

CÉSAR AUGUSTO SODRÉ DA SILVA

**PARTIÇÃO DO GLICOMACROPEPTÍDEO USANDO
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586p
2007

Silva, César Augusto Sodré da, 1981-

Partição do glicomacropéptideo usando sistemas aquosos bifásicos / César Augusto Sodré da Silva. – Viçosa, MG, 2007.

xiii, 57f. : il. ; 29cm.

Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Proteínas de soro de leite - Separação. 2. Glicomacropéptideo. 3. Sistemas aquosos bifásicos. 4. Equilíbrio líquido-líquido. 5. Fases e equilíbrio de sistemas. 6. Cromatografia de exclusão molecular. 7. Termodinâmica.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 660.2842

CÉSAR AUGUSTO SODRÉ DA SILVA

**PARTIÇÃO DO GLICOMACROPEPTÍDEO
USANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 27 de julho de 2007.

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Co-Orientador)

Prof. Edwin Elard García Rojas
(Co-Orientador)

Prof^ª. Maria do Carmo Hespagnol da Silva

Prof^ª. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof^ª. Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Orientadora)

*Dedico esta tese aos meus pais, Creuza e Nízio,
Ao meu irmão, Fernando,
E à minha namorada, Rejane,
Pessoas com as quais pude compreender
O significado da palavra Amor.*

“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão... que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas, que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim... e que valeu a pena”!

(Mário Quintana)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e a graça da saúde.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pelo Programa de Pós-Graduação.

Ao CNPq, pelos recursos financeiros e pela bolsa concedida.

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela orientação, confiança, incentivo e apoio durante todo o mestrado. Ressalto a minha admiração e agradeço pela oportunidade, que me fez crescer bastante tanto pessoal como profissionalmente.

Ao professor e co-orientador Luis Antônio Minim, pela orientação e incentivo oferecidos.

Ao mestre e amigo Edwin, pelos conselhos, prestatividade, incentivo e por me fazer entender o que representa a pesquisa científica.

À Rita, pela amizade e pela grande ajuda durante esse dois anos de mestrado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Processos de Separação (LPS): Bruno, Omar, Paulo Sérgio, Oscar, Luiz Fernando, Fabíola, Tininha, Rafael, Gisele, Roberta, Tarliane, Regina, Marcelo, Guilherme, Simone, Rosana e Daniela.

Aos amigos da turma de 2000 da Engenharia de Alimentos: Marlus, Bruno, Thiago, Vanessa, Igor, Ruither, Paulo Henrique, Roberta, Jackson, Sartori, Silvia e Wellington.

Aos alunos de MAT106 (2007-I), TAL475 (2006-II), TAL488 (2006-I) e TAL492 (2005-II), pelo aprendizado desenvolvido em cada dia de aula e pela oportunidade a mim concedida de fazer aquilo que mais gosto na vida.

Aos funcionários do DTA e do Departamento de Matemática.

E a todos os amigos que de alguma forma contribuíram neste trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO GERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
CAPÍTULO 1	4
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1.1 GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP)	4
1.2 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB)	7
1.2.1 Diagrama de fases do sistema aquoso bifásico.....	9
1.2.2 Variáveis que influenciam o sistema de duas fases aquosas	11
1.2.3 Constituintes das fases.....	14
1.3 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (CEM).....	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1 Reagentes e Equipamentos	18
2.2 Metodologia	19
2.2.1 Escolha dos sistemas de trabalho	19
2.2.2 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos	19
2.2.3 Medida do volume das fases.....	20
2.2.4 Cálculo do coeficiente de partição.....	20
2.2.5 Quantificação da proteína presente nas fases	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO 2 - Partitioning of glycomacropeptide in aqueous two-phase systems: influence of type of salt and temperature	28
ABSTRACT.....	28
INTRODUCTION.....	29

MATERIALS AND METHODS	30
Chemicals.....	30
Preparation of the aqueous two-phase systems.....	30
Determination of the protein partition coefficient (K_p)	31
Determination of thermodynamic functions associated with protein partitioning...	31
Protein quantification.....	32
RESULTS AND DISCUSSION	33
Effect of phase-forming salt on protein separation.....	33
Effect of the temperature on protein partitioning	36
CONCLUSIONS	41
REFERENCES	41
CAPÍTULO 3 - Partitioning features of glycomacropeptide in aqueous two-phase systems compound by polyethylene glycol-sodium citrate.....	44
ABSTRACT.....	44
INTRODUCTION.....	45
MATERIALS AND METHODS	46
Chemicals.....	46
Preparation of the aqueous two-phase systems.....	46
Determination of the protein partition coefficient (K_p)	47
Protein quantification.....	47
RESULTS AND DISCUSSION	48
Effect of the addition of sodium chloride and pH on protein partitioning.....	48
Influence of PEG molar mass, tie-lie length and temperature on the protein partitioning.....	51
CONCLUSIONS	55
REFERENCES	55

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	4
Figura 1. Diagrama de fases genérico para um sistema contendo PEG e sal, expresso em coordenadas retangulares.....	10
CAPÍTULO 2 - PARTITIONING OF GLYCOMACROPEPTIDE IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS: INFLUENCE OF TYPE OF SALT AND TEMPERATURE	28
Figure 1. Dependence of the salt concentration difference between the top and bottom phases for the GMP partition. Sodium citrate (▼), sodium sulfate (○), potassium phosphate (□), and lithium sulfate (●). Temperature: 298.15 K.....	35
Figure 2. Van't Hoff plots. Temperature effect of the partition equilibrium of GMP at different concentrations of PEG 14 mass % PEG1500 (▲), 16 mass % PEG1500 (□), and 18 mass % PEG1500 (◆). pH 8.0.....	37
Figure 3. Enthalpy change of the partition equilibrium of GMP at different concentrations of PEG 14 mass % PEG1500 (▲), 16 mass % PEG1500 (□), and 18 mass % PEG1500 (◆). pH 8.0.....	39
Figure 4. Entropy change of the partition equilibrium of GMP at different concentrations of PEG 14 mass % PEG1500 (▲), 16 mass % PEG1500 (□), and 18 mass % PEG1500 (◆). pH 8.0.....	39
Figure 5. Free energy change of the partition equilibrium of GMP at different concentrations of PEG: 14 mass % PEG1500 (▲), 16 mass % PEG1500 (□), and 18 mass % PEG1500 (◆). pH 8.0.....	40
CAPÍTULO 3 - PARTITIONING FEATURES OF GLYCOMACROPEPTIDE IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS COMPOUND BY POLYETHYLENE GLYCOL-SODIUM CITRATE.....	44
Figure 1. Influence of pH on GMP partitioning in PEG1500-sodium citrate ATPS at different NaCl concentrations. 0.0 M (▲), 0.1 M (□), and 0.5 M (◆). Temperature: 298.15 K.	50
Figure 2. Dependence of the GMP partition coefficients on the TLL for the PEG1500-sodium citrate ATPS at different temperatures of the system. 298.15 K (▲), 308.15 K (□), and 318.15 K (◆). pH 8.0.....	53

