

کاربرد پلیمرهای محلول در آب در زیست تکنولوژی

Application of Aqueous Polymer Systems in Biotechnology

علیرضا صلابت^۱، محمد تقی زعفرانی^۲، مصطفی کبیری بدر^۳

۱-۲- دانشگاه تبریز، دانشکده شیمی، ۳- دانشگاه سهند تبریز، دانشکده مهندسی شیمی

دریافت: ۷۳/۳/۲۶، پذیرش: ۷۳/۴/۲۶

چکیده

در این مقاله اثر عوامل مختلف بر تقسیم زیست مواد در سیستمهای دو فازی پلیمری مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد. این عوامل عبارت‌اند از: اندازه زیست مواد، نوع پلیمرهای تشکیل دهنده فاز، جرم مولکولی پلیمرهای انتخاب شده، ترکیب فازها، خواص مربوط به سطح زیست مواد، بار پروتئین و غلظت یونی سیستم، PH محلول، غلظت زیست مواد، دمای سیستم و ساختار اصلاح شده پلیمرهای تشکیل دهنده فاز.

واژه‌های کلیدی: استخراج زیست ماده، سیستمهای پلیمری دو فازی، تقسیم تمایلی، دکسترن، پلی اتیلن گلیکول

Key Words: extraction of biomaterial, two-phase polymer systems, affinity partitioning, dextran, polyethylene glycol

مقدمه

در سالهای اخیر استفاده از سیستمهای پلیمری دو فازی در جداسازی درشت مولکولها، پروتئینها، ویروسها، سلولها و زیست مواد دیگر به طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. این روش برای نخستین بار توسط آلبرتسون [۲، ۱] ابداع شد و توسط کولا [۵-۳] برای جداسازی زیست مواد در مقیاس صنعتی به طور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفت [۶]. اخیراً تحقیقات نظری نیز در این زمینه آغاز شده است [۹-۷].

تجربه نشان می‌دهد که دو پلیمر مانند پلی اتیلن گلیکول، PEG، و دکسترن، DX، یا یک پلیمر و نمکی مناسب در آب، سیستم دو فازی مایع - مایع سازگار با زیست مواد را تولید می‌کنند، به طوری که وقتی مخلوطی از زیست مولکولها (مانند محلولی از سلولهای تجزیه شده یا مواد تخمیر شده) به این سیستمها اضافه می‌شود، مولکولهای مختلف سازنده مخلوط به طور انتخابی بین دو فاز تقسیم می‌شوند. بدین ترتیب با

استفاده از این روش جداسازی طیف وسیعی از زیست مولکولها (پروتئینها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک، ویروسها و کلیه سلولها) ممکن می‌شود.

اخیراً برای جداسازی انتخابی و کامل زیست مواد از روش تقسیم تمایلی (affinity partitioning) به طور مؤثر استفاده شده است. در این روش از طریق اتصال لیگاندهای خاص به پلیمرها، مشتقات ویژه‌ای ساخته می‌شوند که در برابر بعضی از زیست مولکولها به طور انتخابی عمل می‌کنند. مثلاً با انتخاب مشتق ویژه‌ای از یک پلیمر، جداسازی نوع خاصی از پروتئین در مخلوطی از پروتئینها به طور کامل ممکن می‌شود.

مزئیتهای استفاده از سیستمهای پلیمری دو فازی را می‌توان به شرح زیر خلاصه کرد:

۱- با توجه به اینکه کشش بین سطحی (interfacial tension) بین

نسبت به یکی از پلیمرها غنی تر از دیگری است.

جدا شدن فازها در مخلوطهای سه تایی پلیمر - پلیمر - حلال با استفاده از مدل شبکه مایع (liquid lattice model) توسط فلوری به طور کیفی مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۱]. بر طبق این مدل، جدایی فازها به وجود برهم کنش بین قطعات دو پلیمر نسبت داده می شود و در آن برهم کنش زنجیرهای پلیمر با حلال اثر چندانی در جدایی فازها ندارد. در مورد دو پلیمر با جرم مولکولی و غلظت یکسان، جزء حجمی، ϕ_{1c} (volume fraction)، در نقطه بحرانی توسط رابطه زیر محاسبه می شود:

