



УДК 541

Оптимизация процесса сорбции ДНК-азы и Цитохрома С из их смеси

Глазова Н.В., Новикова С.А.

Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 20.05.2011 г.

Аннотация

Новизна работа состоит в использовании макропористых сорбентов нового поколения. Специфичность этих сорбентов связана с технологией их производства и, как следствие, с их структурой. Научная значимость исследования состоит в изучении совместной сорбции дезоксирибонуклеазы и цитохрома С из одного раствора.

Ключевые слова: дезоксирибонуклеаза, цитохром С, теоретический анализ сорбции

The novelty of the work is to use new generations of macroporous resins. The specificity of these resins is due to the technology of their production and hence their structure. Scientific value of the investigation consists in researching combine sorption deoxyribonuclease and citichrom C from one solution.

Keyword: deoxyribonuclease, citichrom C, theoretical analysis of sorbtion

Введение

Основная задача препаративной хроматографии состоит в отыскании условий, при которых заданная степень разделения целевых веществ (на практике – дистанция между пиками или фронтами выходных объемов разделяемых компонентов) достигается при наименьших затратах (расходах реагентов и энергоносителей на всех стадиях процесса, включая подготовку исходного материала к сорбции и получение конечной товарной формы).

Для динамического процесса необходимо выбрать не только сорбент, но и высоту слоя сорбента, скорости подачи растворов, элюент и оптимальное зернение сорбента. Эти параметры необходимы для проведения кинетико-динамического анализа и масштабирования.

Эффективность динамического процесса сорбции связана с подбором таких условий, которые обеспечивают максимальное разделение целевых и примесных компонентов. Одним из параметров, определяющих эффективность работы хроматографической колонки, является критерий регулярности λ [2], который объединяет равновесные, кинетические и гидродинамические параметры сорбции.

Целью работы был подбор оптимальных условий проведения динамического процесса из модельной смеси ферментов, отличающихся физико-химическими свойствами.

Теория влияния скорости подвижной фазы на процесс сорбции ферментов из многокомпонентной смеси

Для достижения максимального разделения веществ на колонке необходимо подобрать оптимальные условия проведения динамического процесса: скорость пропускания раствора через колонку, высоту насыпного слоя сорбента и диаметр колонки. Анализ величин, входящих в уравнение для λ показывает, что в заданных условиях (при постоянных габаритах колонки D , H ; параметрах сорбции K_d , $\overline{D}_{эф}$ и диаметре частиц сорбента d_p) единственным параметром, сильно влияющим на величину λ , является скорость проведения процесса, которая в экспериментальных условиях может различаться на несколько порядков. Соответственно, возможно изменения режима от нерегулярного ($\lambda \ll 0,35$) до регулярного, близкого к равновесному ($\lambda \gg 0,35$), который считается наиболее благоприятным для хроматографического процесса. Однако, при сорбции медленнодиффундирующих веществ, таких как белки и ферменты, трудно добиться регулярности режима, и желательно провести эффективное разделение в неравновесных условиях. В связи с этим, нами был проведен теоретический анализ, позволяющий прогнозировать оптимальную скорость сорбционного процесса в нерегулярном режиме, при которой возможно максимальное разделение компонентов или изменение порядка их выхода [1].

Для расчетов использовались следующие соотношения:

$$\overline{V}_i = \frac{V_i - V_0}{V_i^{eq} - V_0} \quad (1)$$

$$V_0 = \varepsilon_0 \cdot V_{кол} \quad (2)$$

$$V_{кол} = H_0 \cdot F \quad (3)$$

$$(V_i^{eq} - V_0) = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \cdot K_d \cdot V_0, \quad (4)$$

где \overline{V}_i - относительный удерживаемый объем, m^3 ; V_0 - объем свободного пространства между зернами сорбента, m^3 ; F - площадь поперечного сечения колонки, m^2 ; H_0 - высота насыпного слоя, m ; $(V_i^{eq} - V_0)$ - исправленный равновесный удерживаемый объем раствора до проскока, m^3 .