Figure 3. Dependence of the GMP partition coefficients on the TLL for the PEG2000-sodium citrate ATPS at different temperatures of the system. 298.15 K (▲), 308.15 K (□), and 318.15 K (◆). pH 8.0.....	54
Figure 4. Dependence of the GMP partition coefficients on the TLL for the PEG4000-sodium citrate ATPS at different temperatures of the system. 298.15 K (▲), 308.15 K (□), and 318.15 K (◆). pH 8.0.....	54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - PARTITIONING OF GLYCOMACROPEPTIDE IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS: INFLUENCE OF TYPE OF SALT AND TEMPERATURE	28
Table I. Theoretical recoveries in the top phase and partition coefficients for the GMP in each ATPS formed for PEG1500-salt, at different compositions of the assayed ATPS. Medium conditions: Temperature 298.15 K and pH 7.0.....	34
Table II. Adjusted parameters of the Van't Hoff equation.....	38
Table III. Thermodynamic parameters for the partitioning of GMP in ATPS, at different PEG concentrations.	38
CAPÍTULO 3 - PARTITIONING FEATURES OF GLYCOMACROPEPTIDE IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS COMPOUND BY POLYETHYLENE GLYCOL-SODIUM CITRATE.....	44
Table I. Theoretical recoveries in the top phase and partition coefficients for the GMP in each system formed for PEG1500 (14.00 mass %) and sodium citrate (14.89 mass %), at different pH values and NaCl concentration of the assayed ATPS. Medium condition: Temperature 298.15 K.....	50
Table II. Theoretical recoveries in the top phase and partition coefficients for the GMP in each ATPS formed for PEG1500-sodium citrate, at different compositions of the assayed ATPS. pH 8.0.....	52
Table III. Theoretical recoveries in the top phase and partition coefficients for the GMP in each ATPS formed for PEG2000-sodium citrate, at different compositions of the assayed ATPS. pH 8.0.....	52
Table IV. Theoretical recoveries in the top phase and partition coefficients for the GMP in each ATPS formed for PEG4000-sodium citrate, at different compositions of the assayed ATPS. pH 8.0.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

GMP - Glicomacropéptido;

SAB - Sistemas Aquosos Bifásicos;

CMP – Caseinomacropéptido;

CDP - Péptido Derivado da Caseína;

pI - Ponto Isoelétrico;

BSA - Albumina do Soro Bovino;

PEG – Polietilenoglicol;

K_p - Coeficiente de Partição

$[P]_{sup}$ - Concentração de equilíbrio da proteína particionada nas fase superior;

$[P]_{inf}$ - Concentração de equilíbrio da proteína particionada nas fase inferior;

TLL - Comprimento da Linha de Amarração;

$[\Delta PEG]$ - Diferença de concentração de PEG nas fases superior e inferior expressa em % em massa;

$[\Delta Sal]$ - Diferença de concentração de sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa;

PEO - Poli (óxido de etileno);

Li_2SO_4 - Sulfato de Lítio;

K_2HPO_4 - Fosfato de Potássio Dibásico;

KH_2PO_4 - Fosfato de Potássio Monobásico;

Na_2SO_4 - Sulfato de Sódio;

$C_6H_5Na_3O_7$ - Citrato de Sódio;

CEM - Cromatografia de Exclusão Molecular;

y - Recuperação Teórica da Proteína na Fase Superior (%);

V_S - Volume da fase superior;

V_I - Volume da fase inferior.

RESUMO

DA SILVA, César Augusto Sodré, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007. **Partição do glicomacropéptídeo usando sistemas aquosos bifásicos.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-orientadores: Luis Henrique Mendes da Silva, Luis Antônio Minim e Edwin Elard García Rojas.

Neste trabalho, estudou-se a aplicação da extração líquido-líquido para a separação do glicomacropéptídeo (GMP), utilizando sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polietileno glicol (PEG) e um sal inorgânico. Esta técnica pode ser usada para purificação de biocompostos em larga escala pela possibilidade de partição seletiva com altos rendimentos. O comportamento da partição do GMP em SAB foi verificado estudando a influência do tipo de sal (fosfato de potássio, citrato de sódio, sulfato de lítio e sulfato de sódio), massa molar do polímero (PEG1500, PEG2000 e PEG4000), adição de cloreto de sódio, valor de pH, concentração das fases e temperatura do sistema, a fim de se obter o melhor sistema para a separação da biomolécula. Nestes ensaios foi obtido o coeficiente de partição do GMP entre a fase aquosa superior (PEG) e a fase aquosa inferior (sal). Observou-se que a proteína migrou predominantemente para a fase superior, rica em PEG, onde os contaminantes não protéicos presentes na fase são o PEG e uma pequena quantidade de sal, que podem ser removidos da proteína alvo por meio de uma técnica cromatográfica, como a cromatografia de exclusão molecular (CEM). Entre os sistemas avaliados e em razão das características não-tóxicas e biodegradáveis do citrato, o sistema de extração que proporcionou as melhores condições foi o constituído por PEG1500 na concentração de 15 % em massa e citrato de sódio na concentração de 18,91 % em massa, em pH 8,0 e na temperatura de 318,15 K. Foram encontrados valores de coeficientes de partição para esse sistema acima de 30, sendo que aproximadamente 94,66 % do GMP foi recuperado na fase superior, o que indica uma boa separação. Em adição, parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° , ΔG°) em função da temperatura do sistema, foram calculados para o sistema formado por PEG1500 e citrato de sódio em diferentes concentrações de PEG. Os resultados exibiram diferenças termodinâmicas para a partição do GMP nos diversos sistemas avaliados. Este estudo mostrou claramente que o sucesso do uso do SAB para a recuperação e purificação inicial do GMP.

ABSTRACT

DA SILVA, César Augusto Sodré, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2007.
Partition of glycomacropeptide in aqueous two-phase systems. Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-advisers: Luis Henrique Mendes da Silva, Luis Antônio Minim and Edwin Elard García Rojas.

In this work, separation of glycomacropeptide (GMP) was studied using liquid-liquid extraction with aqueous two-phase systems (ATPS) composed by poly (ethylene glycol) (PEG) and an inorganic salt. This technique is an advisable purification process applied to large scale since it provides a selective partition with high yields. The partition behavior of GMP in ATPS was investigated studying the influence of the type of salt (potassium phosphate, sodium citrate, lithium sulfate or sodium sulfate), polymer molar mass (PEG1500, PEG2000, and PEG4000), phase concentrations (tie line length), sodium chloride addition, pH value, and temperature in the system in order to fit ratio of system to the separation. The partition coefficient was defined as the ratio of GMP concentration in the upper phase (PEG) and in the bottom phase (salt). It was observed that the protein partitioned almost in the top PEG-rich phase, where the prevalent non-protein contaminants are PEG and a little amount of the salt, which can easily be removed from the target protein by means of size exclusion chromatography technique. Among the systems analysed and due to citrates characteristics as a biodegradable and nontoxic compound, the extraction conditions which provided the best results were: PEG1500 with concentration of PEG of 15.00 mass % and sodium citrate with concentration of 18.91 mass %; at pH 8.0 and temperature of 318.15 K. In this system were found values of partition coefficient above 30 and approximately 94.66 % of GMP was recovered in the top phase, what demonstrates a good separation. In addition, thermodynamic parameters (ΔH° , ΔS° , ΔG°) as a function of temperature, were calculated for the system PEG1500-sodium citrate at different PEG concentrations and the results imply thermodynamic differences between partitioning of GMP in this system. This study clearly showed that ATPS can be successfully used for recovery and initial purification of GMP.