$$\phi_{1c} = 1 - \left[\frac{2}{(r_{23})} \right]$$

که در آن r طول مولکولهای پلیمر در واحد شبکه است (در مورد پلی اتیلن اکسید، PEO، r تقریباً با درجه پلیمر شدن برابر است). x_{23} نیز انرژی برهم کنش بین قطعه ای از زنجیر یکی از پلیمرها (سازنده ۲) و یک قطعه زنجیر دیگر (سازنده ۳) به واحد KT است. علامت مثبت x_{23} در معادله بالا، نشان دهنده وجود دافعه بین قطعات دو پلیمر است. با توجه به این معادله معلوم می شود که فرایند جدا شدن فازها موقعی اتفاق می افتد که غلظت پلیمر پایین است. چون r برای زنجیرهای پلیمری برابر ۱۰۰ یا بیشتر است. برای x_{23} در حدود ۰/۱، جزء حجمی حلال در نقطه بحرانی حداقل در حدود ۰/۸ است. با افزایش جرم مولکولی پلیمر و انرژی برهم کنش پلیمر - پلیمر، جزء حجمی بحرانی حلال بالا می رود.

عوامل مؤثر بر تقسیم زیست مولکولها در سیستمهای دو فازی آبی - پلیمری

از مطالعات تجربی روی سیستمهای دو فازی پلیمری که توسط آلبرتسون انجام شده است [۲، ۱۲]، معلوم می شود که تقسیم زیست مولکولها تابع پیچیده ای از عوامل مختلف نظیر غلظت پلیمرهای تشکیل دهنده فاز و نمکهای مختلف انتخاب شده برای تثبیت PH سیستم است. به طور کلی، تقسیم زیست مولکولها در سیستمهای دو فازی بر حسب ضریب تقسیم، K (partition coefficient)، به صورت زیر تعریف می شود:

$$K = [p]_1 / [p]_2$$

که در آن $[p]_1$ و $[p]_2$ به ترتیب غلظت زیست مولکول مورد نظر در فازهای ۱ و ۲ است. به طور تجربی معلوم شده است که ضریب تقسیم به عوامل مختلفی بستگی دارد و اثر آنها تقریباً مستقل از یکدیگر است. بنابراین، K را می توان به صورت

فازهای ایجاد شده در این نوع سیستمها در مقایسه با سیستمهای دو فازی آلی - آبی خیلی کم است، سازگاری سیستمهای آبی دو فازی پلیمر با زیست مواد به مراتب بیشتر از سیستمهای دو فازی آلی - آبی است.

۲ - استفاده از روش تقسیم تمایلی، دستیابی به محصولات خالص و ویژه را به طور موفقیت آمیز ممکن می کند.

۳ - ظرفیت زیاد سیستم، بدین معنی که جداسازی زیست مواد در حجم انبوه به آسانی قابل اجرا است.

۴ - امکان استفاده دوباره از سیستم دو فازی وجود دارد.

۵ - استفاده مستقیم از این سیستمها در مقیاس صنعتی امکان پذیر است.

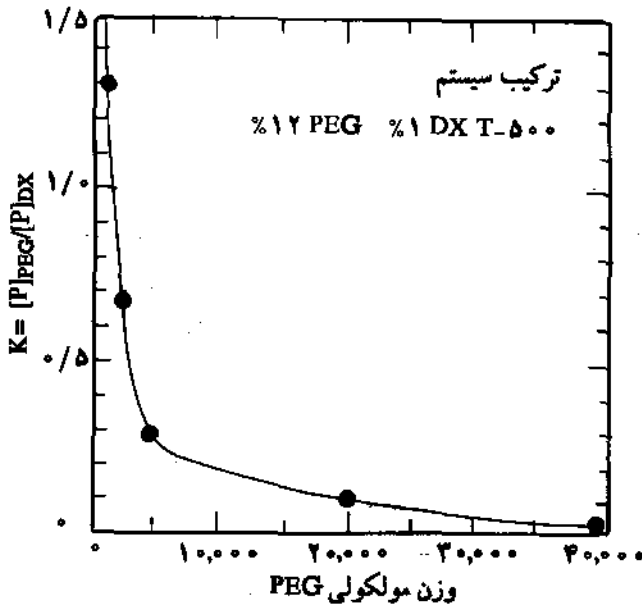
از پلیمرهایی که تا کنون مصرف فراوانی داشته اند می توان به DX و PEG اشاره کرد که در جداسازی بسیاری از زیست مواد به طور مؤثر به کار برده شده اند. همچنین، محلول آبی PEG و نمک در جداسازی انواع مختلف آنزیمها و پروتئینها مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر پلیمرهای یاد شده می توان به سیستمهای پلیمری شامل پلی وینیل پیرلیدون، PVP و پلی وینیل الکل، PVA، با PEG و DX اشاره کرد. تعداد قابل ملاحظه ای از سیستمهای آبی دو فازی پلیمری متشکل از مشتقات مختلف PEG و DX نیز در جداسازی زیست مواد به روش تقسیم تمایلی به کار برده شده اند [۱۰].