Таким образом, из формулы (1) с учетом (2-4) следует, что для пары веществ разность удерживаемых объемов можно найти по обобщенной формуле:

$$\Delta V_{1,2} = V_1 - V_2 = \frac{1 - \varepsilon_0}{\varepsilon_0} \cdot V_0 \cdot (K_d \cdot \overline{V}_1 - K_d \cdot \overline{V}_2) \quad (5)$$

Используя ранее полученную зависимость относительно удерживаемого объема \overline{V} от λ для внутридиффузионной кинетики сорбции [3], а также зависимость для критериального параметра λ , формулу (5) можно преобразовать следующим образом:

$$\Delta V_{1,2} = \frac{\theta}{w_p} \cdot (Kd_1^2 \cdot \overline{D}_1 - Kd_2^2 \cdot \overline{D}_2) \quad (6)$$

где $\theta = 17,2 \cdot \frac{(1 - \varepsilon_0)^2}{\varepsilon_0} \cdot V_0 \cdot \frac{H_0}{d_p}$ - постоянная величина для заданной колонки; Kd_1 , Kd_2 - коэффициенты распределения для 1-ого и 2-ого компонентов; \overline{D}_1 , \overline{D}_2 - коэффициенты диффузии для 1-ого и 2-ого компонентов, m^2/c .

Из формулы (6) видно, что для определенной сорбционной системы при заданных условиях (параметры колонки V_0 , H_0 и диаметр частиц сорбента d_c) эффективность распределения будет определяться соотношениями кинетических ($\overline{D}_1, \overline{D}_2$) и равновесных (Kd_1, Kd_2) параметров для пары разделяемых компонентов, то есть выражением $(Kd_1^2 \cdot \overline{D}_1 - Kd_2^2 \cdot \overline{D}_2)$.

Теоретический анализ показал, что для определенной сорбционной системы при заданных условиях (параметры колонки V_0 , H_0 и диаметр частиц сорбента d_c) эффективность распределения будет определяться соотношениями кинетических ($\overline{D}_1, \overline{D}_2$) и равновесных (Kd_1, Kd_2) параметров для пары разделяемых компонентов, то есть выражением $(Kd_1^2 \cdot \overline{D}_1 - Kd_2^2 \cdot \overline{D}_2)$.

Соответственно, в зависимости от соотношения между этими параметрами, функция $\Delta V_{1,2} = f\left(\frac{1}{w_p}\right)$ будет иметь различный вид.

На рис. 1. представлена теоретическая зависимость разности удерживаемых объемов ($\Delta V_{1,2}$) от приведенной скорости ω , которая определяется как:

$$\omega = \frac{w_{eq}}{w_p},$$

где W_{eq} – скорость сорбции компонентов в равновесных условиях.

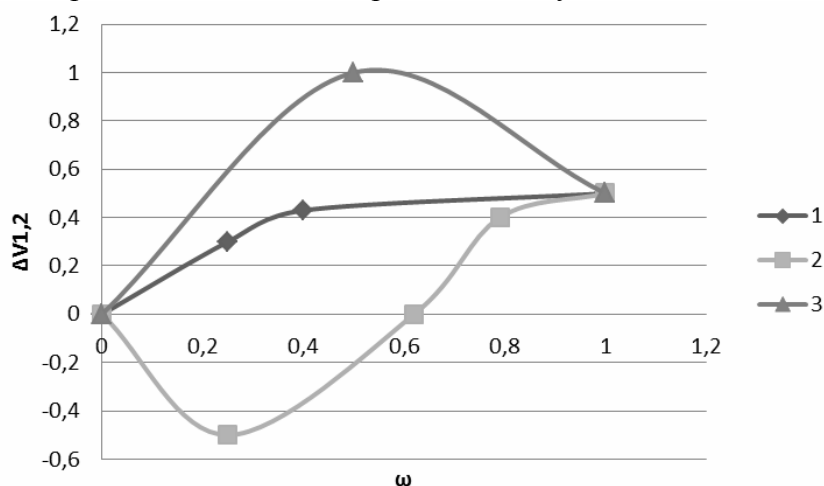


Рис. 1. Зависимость разности удерживаемых объемов от приведенной скорости при различных соотношениях между равновесно-кинетическими параметрами

- 1) $\frac{\overline{D}_1}{\overline{D}_2} \approx 1$; $\frac{Kd_1}{Kd_2} < 1$; $\frac{Kd_1^2 \cdot \overline{D}_1}{Kd_2^2 \cdot \overline{D}_2} < 1$
- 2) $\frac{\overline{D}_1}{\overline{D}_2} < 1$; $\frac{Kd_1}{Kd_2} > 1$; $\frac{Kd_1^2 \cdot \overline{D}_1}{Kd_2^2 \cdot \overline{D}_2} < 1$
- 3) $\frac{\overline{D}_1}{\overline{D}_2} > 1$; $\frac{Kd_1}{Kd_2} > 1$; $\frac{Kd_1^2 \cdot \overline{D}_1}{Kd_2^2 \cdot \overline{D}_2} > 1$

Рассмотрим возможные варианты режимов сорбции компонентов, различающихся равновесными и кинетическими параметрами.