INTRODUÇÃO

O glicomacropéptido (GMP) é um dos peptídeos bioativos do soro, derivado da caseína e resultante da produção de queijos pela via da renina, sendo sua concentração estimada de 1,2 a 1,5 g/L. Entre as atividades biológicas e fisiológicas potenciais relacionadas ao GMP têm-se: contribuir para reduzir distúrbios estomacais ao possibilitar a regulação de respostas imunológicas bem como prevenir a azia por levar à diminuição da secreção gástrica; minorar o risco de ataques cardíacos ao induzir à inibição da agregação de plaquetas; diminuir o apetite ao estimular a liberação de colecistoquina, um hormônio que promove a sensação de saciedade; inibir a adesão de microrganismos em polímeros, sugerindo o uso do GMP como inibidor de placas bacterianas e de cáries dentárias (ABD EL-SALAM et al, 1996; THOMÄ-WORRINGER et al., 2006). Deve-se ressaltar também que a quantificação do GMP é, atualmente, o indicador mais recomendável para detecção da adulteração de leite pela adição de soro de queijo àquele e que sua estabilidade frente ao calor e sua solubilidade em condições ácidas sugerem múltiplos usos em sistemas alimentícios. Diferentes métodos para separação de GMP são descritos na literatura, sendo que a maior parte foi desenvolvida em escala de laboratório ou encontra-se protegida por patentes. Atualmente, dois métodos de separação do GMP do soro de queijo têm sido empregados, sendo que ambos utilizam a ultrafiltração, portanto com custo elevado e difíceis de escalar. Diante do seu elevado valor nutricional e funcional e do potencial de aplicações médicas e terapêuticas às quais o GMP se adequa, fica explicitado o interesse no desenvolvimento de novas técnicas para a recuperação e purificação de GMP do soro de queijo doce.

Nos últimos anos a extração líquido-líquido usando sistemas aquosos bifásicos (SAB) tem adquirido importância e crescente sucesso para a concentração, isolamento e separação de proteínas. Os SAB são constituídos por duas fases imiscíveis, que promovem a separação de biomoléculas, em condições amenas e em um ambiente adequado, de forma que sejam preservadas as suas principais características. A alta concentração de água, de 65 % a 90 % em massa, em tais sistemas favorece a estabilidade das proteínas durante a separação, quando comparados com sistemas de extração líquida tradicionais, compostos com solventes orgânicos. Apresentam também vantagens como rapidez da separação, baixo custo e possibilidade de aplicação em

grande escala. Têm sido importante ferramenta na partição e/ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, microorganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, membrana vesicular, enzimas, proteínas, ácidos nucléicos, vírus, metais, entre outros (ZASLAVSKY, 1995; ALBERTSSON, 1986).

No presente trabalho foram determinadas as melhores condições de separação do glicomacropéptídeo do soro usando sistemas aquosos bifásicos compostos por polímeros e sais, em função da massa molar do polímero e de sua concentração, do tipo de sal, da temperatura e do pH do sistema. O GMP foi quantificado com elevado grau de rendimento pelo processo de extração líquida com sistemas aquosos bifásicos.

OBJETIVO GERAL

- Analisar a viabilidade técnica do emprego da extração líquido-líquido com sistemas aquosos bifásicos, como uma alternativa à separação de glicomacropéptido do soro de queijo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as condições ótimas de separação do glicomacropéptido do soro usando sistemas aquosos bifásicos compostos por polímeros e sais.
- Estudar a influência do tipo de sal formador de sistema aquoso bifásico (citrato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de lítio e sulfato de sódio) e de sua concentração, em função da temperatura do sistema sobre a partição do glicomacropéptido utilizando sistema aquoso bifásico composto por PEG1500 e sal.
- Avaliar a influência da massa molar do polietilenoglicol (PEG1500, PEG2000 e PEG4000) e da concentração do PEG, em função do pH, comprimento da linha de amarração, temperatura e adição de NaCl sobre a partição do glicomacropéptido utilizando sistema aquoso bifásico composto por PEG e citrato de sódio.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP)

As proteínas do soro correspondem a 20 % das proteínas do leite sendo que a α -lactoalbumina, a β -lactoglobulina e o glicomacropéptido (GMP) representam cerca de 90 % do total das proteínas do soro. No soro são encontradas também a albumina de soro bovino, imunoglobulinas, protease-pancreáticas, lactoferrina, lactoperoxidase e outras enzimas (MORR e HÁ, 1993).

Quando o leite é submetido ao tratamento com a enzima quimosina durante a fabricação de queijo, a proteína κ -caseína é hidrolisada em dois peptídeos. A clivagem ocorre entre os aminoácidos 105 (Phe) e 106 (Met), liberando um peptídeo C-terminal solúvel de 6,8 kDa que é o GMP e um peptídeo insolúvel, denominado para- κ -caseína N-terminal de 12 kDa (DZIUBA e MINKIEWICZ, 1996; ABD EL-SALAM et al, 1996). A κ -caseína bovina apresenta duas variantes genéticas, sendo que a distinção entre elas está presente na região do GMP, conseqüentemente é de se esperar que o GMP contenha dois grupos de peptídeos, aqueles originados da κ -caseína A (GMPA) e aqueles da variante B (GMPB) que diferem em resíduos de aminoácidos treonina ou isoleucina na posição 136 e no resíduo de ácido aspártico ou alanina na posição 148. (TOLKACH e KULOZIK, 2005). O GMP está presente em quantidade significativa no soro de queijo feito por coagulação enzimática, estudos recentes estimam que o GMP constitua entre 15 a 25 % das proteínas do soro (ABD EL-SALAM et al, 1996).

O GMP também é referido como caseinomacropéptido (CMP), ou como um peptídeo derivado da caseína (CDP). O GMP consiste de uma cadeia de 64 aminoácidos, caracterizada pela ausência de aminoácidos aromáticos, conseqüentemente não apresentando absorção a 280 nm e podendo ser detectada somente entre 217 nm a 250 nm (ABD EL-SALAM et al, 1996). Por ter mais do que quatro resíduos de açúcar por molécula ele apresenta um caráter parcialmente hidrofílico, enquanto sua cadeia de peptídeos possui mais propriedades hidrofóbicas. É um peptídeo ácido com pI entre 4,0 e 5,0, altamente solúvel e estável ao calor (THOMÄ-WORRINGER et al., 2006). Praticamente quase que todo conteúdo de ácido siálico presente na caseína está presente no GMP, conseqüentemente a medida do teor

de desse ácido possibilita a detecção de soro de queijo adicionado fraudulentamente ao leite (DRACZ, 1996).

O interesse na purificação do GMP do soro de queijo tem sua origem tanto no seu elevado valor nutricional e funcional quanto no potencial de aplicações médico-terapêuticas às quais se adequa. Entre as aplicações potenciais do GMP está a redução da incidência de cáries dentárias. MALKOSKI et al. (2001) demonstraram que o GMP inibiu o crescimento dos patógenos orais *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*, responsáveis pelo desenvolvimento de cáries.

Além disso, estudos mostraram que o GMP tem efeito na secreção gástrica, promovendo a atividade de crescimento da bifidobactéria, e modificação do crescimento da bactéria do ácido láctico (ABD EL-SALAM et al., 1996). Estudos de sua habilidade para nutrir a microflora intestinal saudável apontam-no como um ótimo potencial para uso como prebiótico em alimentos (IDOTA et al., 1994). Estudos adicionais têm mostrado que o GMP reduz o apetite, fazendo dele um componente apropriado em produtos utilizados no controle de peso (YVON et al., 1994). TAKAHASHI et al. (1992) relataram a obtenção de um alimento hipoalergênico a base de GMP, com elevado valor nutritivo, facilmente absorvido e digerido e com ação anti-inflamatória. KELLEHER et al. (2003) verificaram que Macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), recém nascidos, alimentados com formulações lácteas fortificadas com GMP e α -lactoalbumina não apresentaram efeitos adversos nutricionais em relação ao crescimento dessas espécies. Além disso, houve um ganho na absorção de zinco, ferro e cobre em cada uma das fórmulas. Caso esses resultados sejam semelhantes em humanos, fórmulas industriais poderiam ser desenvolvidas com uma redução nas concentrações de minerais traços, protegendo dessa maneira os recém nascidos de efeitos adversos causados pelo consumo excessivo de minerais.