بحث

در این قسمت تشکیل سیستمهای پلیمری دو فازی و عوامل مؤثر بر تقسیم زیست مولکولها در سیستمهای دو فازی آبی - پلیمری مورد بحث قرار می گیرند.

تشکیل سیستمهای دو فازی پلیمری

از نظر ترمودینامیکی، دلایل مربوط به جدا شدن فازها را به صورت زیر می توان توضیح داد. تغییر آنتروپی و انرژی برهم کنش ناشی از اختلاط از عوامل تعیین کننده مهم در جدا شدن فازها به حساب می آیند. ولی، با توجه به اینکه غلظت مولی پلیمرها در این گونه محلولها ناچیز است (کمتر از ۰/۰۵ مولار)، افزایش آنتروپی مربوط به اختلاط دو پلیمر نسبتاً کم است. از سویی چون زنجیرهای پلیمر نسبت سطح بر مولکول به مراتب بیشتری در مقایسه با نسبت سطح بر مولکول در ترکیبات با جرم مولکولی کم دارند، بنابراین انرژی برهم کنش بین دو پلیمر، که معمولاً اثر نامساعد بر اختلاط دارد، در انرژی گیس اختلاط سیستم نقش غالب را پیدا می کند. این عوامل موجب می شوند که سیستمهای پلیمر - پلیمر - حلال، حتی تا غلظتهای کمتر از چند درصد پلیمر، دو فاز تشکیل دهند. در این سیستمها مقدار حلال زیاد است و هر یک از فازها



شکل ۲ - اثر جرم مولکولی متوسط پلی اتیلن گلیکول بر ضریب تقسیم پولولانس در سیستم %۱۲ پلی اتیلن گلیکول، %۱ دکسترون (۵۰۰) و ۱۰ mM سدیم سولفات با pH = ۷/۵ [۴].

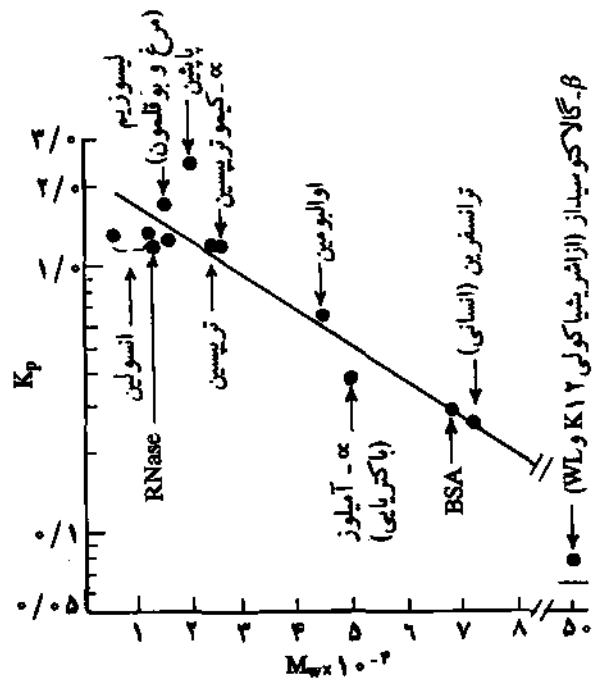
ذرات با اندازه خیلی بزرگ، مانند سلولها، معمولاً در یک فاز و حد واسط دو فاز یا به طور کامل در حد واسط دو فاز جمع می شوند.

