmuir*, 23, 10429-10432.

- [8] D. Han, H. Yang, C. Zhu and F. Wang (2008), "Controlled synthesis of CuO nanoparticles using Triton X-100-based water-in-oil reverse micelles", *Powder Technology*, 185, 286-290.

- [9] D. Zhang, X. Liu, X. Wang, X. Yang and L. Lu (2011), "Optical properties of monodispersed silver nanoparticles produced via reverse micelle microemulsion", *Physica B*, 406, 1389-1394.

- [10] I. Sharifi, H. Shokrollahi, M. M. Doroodmand and R. Safi (2012), "Magnetic and structural studies on CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles synthesized by co-precipitation, normal micelles and reverse micelles methods", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324, 1854-1861.

- [11] Y. Liu, X. Qiu, Z. Chen and W. Zhu (2002), "A new supported catalyst for methanol oxidation prepared by reverse micelles method", *Electrochemistry Communications*, 4, 550-553.

- [12] A. E. Giannakas, A. A. Leontiou, A. K. Ladavos and P. J. Pomonis (2006), "Characterization and catalytic investigation of NO + CO reaction on perovskites of the general formula La<sub>x</sub>M<sub>1-x</sub>FeO<sub>3</sub> (M = Sr and/or Ce) prepared via a reverse micelles microemulsion route", *Applied Catalysis A: General*, 309, 254-262.

جدول (۲) درصد حالت‌های مختلف آب در سامانه میسلی معکوس ستیل تری متیل آمونیوم برماید/ایزواکتان، ۱- هگزانول در  $w_o$  های مختلف.

محلول میسلی معکوس		انواع حالت‌های آب
$w_o=۱۵$	$w_o=۲۰$	
٪ ۳۳	٪ ۳۴	پیوند با گروه رأس
٪ ۴۰	٪ ۴۱	آب توده
٪ ۲۵	٪ ۲۴	پیوند با یون پوششی
٪ ۱	٪ ۱	آب مونومری

#### ۴- نتیجه‌گیری

با استفاده از طیف‌سنجی UV نشان داده شد که در شرایط انتخاب شده سامانه میسلی معکوس کاتیونی ستیل تری متیل آمونیوم برماید/ایزواکتان، ۱- هگزانول قادر به استخراج پروتئین از فاز آبی می‌باشد. همچنین در شکل ۱ مشاهده شد که نانوکپسوله‌سازی پروتئین منجر به تراکم مولکول‌های فوق و لخته شدن مولکول‌های به تله افتاده در این سامانه‌ها می‌شود. نتایج حاصل از طیف‌سنج سیرکولاردیکرویزم بر تراکم مولکول‌های پروتئین در سامانه‌های میسلی معکوس و در نتیجه تغییر ساختار دوم آن تأکید دارد به طوری که از ساختار دوم پروتئین، درصد مولکول‌های نامنظم و متراکم شده به نحو چشمگیری افزایش یافته و از طرف دیگر درصد ساختار مارپیچ آلفا که شکل رایج ساختار دوم پروتئین در شرایط نرمال است کاهش یافته است. طیف‌سنجی باند کششی گروه هیدروکسیل نشان داد که درصد زیادی از آب موجود در میسل معکوس به صورت آب پیوندی یا مونومری می‌باشد. این حالت‌های آب شبیه آب یخ زده است و محل مناسبی برای انحلال مولکول‌های نانوکپسوله شده نمی‌باشد. از این جهت می‌توان دو عامل فضای محدود درون سامانه میسلی معکوس و عدم وجود آب کافی را از جمله عوامل اصلی در تغییر ساختار مولکول‌های پروتئین در فرایند استخراج توسط سامانه‌های میسلی معکوس دانست.

#### مراجع

- [1] A. M. Eyal and E. Bressler (1993), "Industrial separation of carboxylic and amino acids by liquid membranes: Applicability, process considerations, and potential advantage", *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 287-295.

protease from whole fermentation broth using reversed micelles”, *Biotechnology Progress*, 4, 218-224.