O GMP apresenta diferentes propriedades funcionais. As vantagens nutricionais do GMP conduzem para o desenvolvimento de alimentos infantis e resultam na incorporação do GMP em inúmeros modelos alimentícios. Algumas das propriedades inerentes deste peptídeo foram descritas por SMITHERS et al. (1991) e MARSHALL (1991), esses autores estudaram as propriedades funcionais de formação de espuma e gel em soluções aquosas de GMP como também os efeitos da incorporação destes em inúmeros alimentos, incluindo merengues, biscoitos e geléias de frutas. MARSHALL (1991) estudou com mais detalhes as propriedades de espumabilidade e estabilidade de espuma, além disso, ele encontrou uma forma atrativa de fortificar geléias de frutas com

GMP, obtendo dessa forma uma fonte protéica baixa em fenilalanina ideal para os indivíduos fenilcetonúricos.

Diferentes métodos para separação de GMP são descritos na literatura, sendo que a maior parte foi desenvolvida em escala de laboratório ou encontra-se protegida por patentes. Atualmente, dois métodos de separação do GMP do soro de queijo têm sido empregados, sendo que ambos utilizam a ultrafiltração.

O primeiro método descrito por KAWASAKI et al. (1996) é baseado na habilidade do GMP em estabelecer ligações não covalentes formando dessa maneira polímeros com massa molecular maiores do que 50 kDa em pH 7,0, com posterior dissociação em condições ácidas. A forma dissociada do GMP permeia através de uma membrana MWCO 20 kDa a 50 kDa em pH 3,5, enquanto a maioria das proteínas do soro como, por exemplo, a β -lactoglobulina, a α -lactoalbumina, a imunoglobina e albumina do soro bovino (BSA) são retidas nessa membrana. Depois o pH é ajustado para 7,0 e o filtrado contendo o GMP pode ser concentrado por meio da mesma membrana. Esta técnica garante uma boa separação do GMP de outras proteínas nativas do soro, mas devido à baixa taxa de permeabilidade do GMP, pelo menos duas etapas de diafiltração são necessárias para obter uma fração com alto grau de pureza e rendimento.

O segundo método descrito por MARTÍN-DIANA e FONTECHA (2002) utiliza da alta estabilidade térmica do GMP frente às demais proteínas do soro. De acordo com essa técnica, é feito um tratamento térmico no soro de queijo a 90 °C por 1 hora, deixando uma completa desnaturação e agregação das proteínas do soro. Essas proteínas desnaturadas são removidas por centrifugação a 5200 g a 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante contendo o GMP pode ser concentrado por ultrafiltração com uma membrana MWCO 10 kDa depois de ajustado o pH para 7,0. Este método garante um bom rendimento, mas as proteínas do soro perdem a sua funcionalidade devido a desnaturação

Para a quantificação do GMP os métodos propostos usam normalmente a cromatografia de fase reversa, a cromatografia de troca iônica e a cromatografia de exclusão molecular (MOLLÉ e LÉONIL, 2005; BRAMANTI et al., 2003; ABD EL-SALAM et al., 1996; DZIUBA e MINKIEWICZ, 1996; OLIEMAN e RIEL, 1989; BRANDÃO et al., 1988; HOOYDONK e OLIEMAN, 1982). Outro método utilizado é a eletroforese capilar (MIRALLES et al., 2001).

1.2 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB)

A extração com sistemas aquosos bifásicos permite isolar biomoléculas de misturas complexas e oferece vantagens, como curto tempo de processamento e fácil aumento de escala, além de usar um meio adequado para o trabalho com compostos de origem biológica. As fases da maior parte dos SAB são constituídas por 70 % a 90 % de água, o que favorece a estabilidade das biomoléculas durante a separação, quando se compara com sistemas tradicionais, compostos com solventes orgânicos. Recentes melhorias da técnica, com o emprego de novos SAB compostos por polímero e sal, polímero e polímero, permitem o seu uso em nível industrial (ALBERTSSON, 1986; BROOKS et al., 1994; ZASLAVSKY, 1995).

A utilização dos sistemas aquosos bifásicos na partição e purificação de materiais biológicos foi inicialmente proposta por Albertsson em meados da década de 50 (ALBERTSSON, 1986). Nestes casos, a extração através de SAB é adequada para substituir a extração convencional por solventes orgânicos, pois, pelo fato do solvente ser a água, são ambientalmente seguros e permitem a separação de partículas sensíveis à desnaturação em outros solventes (GUSTAFSSON et al, 1986). Desde então, as pesquisas nesta área têm-se aprofundado, tornando a utilização dos SAB importante ferramenta na partição e, ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, microorganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, membrana vesicular, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (HATTI-KAUL, 2001).

Os SAB são, então, sistemas formados por duas fases líquidas que se encontram em equilíbrio termodinâmico. As fases são regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração e composição. Mas como as duas fases dos SAB estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica está variando em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria entre as fases. Estas fases estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo para o valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004).

Em princípio, todos os tipos de sistemas aquosos bifásicos podem ser empregados na separação de biomoléculas. Mas, dentre os diferentes sistemas, o mais estudado é aquele composto por polietilenoglicol (PEG), dextrana e água. Os sistemas

PEG-dextrana e PEG-sais são normalmente usados também por se encontrarem disponíveis no mercado em grandes quantidades e não serem tóxicos, mas para uso em escala industrial, a dextrana apresenta custo muito alto. Os SAB formados por polímero-sal-água apresentam vantagens em relação aos compostos por polímero-polímero-água como baixo custo, menor viscosidade, maior viscosidade e menor tempo de separação de fases. Assim, os sistemas PEG-sal têm sido usados para a extração em larga escala. Estes sistemas são formados a temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal, a separação de fases é atingida mais rapidamente devido à menor densidade de uma das fases, o que facilita o uso de sistemas polímero-sal em aplicações industriais (SALABAT, 2001; GIRALDO-ZUÑIGA, 2000; HUSTED et al., 1985).

Materiais biológicos adicionados em SAB distribuem-se entre as duas fases, sem perda da atividade biológica. A relação entre as concentrações de certa biomolécula nas fases superior e inferior do SAB define o coeficiente de partição (K_p) em sistemas aquosos (ALBERTSSON, 1986), o K_p é definido como:

$$K_p = \frac{[P]_{sup}}{[P]_{inf}} \quad (1)$$

onde $[P]_{sup}$ e $[P]_{inf}$ são as concentrações de equilíbrio da proteína particionada nas fases ricas em PEG-(superior) e salina-(inferior), respectivamente. Entre as relações capazes de expressar o coeficiente de partição pode ser citada, por exemplo, segundo DIAMOND e HSU (1989) a expressão:

$$K_p = K_{amb} + K_{est} \quad (2)$$

em que K_{amb} e K_{est} representam, as contribuições dos fatores ambiental e de ordem estrutural respectivamente. Dentre os fatores ambientais estão consideradas propriedades do SAB, como tipo e concentração de sais, tipo, concentração e massa molar do polímero, pH, temperatura e ligantes específicos. ALBERTSSON (1986) propôs o seguinte modelo mais simples para o cálculo de K_p , desmembrando-o em:

$$\ln K_p = \ln K_{el.} + \ln K_{hidrof.} + \ln K_{hifil.} + \ln K_{conf.} + \ln K_{lig.} \quad (3)$$

em que os índices *el.*, *hidrof.*, *hifil.*, *conf.* e *lig.* referem-se às contribuições eletrostáticas, hidrofóbicas, hidrofílicas, de conformação e de interação com os ligantes, respectivamente.

A base da partição em SAB é a distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Esta distribuição é governada por um grande número de fatores, por exemplo: natureza e tamanho da partícula alvo; constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza do eletrólito e pH do sistema bifásico (ALBERTSSON, 1986). Por isto, a predição e a interpretação da partição de biopartículas em sistemas aquosos bifásicos é uma difícil tarefa, embora a manipulação das propriedades do sistema tornando predominante um determinado tipo de interação venha a ser uma forma de controlar a partição (HATTI-KAUL, 2001). Daí a importância de estudar diferentes SAB, ampliando e facilitando a utilização dos mesmos na extração líquido-líquido.