اثر انتخاب پلیمرهای تشکیل دهنده فاز

بسیاری از پلیمرهای محلول در آب را می توان برای ایجاد سیستمهای دو فاز به کار برد. پلیمرهای مختلفی که می توانند چنین سیستمهایی را تشکیل دهند توسط آلبرتسون و مولینوکس گردآوری شده اند [۱۳]. انتخاب پلیمرها در ترکیب و موقعیت سیستم فاز و ماهیت برهم کنش پلیمر و پروتئین بسیار مؤثر است. در گذشته استفاده از سیستم PEG-DX برای استخراج خیلی متداول بوده است، ولی اخیراً سیستمهای دیگری نیز بدین منظور انتخاب شده و مورد بررسی قرار گرفته اند [۱۴، ۱۵].

اثر جرم مولکولی پلیمرهای تشکیل دهنده فاز

جرم مولکولی پلیمرهای تشکیل دهنده فاز هم از طریق تغییر نمودار فاز (با تاثیر گذاشتن بر ترکیب فازها) و هم در نتیجه تغییر تعداد برهم کنشهای پروتئین - پلیمر می تواند بر تقسیم زیست مولکولها مؤثر باشد. به طور کلی، افزایش جرم مولکولی پلیمر تشکیل دهنده یکی از



شکل ۱ - ارتباط بین K_p و جرم مولکولی برای تقسیم مواد در مخلوط %۷ دکسترون (۵۰۰) و %۴/۴ پلی اتیلن گلیکول (۸۰۰۰) و ۰/۱ M نمک [۲].

زیر نوشت:

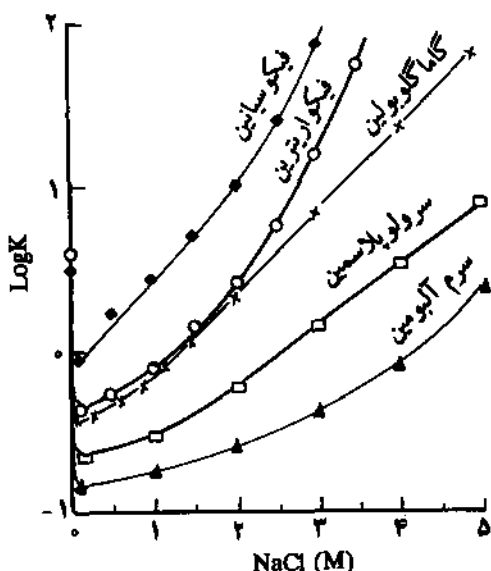
$$\ln K = \ln K_{\text{لیگاند}} + \ln K_{\text{نمک}} + \ln K_{\text{پلیمر}}$$

که در آن سهمهای مختلف مربوط به پلیمرهای تشکیل دهنده فاز، نمکها و لیگاندهای انتخابی و سرانجام سایر عوامل در تقسیم زیست مولکول، به ترتیب توسط پلیمر K_p ، لیگاند K_p و سایر K_p نشان داده شده است. اثر هر یک از عوامل مؤثر در تقسیم زیست مولکولها به ترتیب بحث می شود.

اثر اندازه زیست مولکول

مولکولهای کوچک مانند آمینواسیدها معمولاً به طور مساوی در فازها تقسیم می شوند. در مورد مولکولهای بزرگتر، تقسیم به صورت غیر یکسان انجام می گیرد. تجربه نشان می دهد که پروتئینهای بزرگ بسیار نامتقارنتر از پروتئینهای کوچک تقسیم می شوند (شکل ۱) و مولکولهای با جرم مولکولی خیلی بالا (مانند DNA) و ویروسها در غالب موارد به طور کامل وارد یکی از فازها می شوند. از سوی دیگر،

فازها موجب می شود تا زیست مولکولها بیشتر در فاز دیگر تقسیم شوند [۱۶]. به هر حال، با افزایش طول زنجیر پلیمر این اثر کاهش می یابد (شکل ۲).



شکل ۲ - اثر غلظت نمک بر روی مقادیر K پروتئینها. غلظت نمک بر حسب مول بر کیلوگرم تشکیل دهنده فاز ۷٪ دکسترن (۵۰۰)، ۴/۴٪ پلی اتیلن گلیکول (۸۰۰۰)، ۸ میلی پتاسیم برمیدو $pH = 6/7$ در دمای $20^{\circ}C$ است [۲].