1. Компоненты различаются только равновесными параметрами:

$$\frac{\bar{D}_1}{\bar{D}_2} \approx 1; \quad \frac{Kd_1}{Kd_2} < 1; \quad \frac{Kd_1^2 \cdot \bar{D}_1}{Kd_2^2 \cdot \bar{D}_2} < 1, \quad (7)$$

В этом случае знак и величина функции $\Delta V_{1,2} = f\left(\frac{1}{w_p}\right)$ будет определяться только разницей в коэффициентах распределения. Из формулы (7) видно, что степень распределения веществ будет возрастать с уменьшением скорости пропускания раствора при приближении к регулярному режиму (рис. 1 кривая 1); экстремума и инверсии порядка не наблюдается, так как первым из колонки всегда будет выходить компонент, коэффициент распределения которого меньше.

2. Кинетические и равновесные параметры сорбции компонентов связаны попарно следующими соотношениями:

$$\frac{\bar{D}_1}{\bar{D}_2} < 1; \quad \frac{Kd_1}{Kd_2} > 1; \quad \frac{Kd_1^2 \cdot \bar{D}_1}{Kd_2^2 \cdot \bar{D}_2} < 1, \quad (8)$$

В этом случае, при приближении к регулярному режиму, когда влияние кинетического фактора минимально, можно допустить, что разность удерживаемых объемов будет зависеть от разности в коэффициентах распределения, то есть от выражения $(Kd_1^2 - Kd_2^2)$. В случае нерегулярного режима влияние кинетического фактора преобладает. Тогда $\Delta V_{1,2} < 0$, если $(\bar{D}_1 - \bar{D}_2) < 0$.

Таким образом, при изменении режима сорбции путем варьирования скорости пропускания раствора через хроматографическую колонку, функция $\Delta V_{1,2} = f\left(\frac{1}{w_p}\right)$ меняет знак на противоположный. Это приводит к инверсии порядка выхода компонентов из хроматографической колонки. Компонент, идущий впереди другого при регулярном режиме, оказывается отстающим от него при переходе к нерегулярному режиму из-за различия в значениях коэффициентов диффузии, и наблюдается быстрый проскок первого компонента («силовой эффект»).

В области промежуточных скоростей (при $0 < \lambda < 0,35$) значения функции $\Delta V_{1,2}$ будут определяться произведениями $Kd^2 \cdot \bar{D}$, так как в этой области скоростей оба параметра оказывают существенное влияние на поведение системы.

Тогда абсолютное значение функции $\Delta V_{1,2}$ будет зависеть от значений приведенных ниже разностей равновесных параметров (в области регулярного режима), кинетических параметров (в области нерегулярного режима), либо их произведений (в области переходного режима):

$ Kd_1^2 - Kd_2^2 $	$ Kd_1^2 \cdot \bar{D}_1 - Kd_2^2 \cdot \bar{D}_2 $	$ \bar{D}_1 - \bar{D}_2 $
<i>область</i>	<i>переход от</i>	<i>область</i>
<i>регулярного режима с</i>	<i>нерегулярного к регулярному</i>	<i>нерегулярного режима с</i>
<i>преобладающим</i>	<i>режиму с влиянием</i>	<i>преобладающим</i>
<i>влиянием равновесных</i>	<i>равновесных и кинетических</i>	<i>влиянием кинетических</i>
<i>параметров</i>	<i>параметров</i>	<i>параметров</i>

При переходном режиме, когда учитывается влияние и равновесных, и кинетических факторов, возможен экстремум функции $\Delta V_{1,2}$ так как:

$$|Kd_1^2 \cdot \bar{D}_1 - Kd_2^2 \cdot \bar{D}_2| > |Kd_1^2 - Kd_2^2| \text{ и}$$

$$|Kd_1^2 \cdot \bar{D}_1 - Kd_2^2 \cdot \bar{D}_2| > |\bar{D}_1 - \bar{D}_2|$$

Таким образом, в рассмотренном варианте для пары компонентов, отличающимися равновесными и кинетическими параметрами сорбции в соответствии с (2), возможна как инверсия порядка выхода, так и оптимизация разделения компонентов в сорбционном процессе (рис. 1, кривая 2).