1.2.1 Diagrama de fases do sistema aquoso bifásico

Para a utilização de SAB é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isto são efetuados os diagramas de fases para os componentes, nos quais as composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas. A Figura 1 apresenta um exemplo de diagrama de fases mostrando a composição das fases em equilíbrio. Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença. A curva que divide a região em duas fases é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada de bifásica e a abaixo, monofásica.

As linhas são chamadas “tie-lines” ou linhas de amarração e qualquer ponto sobre ela representa um sistema com a mesma composição, porém com diferentes volumes das fases superior e inferior. Para se estudar a separação de fases em SAB, faz-se uso de uma medida numérica de referência para a composição das fases. O comprimento da linha de amarração, usualmente referido como TLL, é um valor empírico adequado para a utilização como tal medida. O valor TLL pode ser calculado, a partir das concentrações dos componentes nas fases, pela equação:

$$TLL = \sqrt{[\Delta PEG]^2 + [\Delta Sal]^2} \quad (4)$$

onde $[\Delta PEG]$ e $[\Delta Sal]$ correspondem a diferença de concentração de PEG e sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa, respectivamente. Outra característica importante dos diagramas de fases é a inclinação da linha de amarração, usualmente definido como STL. O STL é uma medida de como a composição das fases pode variar

com a alteração de uma propriedade físico-química, como a temperatura e a massa molar, por exemplo, (CARVALHO, 2004). O valor da inclinação pode ser calculado por:

$$STL = \frac{\Delta PEG}{\Delta Sal} \quad (5)$$

onde $[\Delta PEG]$ e $[\Delta Sal]$ foram definidas acima.

Outra particularidade de um diagrama de fases é o ponto crítico (Pc). O ponto crítico é aquele no qual as propriedades físico-químicas (composição e volume, dentre outras) das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986). Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico, menor é a diferença entre as fases, ou seja, no ponto crítico as composições e os volumes entre as fases teoricamente são iguais. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam drásticas mudanças, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

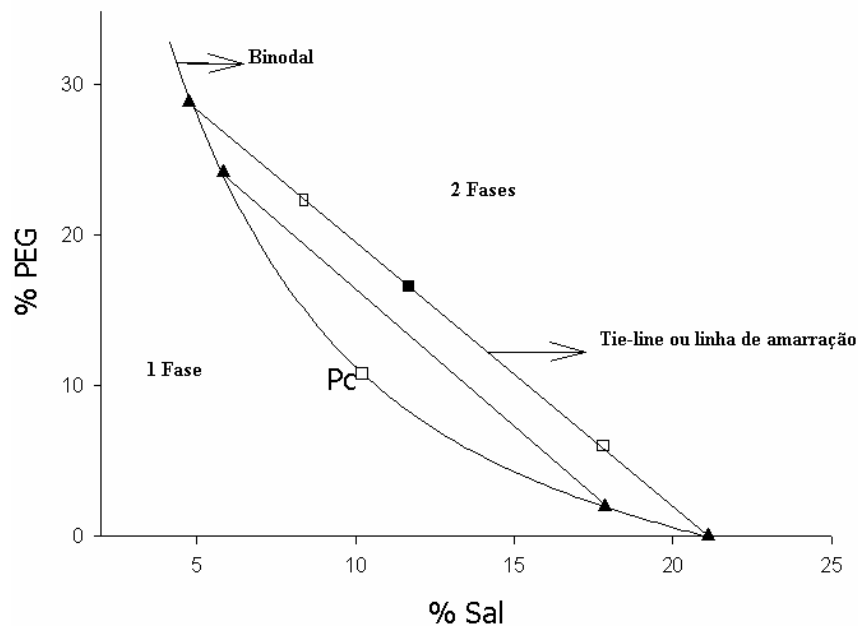


Figura 1. Diagrama de fases genérico para um sistema contendo PEG e sal, expresso em coordenadas retangulares.

1.2.2 Variáveis que influenciam o sistema aquoso bifásico

As variáveis que influenciam a partição de biomoléculas entre duas fases podem ser classificadas como variáveis inerentes ao próprio sistema (por exemplo: componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) ou à proteína alvo (por exemplo: hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar) (COSTA et al., 1998; COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; TUBIO et al., 2004). Os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos não são ainda entendidos por completo, sabe-se que o coeficiente de partição é resultante de forças de van der Waals, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (GÜNDÜZ e KORKMAZ, 2000).

1.2.2.1 Massa molar e concentração do polímero

Em geral, um aumento da massa molar do polímero do sistema de duas fases aquosas, para uma determinada composição de fases, diminui a partição de material biológico para a fase rica em polímero. Quanto maior for a massa molar do polímero, menor é o volume de solvente disponível, o que implica em uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição (ALBERTSSON, 1986). O efeito da massa molar dos polímeros por sua vez depende da massa molar da biomolécula a ser separada. No caso de proteínas, aquelas com massas molares maiores são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com pequena massa molar (ASENJO, 1990). O PEG é capaz de excluir (teoria do volume excluído) as proteínas sem desnaturação de acordo com o aumento de sua massa molar. O mesmo efeito não pode ser observado quando as moléculas menores de proteínas são utilizadas (SCHMIDT et al., 1994). A massa molar do polímero influencia na separação do biomaterial por alteração do diagrama de fase (isto é, por influenciar a composição das fases) e por mudança no número de interações polímero-proteína. Em geral, o aumento na massa molar de um dos polímeros (em sistemas polímero e polímero) levará a uma separação mais acentuada do material em outra fase. Entretanto, a magnitude desse efeito decresce com o aumento da cadeia do polímero (ALBERTSON, 1986;

FORCINITI e HALL, 1991). Com relação à concentração do polímero, tem sido demonstrado que o sistema de fases desloca-se em direção à região bifásica com o aumento da concentração do polímero. A viscosidade das fases também aumenta com o aumento na concentração do polímero e isto pode influenciar a partição da proteína alvo (ASENJO, 1990; ALBERTSSON, 1986).

1.2.2.2 Tipo de cátion e pH

O pH altera as cargas da superfície das proteínas e, conseqüentemente, o seu coeficiente de partição (LEHNINGER, 1976). Um exemplo clássico é a desnaturação de proteínas devido à redução de pH. A distribuição de proteínas desnaturadas em soluções líquidas é diferente daquela obtida em seu estado natural, por apresentarem área superficial significativamente maior que na forma nativa. Contudo, a influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases. Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas. Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só a maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica (ALBERTSSON, 1986). Como regra geral às proteínas carregadas mais negativamente (nos casos em que o pH é superior ao pI) tem maior afinidade pela fase superior que é rica em PEG.

1.2.2.3 Tipo e concentração de sal

A composição do sal é outra variável de suma importância na partição de todas as espécies de moléculas e partículas celulares (COSTA et al., 1998). Sais que possuem distribuição diferenciada entre as duas fases são importantes para o sistema, pois eles terão grande influência na diferença de potencial elétrico entre as fases. A adição de sais, mesmo que em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição de materiais eletricamente carregados. Embora os sais se distribuam quase que igualmente entre as fases, existem pequenas diferenças nos coeficientes de partição de diferentes

sais, o que significa que diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases, criando uma diferença de potencial elétrico entre as fases, que por sua vez direciona a partição de materiais biológicos carregados (SARUBBO, 2000). A adição de sais, tais como NaCl, em um sistema PEG e dextrana tende a diminuir o coeficiente de partição das proteínas carregadas negativamente e tende a aumentar o coeficiente de partição das proteínas carregadas positivamente. A magnitude do efeito aumenta na seguinte ordem: $\text{SO}_4^{2-} < \text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{I}^- < \text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$ (CASCONI et al., 1991; SCHMIDT et al., 1996).