اثر ترکیب فازها

نزدیک نقطه بحرانی، ترکیب فازهای در حال تعادل یکسان است و به همین جهت تقسیم نسبتاً متقارن است. ولی، دور از نقطه بحرانی هر فاز نسبت به یکی از پلیمرهای تشکیل دهنده فاز غنی تر می شود. این اثر موجب تقسیم نامتقارن زیست مولکولها بین دو فاز می گردد. کشش سطحی نیز با دور شدن از نقطه بحرانی بیشتر می شود.

اثر سطح زیست مولکولها

در بسیاری از زیست مولکولها خواص سطحی که در تماس با محلول است با خواص کلی زیست مولکول تفاوت دارد. به عنوان مثال، پروتئینهای کروی، که شامل آمینواسیدها با ماهیت قطبی یا غیرقطبی هستند، در ساختار خود تعداد زیادی گروههای غیرقطبی دارند که با محلول در تماس نیستند. معلوم شده است که تقسیم زیست مولکولها با خواص سطح مواد ارتباط دارد [۲] و برخی پژوهشگران از پدیده تقسیم به عنوان روشی برای اندازه گیری میزان آبگریزی نسبی سطح پروتئینهای مختلف استفاده کرده اند [۱۱].

اثر بار پروتئین و غلظت یونی سیستم

در بسیاری از پروتئینها و آنزیمها گروههای زیادی وجود دارند که در pHهای مختلف بار دارند یا می توانند باردار شوند. با توجه به اینکه روی پروتئین گروههای جانبی مختلف با مقادیر pK_a متفاوت وجود دارد، وقتی pH محلول از اسیدی به بازی تغییر می کند، بار پروتئین منفی تر می شود. pH ویژه ای که در آن مجموع بار پروتئین صفر می شود، pH ایزوالکتریک نام دارد و بدان معنی است که در هر pH به غیر از pH ایزوالکتریک پروتئین دارای یک بار خالص است.

تجربه نشان می دهد که اضافه کردن نمک با غلظتهای در حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی مول به سیستمهای دو فازی پلیمری باعث به وجود آمدن اختلاف پتانسیل الکتروستاتیک بین دو فاز می شود. این اختلاف پتانسیل، که از تمایل متفاوت یونهای مربوط به نمک به هر یک از فازها ناشی می شود، در حدود ۷ میلی ولت است [۱۷]. تقسیم زیست مولکولها بین دو فاز بشدت تحت تاثیر این اختلاف پتانسیل قرار می گیرد. تاثیر پذیری تقسیم زیست مولکولها بین دو فاز با افزایش این اختلاف پتانسیل، که خود به نوع نمک یا نمکها بستگی دارد، شدت می یابد. در قدرتهای یونی بالا ($> 1M$) از محلول نمک، تقسیم

پروتئینها وابستگی شدیدی به غلظت نمک نشان می دهد (شکل ۳).

چنانچه در مقدمه اشاره شد، ایجاد سیستمهای دو فازی با استفاده از پلیمر و نمک مناسب (مثلاً پلیمر PEG و نمک بافری فسفات) نیز امکان پذیر است. در این صورت به دلیل کم بودن گرانشی فازها، تشکیل دو فاز در مقایسه با سیستمهای تشکیل شده از پلیمر - پلیمر با سرعت بیشتری انجام می گیرد [۳].

اثر pH محلول

چنانچه قبلاً توضیح داده شد، تقسیم مولکولهای باردار در سیستمهای دو فازی حاوی نمکهای تثبیت کننده pH به بار خالص زیست مولکول بستگی دارد، که آن نیز تابعی از pH است. همچنین تغییرات pH موجب تغییراتی در ساختار پروتئین می شود که بر چگونگی تقسیم پروتئین اثر می گذارد. در pHهای خیلی زیاد، پروتئین ممکن است تخریب شود. پروتئینهای تخریب شده تقسیم متفاوتی نسبت به پروتئینهای اصلی دارند، چون سطح پروتئین تخریب شده به طور قابل توجهی بزرگتر از سطح پروتئین اولیه است و این سطح گسترش یافته آبگریزی به مراتب بیشتری دارد.