3. Кинетические и равновесные параметры сорбции компонентов связаны со следующими соотношениями:

$$\frac{\bar{D}_1}{\bar{D}_2} > 1; \quad \frac{Kd_1}{Kd_2} > 1; \quad \frac{Kd_1^2 \cdot \bar{D}_1}{Kd_2^2 \cdot \bar{D}_2} > 1$$

В этом случае $(\bar{D}_1 - \bar{D}_2) > 0$ и $(Kd_1^2 - Kd_2^2) > 0$, поэтому при переходе от регулярного к нерегулярному режиму знак функции $\Delta V_{1,2}$ не изменится; инверсии порядка выхода компонентов не наблюдается. Поскольку компоненты различаются и равновесными, и кинетическими параметрами, то аналогично случаю 2 возможна оптимизация разделения веществ при варьировании скорости пропускания раствора через хроматографическую колонку (рис. 1, кривая 3).

Экспериментальное подтверждение теоретически полученных зависимостей, в частности для случая инверсии порядка выхода компонентов (рис. 1, кривая 2) было показано в работе [3].

Эксперимент

Для поведения эксперимента был выбран сорбент Пьюролайт С-160 с фракцией 450-500 мкм. Набухший и прошедший кислотно-щелочную обработку сорбент загружали в лабораторную колонку. Сорбент тщательно отмывали дистиллированной водой до pH=5÷6. Затем через слой сорбента с постоянной скоростью пропускали модельный раствор фермента, разбавлением трис-буферным раствором с pH=2 для ДНК-азы и pH=4 для цитохрома С. Исходную концентрацию ферментов брали порядка 0,5 мг/мл, что было приближено к содержанию ферментов в экстракте. Кроме того, при этой концентрации не наблюдается ассоциации белковых молекул.

На выходе из колонки отбирались пробы объемом по 1 мл и анализировались на содержание цитохрома по методу Лоури.

На основании экспериментальных данных строили выходные кривые которые представлены на рис. 2.

Как видно из рис. 2 зависимость объема проскока раствора фермента от высоты слоя сорбента вначале имеет экспоненциальный вид, но при высоте сорбента 10 см и более кривая выравнивается. Это говорит о том, что объем проскока перестает зависеть от высоты сорбента и сорбция начинает проходить в регулярном режиме.

Для проведения дальнейших экспериментов была выбрана высота сорбента равная 10 см.

На рис. 3 отображены результаты исследований подбора оптимальной скорости пропускания рабочего раствора. Этот параметр оказывает наибольшее влияние на динамические процессы. Эксперименты проводились аналогично подбору высоты, только теперь менялась скорость пропускания растворов через колонку.

На рис. 3 видно, что при изменении рабочей скорости в пределах от 2 до 24 мл/час на кривых сорбции наблюдаются максимумы: 12мл/час для ДНК-азы и 13мл/час для цитохрома, которые соответствуют оптимальным скоростям проведения процесса сорбции. Скорости большие и меньшие оптимальных приводят к нерегулярности режима сорбции.

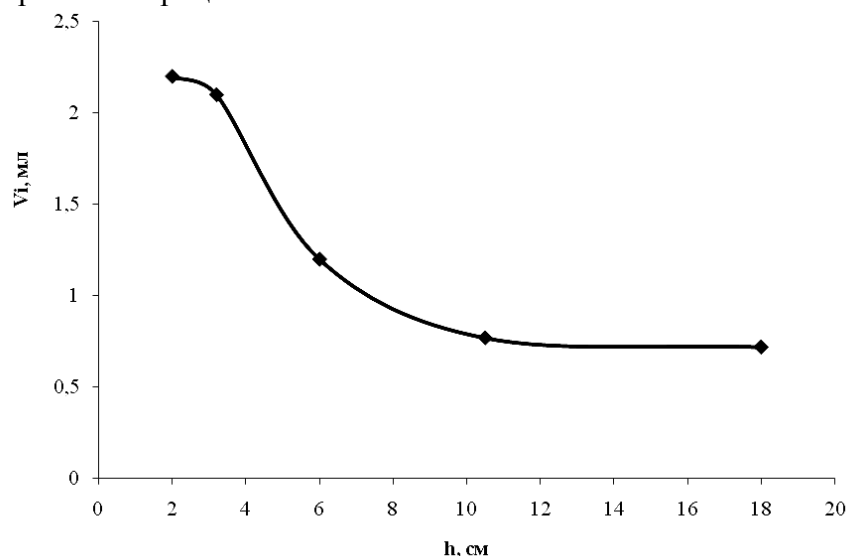


Рис. 2. Зависимость объема проскока раствора ДНК-азы и цитохрома С на сорбенте С-160 от высоты сорбента