1.2.2-4 Temperatura

A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração da estrutura da biomolécula e desnaturação (SARUBBO, 2000). Geralmente, para baixas temperaturas (menores que 20 °C) a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases, resultando no aumento do comprimento das linhas de amarração. Os sistemas de fases próximos do ponto crítico podem ser mais influenciados pela mudança de temperatura devido à sua instabilidade, quando a curva binodal é deslocada, podendo assim o sistema passar facilmente para a região monofásica (BAMBERGER et al., 1985; TJERNELD et al., 1990). O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero e polímero ou polímero e sal. Para o sistema PEG e dextrana, foi constatada que com o aumento da temperatura era necessária uma concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores à ambiente. Já para PEG e sal, ocorre justamente o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas à ambiente a separação das fases do sistema é facilitada. Foi observado também para o sistema PEG e sal, que o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e conseqüentemente ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior (FORCINITI e HALL, 1991; ZASLAVSKY, 1995). Alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (JOHANSSON et al., 1984); outros que não há relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (TJERNELD et al., 1985), demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

1.2.3 Constituintes das fases

Poli(etileno)glicol

O poli(etileno)glicol é um composto de grande importância para as áreas biomédicas e de biomateriais (LI, 2001). É produzido mundialmente em grandes quantidades e com massas molares variando de poucas centenas a milhares de Daltons, sendo obtido a partir da ligação de polímeros de oxietileno de massa molar menor que 40000 g mol^{-1} com metóxido de sódio ou hidróxido alcalino. A designação PEG é usada para compostos de baixa massa molar (abaixo 20000 g mol^{-1}) e a designação PEO poli(óxido de etileno) é restrito para compostos de altas massas molares (maiores que 20000 g mol^{-1}). Os PEGs com massas molares menores que 1000 g mol^{-1} são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas. Os de massas molares elevadas, acima de 1000 g mol^{-1} , são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. Os PEGs podem ser estocados à temperatura ambiente, embora a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada (RIBEIRO, 2001). A utilização do PEG é de grande interesse na biotecnologia principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Por serem compostos biodegradáveis e atóxicos, a descarga de PEG não é problemática para o meio ambiente. O PEG possui uma variedade de propriedades pertinentes para aplicações biomédicas, são elas: insolubilidade em água a elevadas temperaturas, forma complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água, agente precipitante de proteínas e ácidos nucléicos. Vale ressaltar que na indústria de alimentos, é regulamentada a sua utilização como veículo em adoçantes de mesa (Portaria nº 38, de 13 de janeiro de 1998) e em suplementos vitamínicos e ou minerais (Resolução - RDC nº 2, de 2 de janeiro de 2001).

Sais

O sulfato de lítio (Li_2SO_4) é um componente de interesse tecnológico com aplicações na detecção de radiação a laser, como elemento ótico de transmissão de imagens, na fabricação de cristais de alta resistência e na indústria farmacêutica. A solubilidade desse sal em água a $18 \text{ }^\circ\text{C}$ é de $35,64 \text{ g/100 mL}$. Apresenta altos valores de condutividade iônica, em elevadas temperaturas, o que torna possível a sua aplicação na armazenagem de energia e em sistemas de conversão. O sulfato de lítio pode ser

utilizado na recuperação de soluções com a adição de agentes precipitantes, como anti-solventes, em função da sua solubilidade invertida e da pequena variação da solubilidade com a temperatura. Esta técnica é uma alternativa para a recuperação deste sal visando substituir a precipitação por congelamento e evaporação (TABOADA, 2002).

O fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) é branco, higroscópico, solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Pode ser convertido em pirofosfato por ignição. A solução aquosa formada com este sal é ligeiramente alcalina (pH entre 8,7 e 9,3 quando em solução aquosa de concentração de 50 g/L). A solubilidade em água a 20 °C é igual a 160 g/100 mL. O fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) também possui a coloração branca e é granulado. Apresenta solubilidade em água igual a 22,2 g/100 mL a 20 °C. É insolúvel em álcool. Possui o pH entre 4,4 e 4,7 quando em solução aquosa de concentração de 50 g/L (SIGMA-ALDRICH, 2001).

O sulfato de sódio (Na_2SO_4) é um sal branco, cristalino, com solubilidade em água de 16,86 g/100 mL a 18 °C. Apresenta pH entre 5,2 e 9,2 a 20 °C quando em solução de 50 g/L de sulfato de sódio em água (MERCK, 2004). Possui larga aplicação industrial e em particular nas indústrias têxtil, de papel, detergente e vidro.

O citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7$) apresenta-se na forma de cristais brancos, inodoros e estáveis em ar. Apresenta solubilidade de 42,5 g/100 mL em água a 25 °C. Possui pH entre 7,5 e 9,5 a 20 °C quando em solução de 50 g/L de citrato trissódico dihidratado em água (MERCK, 2004).

1.3 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (CEM)

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada por meio da partição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel pela estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS et al, 1997).

Essa técnica pode ser aplicada em nível analítico ou preparativo e apresenta uma elevada resolução de picos de separação dos solutos durante a eluição. Na cromatografia líquida preparativa (escala comercial) procura-se não somente uma elevada resolução,

mas também a economia global do processo. O método clássico para aumentar a produtividade é o de maximizar o uso da coluna utilizando maiores volumes da amostra (RAHMS, 1993).

Para a purificação de proteínas são empregadas técnicas cromatográficas que não alteram as características físico-químicas dos compostos, como, por exemplo, exclusão molecular, troca iônica e hidrofobicidade. Na prática, a cromatografia de exclusão molecular (CEM) é normalmente utilizada no final do processo de purificação visando mudar a fase móvel por outra que possa ser volatilizada durante uma etapa posterior de liofilização ou de concentração bem como para remover as moléculas contaminantes de baixa massa molar como sais, polipropileno e detergentes não iônicos dentre outros (FALLOW, 1993).

A técnica de CEM foi introduzida em 1959, com o nome de filtração géllica. É um método cromatográfico capaz de separar os componentes de uma mistura com base nos seus tamanhos moleculares (LOUGH et al, 1995). A remoção de compostos de baixa massa molar é denominada de dessalinização mesmo que sais não estejam envolvidos no processo. A dessalinização é a aplicação da CEM mais difundida no processo de purificação de proteínas, sob condições que não desnaturem as proteínas. De acordo com GARCIA et al. (2000), a característica peculiar da CEM em relação aos outros tipos de cromatografia de partição é que as partículas que formam a fase estacionária no leito cromatográfico são constituídas por um gel sem carga. Este gel apresenta turgescência no mesmo solvente que atua como fase móvel através do leito. As matrizes utilizadas na CEM são macromoléculas que tem grande afinidade pelo solvente empregado. Estas matrizes apresentam intercruzamentos formando uma rede tridimensional, tornando-as insolúveis. Ao entrarem em contato com o líquido absorvem grandes quantidades do solvente devido à porosidade exibida.

Segundo COLLINS et al. (1997), os géis usados na CEM são, dentre outros, os géis de dextrana (como os Shephadexes) e os polímeros de anidroglicose, produzidos pela fermentação da sacarose por diferentes raças de *Leuconostoc mesenteroides*, artificialmente tratados com epícloridrina (agente de cruzamento). Como os poros das resinas são formados pelo intercruzamento das moléculas constituintes, quanto maior a percentagem do agente de cruzamento menor o tamanho do poro. O gel de shephadex apresenta elevado teor de hidroxilas, forte caráter hidrofílico, elevada turgescência em água ou soluções aquosas e são estáveis entre pH 2 e 11. O limite de exclusão de massa

molar localiza-se entre (0,7 e 800) kDa, mas são susceptíveis a ataques fúngicos quando hidratados.