- 2 Albertsson P.A., *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, Wiley, 1986.
- 3 Kula M.R., Kroner K.H. and Hustedt H., *Adv. Biochem. Eng.*, **24**, 1982.
- 4 Kula M. R., *Compressive Biotechnology*, 2, pergamon press, N.Y., 1985.
- 5 Cordes A., Flossdorf J. and Kula M.R., *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 514, 1987.
- 6 Vernau J. and Kula M.R., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **12**, 4, 397-404, 1990.
- 7 Cabezas H. Jr., Kabiri-Badr M., and Szlag D.C., *Bioseparation*, **1**, 227-233, 1990.
- 8 Baskir J.N., Hatton T.A. and Suter U.W., *J. Phys. Chem.*, **93**, 969, 1989.
- 9 Cabezas H. Jr., Kabiri-Badr M., Snyder S.M. and Szlag D.C.; *Front Bioprocess 2, prooc*; Todd P., Sikdar S.K. and Bier M. (eds.); ACS, washington D.C., 1992.
- 10 Walter H., Brooks D.E. and Fisher D., *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems*, Academic Press, 1985.
- 11 Flory P.J., *Principles of Polymer Chemistry*, Cprnell Uni., Ithaca, 1979.
- 12 Albertsson P.A., *J. Chromatogr.*, **159**, 111, 1978.
- 13 Molyneaux P.; *Water Soluble Synthetic Polymers, Properties and Behavior*; **1**, CRC, Boca Raton, Fl, 1984.
- 14 Johansson G., Joelsson M., Olde B. and Shanhag V.B., *J. Chromatogr.*, **11**, 331, 1985.
- 15 Johansson G. and Joelsson M., *Appl. Biochem. Biotechnol*, **13**, 15, 1986.
- 16 Hustedt H., Kroner K.H., Stach W. and Kula M.R., *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1989, 1978.
- 17 Johansson G., *Acta Chem. Scand. B*, **28**, 873, 1974.
- 18 Johansson G. and shamb V.P., *J. Chormatogr.*, **63**, 284, 1984.
- 19 Johansson G., Hartman A. and Albertsson P.A., *Eur. J.Biochem.*, **33**, 379, 1973.

الر غلظت پروتئین (زیست مولکول)

اگر غلظت پروتئین پایین نگاه داشته شود (مقدار آن کمتر از غلظت پلیمرهای تشکیل دهنده فاز باشد) ،در این صورت غلظت پروتئین بر تقسیم آن تاثیر قابل توجهی نخواهد داشت. ولی در غلظتهای زیاد پروتئین ،این امکان وجود دارد که تقسیم پروتئین خواص سیستم دو فازی را به طور قابل ملاحظه‌ای تحت تاثیر قرار دهد. حتی در شرایطی که غلظت پروتئین خیلی زیاد است ،امکان تشکیل یک فاز جداگانه توسط آن وجود دارد.

الر دمای سیستم

دما بر تقسیم زیست مواد به طور غیرمستقیم اثر دارد ،به طوری که تغییر دما می تواند شکل منحنی نمودار فاز را تغییر دهد و از این طریق بر تقسیم پروتئینها مؤثر باشد. همچنین تغییرات دما می تواند سبب تغییر ساختار پروتئین یا تخریب آن شود و از این طریق بفرایند تقسیم اثر گذارد.

الر تغییر ساختار شیمیایی پلیمرهای تشکیل دهنده فاز

برای بهبود تقسیم تمایلی زیست مولکولها در یکی از فازها تحقیقات گسترده‌ای صورت گرفته است. تجربه نشان می دهد که وقتی به پلی اتیلن گلیکول عواملی نظیر زنجیرهای اسید چرب ،گروههای باردار و لیگاند های شیمیایی ویژه مانند رنگهای تری آزین با پیوند کوالانسی اتصال می یابند تقسیم مواد زیست شیمیایی به فاز غنی از پلی اتیلن گلیکول اصلاح شده افزایش می یابد [۱۸،۱۹]. باید توجه داشت که فقط درصدی جزئی از پلیمر اصلاح شده برای دستیابی به جداسازی بهینه در سیستم دو فازی کافی است.

نتیجه گیری

در این مقاله مزیت استفاده از سیستمهای پلیمری دو فازی در جداسازی زیست مواد و همچنین عوامل مؤثر بر تقسیم این مواد نظیر نوع پلیمرهای به کار رفته ،pH محلول و دمای سیستم مورد بررسی قرار گرفت و معلوم شد که با استفاده از روش تقسیم تمایلی می توان به محصولات خالص و ویژه دست یافت.

مراجع

- 1 Albertsson P.A., *Biochem. Biophys. Acta*, 103, 1965.