- [24] M. J. Pires and J. M. S. Cabral (1993), “Liquid-liquid extraction of a recombinant protein with a reverse micelle phase”, *Biotechnology Progress*, 9(6), 647-650.
- [25] Y. Li, X. Li, H. Li, O. Lockridge and G. Wang (2007), “A novel method for purifying recombinant human host defense cathelicidin LL-37 by utilizing its inherent property of aggregation”, *Protein Expression and Purification*, 54(1), 157-165.
- [26] K. Michalska, G. Pajchel and S. Tyski (2009), “Different sample stacking strategies for the determination of ertapenem and its impurities by miscellar electrokinetic chromatography in pharmaceutical formulation”, *Journal of Chromatography A*, 1216(14), 2934-2942.
- [27] N. Streitner, C. Voß and E. Flaschel (2007), “Reverse micellar extraction systems for the purification of pharmaceutical grade plasmid DNA”, *Journal of Biotechnology*, 131(2), 188-196.
- [28] K. Naoe, K. Noda, M. Kawagoe and M. Imai (2004), “Higher order structure of proteins solubilized in AOT reverse micelles”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 38, 179-185.
- [29] M. Goto (2006), “Recent advances in protein extraction and chiral separation of biomolecules”, *Tsinghua Science & Technology*, 11(2), 194-201.
- [30] P. Bruno, M. Caselli, P. L. Luisi, M. Maestro and A. Traini (1990), “A simplified thermodynamic model for protein uptake by reverse micelles: theoretical and experimental results”, *Journal of Physical Chemistry*, 94(15), 5908-5917.
- [31] H. R. Rabie and J. H. Vera (1998), “A simple model for reverse micellar extraction of proteins”, *Separation Science and Technology*, 33(8), 1181-1193.
- [32] S. N. Ashrafizadeh and M. K. Khoshkbarchi (1998), “Modeling and experimental data for the reverse micellar extraction of proteins using a new surfactant”, *Separation Science and Technology*, 33(16), 2579-2595.
- [33] K. Shiomori, N. Ebuchi, Y. Kawano, R. Kuboi and I. Komasa (1998), “Extraction characteristic of bovine serum albumin using sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate reverse micelles”, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(6), 581-587.
- [13] B. A. Cheney, J. A. Lauterbach and J. G. Chen (2011), “Reverse micelles synthesis and characterization of supported Pt/Ni bimetallic catalysts on  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ”, *Applied Catalysis A: General*, 394, 41-47.
- [14] W. Q. Zhou, T. Y. Gu, Z. G. Su and G. H. Ma (2007), “Synthesis of macroporous poly (glycidyl methacrylate) microspheres by surfactant reverse micelles swelling method”, *European Polymer Journal*, 43, 4493-4502.
- [15] W. Zhou, J. Li, W. Wei, Zh. Su and G. Ma (2011), “Effect of solubilization of surfactant aggregates on pore structure in gigaporous polymeric particles”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384, 549-554.
- [16] C. C. Müller-Goymann (2004), “Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 343-356.
- [17] Y. Z. Du, L. Wang, H. Yuan and F. Q. Hu (2011), “Linoleic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles for intracellular drug delivery and reverse drug resistance of tumor cells”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 215-222.
- [18] S. Vrignaud, N. Anton, P. Gayet, J. P. Benoit and P. Saulnier (2011), “Reverse micelle-loaded lipid nanocarriers: A novel drug delivery system for the sustained release of doxorubicin hydrochloride”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1), 197-204.
- [19] A. Pandey and A. Pandey (2008), “Reverse micelles as suitable microreactor for increased biohydrogen production”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 273-278.
- [20] P. L. Luisi, F. J. Bonner A. Pelligrini, R. Wiget, and R. Wolf (1979), “Micellar solubilization of proteins in aprotic solvents and their spectroscopic characterization”, *Helvetica Chimica Acta*, 62, 740-753.
- [21] K. E. Goklen and T. A. Hatton (1985), “Protein extraction using reversed micelles”, *Biotechnology Progress*, 1, 69-74.
- [22] K. E. Goklen and T. A. Hatton (1987), “Liquid-liquid extraction of low molecular proteins by selective solubilization in reverse micelles”, *Separation Science and Technology*, 22, 831-841.
- [23] R. S. Rahaman, J. Y. Chee, J. M. S. Cabral and T. A. Hatton (1988), “Recovery of an alkaline