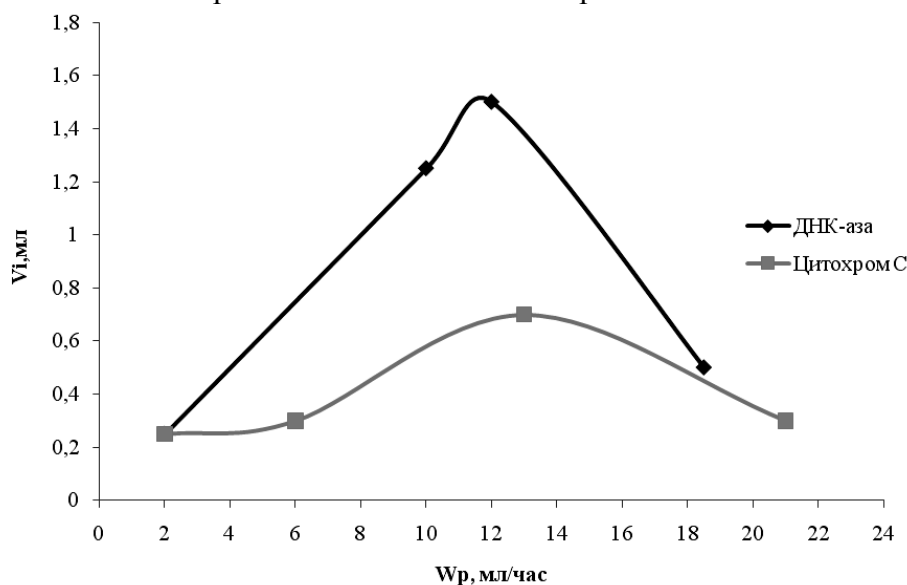


Рис. 3. Зависимость объема проскока раствора ДНК-азы и цитохрома С на сорбенте С-160 от рабочей скорости пропускания исходного раствора

Далее изучали влияние рабочей скорости на процесс сорбции ферментов из двухкомпонентной смеси цитохрома С и ДНК-азы.

Для проведения эксперимента была приготовлена смесь двух компонентов в трис-буферном растворе с $pH=2$. Приготовленный раствор пропускаться с различными скоростями через колонку заполненную предварительно обработанным сорбентом С-160, высотой слоя 10см.

В данном исследовании было получено экспериментальное подтверждение теоретических кривых 3 (рис. 1) в результате изучения процесса сорбции ДНК-азы и цитохрома С на сульфокатионите С-160.

С этой целью были рассчитаны соотношения между равновесными (Kd_1^2, Kd_2^2) и кинетическими ($\overline{D}_1, \overline{D}_2$) параметрами сорбции ферментов. Было показано, что при сорбции ДНК-азы и цитохрома С на сульфокатионите

С-160 выполняются неравенства, соответствующие кривой 3 (рис.1):

$$\frac{Kd_1}{Kd_2} = \frac{330}{140} > 1 \quad \frac{\overline{D}_{\phi 1}}{\overline{D}_{\phi 2}} = \frac{3 \cdot 10^{-12}}{7,8 \cdot 10^{-10}}$$

То есть, в данном случае возможно разделение компонентов при переходном режиме. Экспериментальные выходные кривые сорбции ДНК-азы и Цитохрома С на сорбенте С-160 представлены на рис. 4.

Из полученных выходных кривых находили значения удерживаемых объемов V_i , разность удерживаемых объемов ΔV и рассчитывали критериальный параметр λ (табл. 1).