Na CEM, a separação por grupos ocorre devido ao efeito estérico já que existe uma diferenciação no acesso ao volume do poro do gel para moléculas de tamanhos variados. Os compostos de baixas massas moleculares, como um sal, penetrarão no poro e serão retidos, caso o seu tamanho seja muito pequeno se comparado com o do poro da resina de filtração. Se as substâncias têm dimensões intermediárias somente penetrarão uma parte do volume de poro podendo reduzir a eficiência do processo. No caso em que o composto seja muito grande, como as proteínas, o mesmo será eluído através do volume intersticial da coluna (PHARMACIA BIOTECH, 1998).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Processos de Separação (LPS) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

2.1 Reagentes e Equipamentos

2.1.1 Reagentes

- Polietilenoglicol 1500 g mol⁻¹ (SYNTH, Brasil);
- Polietilenoglicol 2000 g mol⁻¹ (RIEDEL DE HAEN, Alemanha);
- Polietilenoglicol 4000 g mol⁻¹ (ISO FAR, Brasil);
- Fosfato de potássio (monobásico e dibásico, VETEC, Brasil);
- Sulfato de Sódio (ECIBRA, Brasil);
- Citrato de Sódio (SYNTH, Brasil);
- Sulfato de lítio (VETEC, Brasil);
- Cloreto de Sódio (DINÂMICA, Brasil);
- Glicomacropéptido (DAVISCO FOODS INTERNATIONAL, EUA).

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, não necessitando de maiores purificações.

2.1.2 Equipamentos

- Cromatógrafo AKTA *purifier* (10/100, PHARMACIA BIOTECH, Suécia);
- Agitador magnético (FISATON, Brasil);
- Balança analítica (M-310, DENVER INSTRUMENT, USA);
- Centrífuga (5804, EPPENDORF, Alemanha);
- Banho termostático (TE-184, TECNAL, Brasil);
- Vidrarias diversas.

2.2 Metodologia

2.2.1 Escolha dos sistemas de trabalho

Os dados de equilíbrio para os sistemas aquosos bifásicos utilizados neste trabalho se basearam nos diagramas de fases de sistemas compostos por polietilenoglicol, sal e água obtidos por CARVALHO (2004) e OLIVEIRA (2006). A partir dos sistemas bifásicos contendo PEG de massas molares (1500, 2000 e 4000 g mol⁻¹) e do sal formador da fase (fosfato de potássio, citrato de sódio, sulfato de lítio ou sulfato de sódio), foram obtidos os coeficientes de partição do GMP, nas temperaturas de (5, 25, 35 e 45) °C em função da concentração do PEG (10 % em massa a 18 % em massa) e do tipo de sal (9 % em massa a 17 % em massa). Os experimentos empregando a cromatografia de exclusão molecular partiram dos mesmos sistemas. As análises foram conduzidas em duplicata.

2.2.2 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos

Sistemas aquosos bifásicos foram preparados pela mistura de PEG (1500, 2000 ou 4000) e um sal (fosfato de potássio, citrato de sódio, sulfato de lítio ou sulfato de sódio). Para preparar os SAB, soluções estoques dos componentes das fases PEG1500, PEG2000 ou PEG4000 a 50 % em massa, fosfato de potássio, pH 7,0, a 40 % em massa, e água foram misturados até a obtenção da composição total do sistema. Para o preparo de uma solução estoque de fosfato de potássio, o ajuste do pH em 7,0 foi obtido adicionando fosfato de potássio monobásico e dibásico na proporção de 1:1,82, respectivamente. O sulfato de sódio, o sulfato de lítio e o citrato de sódio foram empregados pela pesagem de sua forma sólida. Os valores de pH das soluções salinas utilizadas de sulfato de sódio e sulfato de lítio eram próximos de 7,0, não necessitando de ajustes. O efeito do pH sobre o coeficiente de partição do GMP também foi estudado, para tanto, os SAB compostos por PEG1500 e citrato de sódio tiveram os valores de pH ajustados para 6,0, 7,0 e 8,0. Todos os sistemas foram preparados em tubos de centrífuga graduados. A massa total do sistema em cada tubo foi de 10 g, sendo que a quantidade de GMP adicionada ao sistema foi sempre 20 mg. O GMP foi o último componente a ser adicionado. Cada tubo foi agitado manualmente por, aproximadamente, 2 minutos e então centrifugado a 2000 g por 20 minutos, objetivando

acelerar a formação das fases. Os tubos foram colocados em um banho termostático de acordo com a temperatura de trabalho (5, 25, 35 e 45) °C, sendo mantidos em repouso durante 12 horas. Após esse tratamento, para determinar a concentração de proteína em cada uma das fases, amostras de ambas as fases foram coletadas usando uma pipeta para a fase superior e uma seringa com uma agulha longa e fina para a fase inferior. Os volumes foram determinados em tubos graduados. A massa molar do polímero, a concentração de sal e polímero, a temperatura e o pH foram ajustados para atingir o máximo coeficiente de partição do GMP usando um SAB.

O comprimento da linha de amarração, usualmente referido como TLL, foi calculado, a partir das concentrações dos componentes nas fases, pela equação (1):

$$TLL = \sqrt{[\Delta PEG]^2 + [\Delta Sal]^2} \quad (1)$$

em que $[\Delta PEG]$ e $[\Delta Sal]$ correspondem à diferença das concentrações de PEG e sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa, respectivamente. A inclinação da linha de amarração (STL) foi calculada por:

$$STL = \frac{\Delta PEG}{\Delta Sal} \quad (2)$$

2.2.3 Medida do volume das fases

Para cada tubo (ou célula de equilíbrio) foi obtida uma relação entre a massa de água e a altura da coluna de água atingida por esta massa. A partir da densidade da água, na temperatura ambiente, e da relação $\rho = \frac{m}{V}$, uma curva analítica para a determinação do volume das fases nos tubos foi construída em função do volume de água e da altura da coluna de água. Desta forma, antes da retirada das alíquotas das fases, a altura de cada fase foi medida com régua e o volume calculado. A altura da fase inferior foi lida a partir do fundo do tubo até a interface e a altura da fase superior foi calculada subtraindo a altura total (medida do fundo do tubo até a superfície da fase superior) da altura da fase inferior.

2.2.4 Cálculo do coeficiente de partição

O coeficiente de partição (K_p) foi definido como:

$$K_p = \frac{[P]_{\text{sup}}}{[P]_{\text{inf}}} \quad (3)$$

em que $[P]_{\text{sup}}$ e $[P]_{\text{inf}}$ são as concentrações de equilíbrio da proteína particionada nas fases ricas em PEG-(superior) e salina-(inferior), respectivamente. Este coeficiente é usado para quantificar o grau de separação alcançado em um processo de extração. Os experimentos foram feitos em duplicata e a média dos resultados foram os valores empregados neste trabalho. Para selecionar os SAB com a melhor capacidade de purificação do GMP, foi calculada uma recuperação teórica (y , %) na fase superior. A percentagem de recuperação de uma proteína depois de uma etapa de extração foi calculada por meio da seguinte equação:

$$y(\%) = \frac{100}{1 + (1/RK_p)} \quad (4)$$

em que $R = V_S/V_I$, V_S e V_I correspondem aos volumes das fases superior e inferior, respectivamente.