- ethylhexyl) phosphate in n-heptane”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 229, 298-302.
- [39] J. Zhao, S. Deng, J. Liu, C. Lin and O. Zheng (2007), “Fourier transform infrared investigation on the state of water in reverse water in reverse micelles of quaternary ammonium gemini surfactants C<sub>12</sub>-s-C<sub>12</sub>·2Br in n-heptane”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 311, 237-242.
- [40] A. Haghtalab and Sh. Osfour (2003), “Vacancy Solution Theory for Partitioning of Protein in Reverse Micellar Systems”, *Separation Science and Technology*, 38(3), 553-569.
- [41] A. Haghtalab and Sh. Osfour (2004), “A simple complexation model and the experimental data for protein extraction using reverse micellar systems”, *Iranian Journal of Biotechnology*, 2(2), 106-112.
- [42] Sh. Osfour, P. Stano and P. L. Luisi (2005), “Condensed DNA in lipid microcompartments”, *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 19929-19935.
- [43] Chandler, J. P. (1985) “MARQ 2.3 A.N.S.I. Standard Fortran”, Oklahoma State University, Stillwater Oklahoma.
- [34] H. Umesh Hebbar and K. S. M. S. Raghavarao (2007), “Extraction of bovine serum albumin using nanoparticulate reverse micelles”, *Process Biochemistry*, 42, 1602-1608.
- [35] X. Zhi, H. Yang, Z. Yuan and J. Shen (2010), “Kinetic analysis of hydrogen production using anaerobic bacteria in reverse micelles”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 2926-2930.
- [36] K. X. Zhu, X. H. Sun, Z. C. Chen, W. Peng, H. F. Qian and H. M. Zhou (2010), “Comparison of functional properties and secondary structures of defatted wheat germ proteins separated by reverse micelles and alkaline extraction and isoelectric precipitation”, *Food Chemistry*, 10, 124-131.
- [37] B. Bagchi (2012), “From anomalies in neat liquid to structure, dynamics and function in the biological world”, *Chemical Physics Letters*, 529, 1-9.
- [38] Q. Li, T. Li, J. Wu and N. Zhou (2000), “Comparative study on the structure of water in reverse micelles stabilized with sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate or sodium bis(2-



## Investigation of Guest-Host Interactions in Separation Process of Bovine Serum Albumin Protein Using Reverse Micellar System

Sh. Osfouri<sup>1,\*</sup>, H. Ferasatzadeh<sup>2</sup>

1. Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.
2. Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.

---

### ABSTRACT

In this study the effect of cationic reverse micelles on the structure of bovine serum albumin (BSA) was investigated. UV-vis spectra showed the encapsulation and compaction of BSA in reverse micelles as a peak around wavelength of 279 nm and scattered light, respectively. Circular Dichroism was used to find all types of the secondary structure of BSA in the reverse micelles and normal aqueous phase. The results showed that disorder and compact forms of the secondary structure of BSA, anti-parallel and random coil, were increased while the  $\alpha$ -helix form decreased significantly. Moreover, the FT-IR spectroscopy was carried out to determine the states of water in reverse micelles using deconvolution technique. Based on the data analysis, less than 50% of the water is available for protein solubilization. Generally, the results showed that both restricted volume and inadequate water in reverse micelles are two main factors for protein compaction in these systems.

---

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received: 29 Jun 2012  
Received in revised form: 30 Sep 2012  
Accepted: 14 Oct 2012

---

Key words:  
Reverse micelle  
Bio-separation  
Protein structure  
Water state  
BSA  
Circular Dichroism

---

All right reserved.

---

\* Corresponding author