Таблица 1. Значения критерия регулярности и удерживаемых объемов при различных скоростях пропускания раствора через хроматографическую колонку

Фермент	$W_1=0,56 \cdot 10^{-5}$ м/с		$W_2=3,4 \cdot 10^{-5}$ м/с		$W_3=5,6 \cdot 10^{-5}$ м/с	
	$V_i, \text{см}^3$	λ	$V_i, \text{см}^3$	λ	$V_i, \text{см}^3$	λ
Цитохром С	0.2	7.77	0.5	1,28	0,3	0,78
ДНК-аза	0.4	3.84	1.45	0,63	0,65	0,384
Разность удерживаемых объемов $\Delta V, \text{см}^3$	0.2		0.95		0.35	

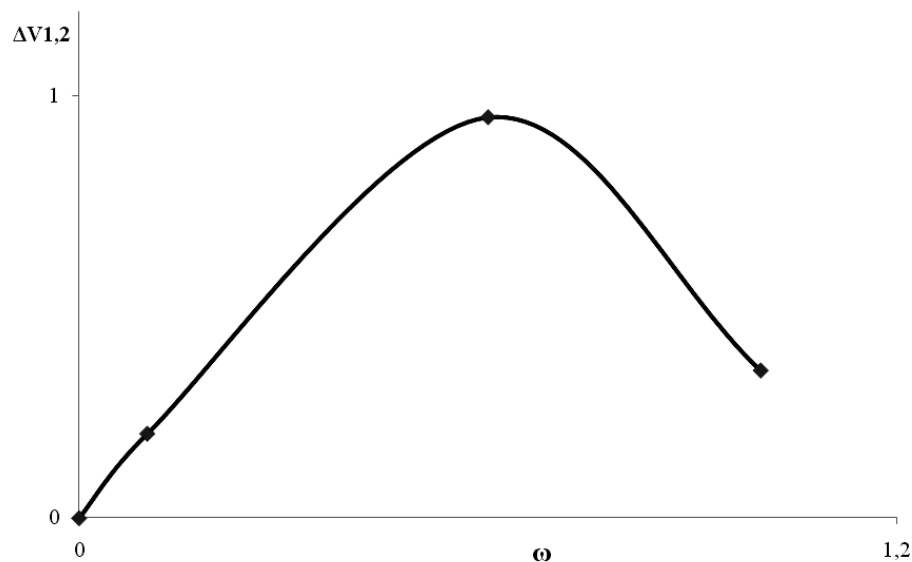


Рис. 4. Зависимость величины разности удерживаемых объемов от приведенной скорости в процессе сорбции Цитохрома С и ДНК-азы на макропористом сульфокатионите С-160

В соответствии с полученными экспериментальными данными была построена зависимость $\Delta V_{1,2}=f(\omega)$, которая имеет вид кривой с максимумом, что

соответствует теоретической кривой 3 (рис 1). За величину ω_{eq} принимали значение скорости при режиме, близкому к равновесному.

Анализ рассчитанных параметров, а также подтвержденные теоретические зависимости показывают, что для данной двухкомпонентной системы при переходе от нерегулярного режима к регулярному существует оптимальная область скоростей, при которой возможно достигнуть максимального разделения ферментов. С практической точки зрения это может использоваться для очистки ДНК-азы от менее высокомолекулярных примесей, а цитохрома С от более высокомолекулярных примесей.

Таким образом, скорость подвижной фазы является важным фактором, влияющим на эффективность динамического процесса сорбции. Варьированием данного параметра можно добиваться как максимального разделения компонентов, так и изменения их выхода из хроматографической колонки.

Список литературы

1. Глазова Н.В. Сорбционное разделение смесей БАВ в квазиравновесных и неравновесных условиях.// Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Биосепарация-96». – СПб, 1996. – С.11.
2. Елькин Г.Э. Концепция регулярности режима сорбции в теории и практике ионного обмена органических ионов.// Межвузовский сборник: Ионный обмен и ионометрия, 1990. – Вып. 7. – С. 3-15.
3. Кадолина И.Г. Разработка методов выделения и очистки бактериальных эндотоксинов.// Диссертация на соискание ученой степени канд.биол.наук. – СПб.: СПХФИ.- 1995.
4. Самсонов Г.В., Меленевский А.Т. Сорбционно-хроматографические методы физико-химической биотехнологии. – Л.: Наука, 1986.
5. Самсонов Г.В., Тростянская Е.Б., Елькин Г.Э. Ионный обмен. Сорбция органических веществ. – Л.: Наука, 1969. – 333 с.

Глазова Наталья Владимировна – к.х.н., доцент каф. биотехнологии, Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, тел. (812) 311-63-96

Новикова Светлана Александровна – аспирант Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии, г. Санкт-Петербург

Glasova Natalia V. – candidate of chemical sciences, docent of biotechnology, Chemical Pharmaceutical Academy, S-Petersburg, e-mail: novikova.svetlan@gmail.com

Novikova Svetlana A. – postgraduate on departure of biotechnology, Chemical Pharmaceutical Academy, S-Petersburg