2.2.5 Quantificação da proteína presente nas fases

A quantificação da proteína na fase salina e polimérica foi realizada por meio da cromatografia de exclusão molecular (CEM), sendo conduzida por um cromatógrafo ÄKTA Purifier[®] 10/100 System (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia). O eluente foi monitorado pela absorção UV (UV-900) a 205 nm e a condutividade foi medida em uma célula de fluxo pH/C-900. As amostras foram injetadas por meio de um loop de 50 μl . A coluna de CEM usada foi uma Superdex[®] 75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech, Suécia). A fase móvel foi um tampão pH 6,0, sendo a vazão de $0,65 \text{ mLmin}^{-1}$. A pressão máxima no leito da coluna foi de 1,78 MPa. Devido a sua alta viscosidade, a fase polimérica foi diluída antes de ser injetada em 2:1 (água: amostra).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABD EL-SALAM, M. H., EL-SHIBINY, S., & BUCHHEIM, W. (1996). Characteristics and potential use of the casein macropeptide. **International Dairy Journal**, 6, 327–341.
- [2] ALBERTSSON, P. A . **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 1986. 346 p.
- [3] ASENJO, J.A. **Separation Processes in Biotechnology**. Marcell Dekker Inc., New York, 801p.,1990.

- [4] BAMBERGER, S.; BROOKS, D. E.; SHARP, K. A.; VAN ALSTINE, J. M.; WEBBER, T. J. "Preparation of phase system and measurement of their physicochemical properties. In: BROOKS, D. E.; WALTER, H.; FISCHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase system**. Academic Press, Orlando, 1985.
- [5] BRAMANTI, E.; SORTINO, C.; ONOR, M.; BENI, F.; RASPI, G.; Separation and determination of denatured α_{s1} -, α_{s2} -, β - and κ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes', and goats' milk, milk mixtures and cheeses; **J. Chrom. A**, 994; 59-74; 2003.
- [6] BRANDÃO, S.C.C., PARREIRA, J.F.M., ALVIM, T.C. Detecção da adição de soro de queijo ao leite. In: **Anais do X Congresso Nacional de Laticínios**, 1988. 41 p.
- [7] BROOKS D. E., SHARP K. A., FISHER D. **Theoretical Aspects of Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems**. IN: Protein Purification Process Engineering Ed. KUBEK, D. J., HARRISON, R. G. (Ed.), p. 89-114, 1994.
- [8] CARVALHO, C. **Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água**. Dissertação de Mestrado, UFV; Viçosa; 2004.
- [9] CASCONI, O.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Partitioning and Purification of thaumatin in aqueous two-phase system. **Enzyme Microbiology Technology**, v.13, p.629, 1991.
- [10] COLLINS C.H., BRAGA G.L., BONATO P.S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Editora UNICAMP, SP, 1997.
- [11] COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Xylanase Recovery. Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.629, p. 70-72, 1998.
- [12] COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. **Journal of chromatography B**, v. 743, p. 339-348, 2000.

- [13] DIAMOND, A. D., HSU, J. T. Fundamental studies of biomolecules partitioning in aqueous two-phase systems. **Biotech. Bioeng.** 34:1000–1014. 1989.
- [14] DRACZ, S. **Desenvolvimento de um novo método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite.** Viçosa, MG: UFV, 1996. 63 f. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- [15] DZIUBA, J., MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's k-casein. **Int. Dairy J.**, 6, 1017-1044, 1996
- [16] FALLOW, A., BOOTH, R.F.G, BELL, L.D.. **Laboratory Techniques in Biochemistry and molecular biology-applications of HPLC in biochemistry,** Elsevier, Amsterdam p.200,1993.
- [17] FORCINITI, D., HALL, C. K. Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in ATPS. **Fluid Phase Equilibria**, v.61, p.243-262, 1991.
- [18] GARCIA H., PAVEL O.P., GARCIA J C. **Curso Teorico Pratico Purificación de Biomoléculas.** Centro de Investigaciones Biomedicas (CIBIOMED), La Habana, 2000.
- [19] GIRALDO ZUÑIGA A.D. **Sistemas aquosos polietileno glicol-sal: Separação de α -lactoglobulina e β -lactoglobulina do soro de queijo e hidrodinâmica em um extrator Graesser.** Dissertação Mestrado, UFV; Viçosa; 2000.
- [20] GÜNDÜZ, U.; KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p.255-258, 2000.
- [21] GUSTAFSSON, A.; WENNERSTRUM, H.; TJERNELD, F. Aqueous polymer two-phase systems in biotechnology. **Fluid Phase Equilibria**, v. 29, p. 365-371, 1986.
- [22] HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase systems: A general overview. **Molecular Biotechnology**, v. 19, p. 269-277, 2001.

- [23] HOOYDONK, A.C.M., OLIEMAN, C. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 36:153-158, 1982.
- [24] HUSTED H.; CORNER K.H.; KULA, M.R. Partition in aqueous two-phase systems; *Trends Biotech*; 3; 139-144; 1985.
- [25] IDOTA, T., KAWAKAMI, H., NAKAJIMA, I. Bifidobacterium growth promoting activity effect on N-acetylneuraminic acid containing substances. *Biosci. Biotech. Biochem*, 58:1720-1722, 1994.
- [26] JOHANSSON, G.; ANDERSON, M.; AKERLUND, H-E. Counter distribution of yeast enzymes with polymer-bound triazine dye affinity ligands. *Journal of Chromatography*, v.289, p.483-493, 1984.
- [27] KAWASAKI, Y., ISODA, H., TANIMOTO, M., DOSAKO, S. & AHITO, K. (1992). Inhibition by lactoferrin and κ -casein glycopeptide of binding of cholera toxin to its receptor. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 195-198.
- [28] KELLEHER, S.L.; CHATTERTON, D.; NIELSEN, K.; & LONNERDAL, B. (2003). Glycomacropptide and α -lactoalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status infant rhesus monkeys. *Am. J. Clin. Nutr.* , 77, 1261-1268.
- [29] LEHNINGER, A. L. *Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blucher. 1976. p.126-145.
- [30] LI, J. Synthesis of polyethyleneglycols (PEGs): Derivatives and applications in biomaterials. *BME*, 430, 2001.
- [31] LOUGH, W.J., WAINER, I.W.(Eds). **Chromatography : Fundamental Principles and Practice**, London, p. 276, 1996.
- [32] MALKOSKI, M.; DASHPER, S. G.; O'BRIEN-SIMPSON, N. M.; TALBO, G. H.; MACRIS, M.; CROSS, K. J.; & REYNOLDS, E. C.(2001). Kappacin, a Novel Antibacterial Peptide from Bovine Milk. *American Society for Microbiology*, 45, 8, 2309-2315.

- [33] MARSHALL, S. C. (1991). Casein macropeptide from whey. A new product opportunity. **Food Res. Quar.**, 51, 8691.
- [34] MARTIN-DIANA, A.,B., FONTECHA, M.J.F.J. Isolation and characterisation of caseinmacropeptide from bovine, ovine, and caprine chesse whey. **Europ. Food Res. Techn.**, 214, 282-286, 2002
- [35] MERCK. Disponível em: <http://chemdat.merck.de>, abril, 2005.
- [36] MIRALLES, B., ROTHBAUER, V., MANSO, M.A., AMIGO, L., KRAUSE, I., RAMOS, M. Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-k-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. **J. Chrom. A.**, 915, 225-230, 2001
- [37] MOLÉ, D., LÉONIL, J. Quantitative determination of bovine k-casein macropeptide in dairy products by liquid chromatography/eletrospray coupled to mass spectrometry. **Int. Dairy J.**, 15, 419-428, 2005
- [38] MORR, C., HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Sci. Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- [39] OLIEMAN, C., RIEL, J.A.M. van. Detection of rennet whey solids in skin milk and buttermilk powder with reversed-phase HPLC. Neth. **Milk Dairy J.**, 43:171-184, 1989.
- [40] OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA-JUNIOR, A. Partition behavior and partial purification of hexoquinase in aqueous two-phase polyethylene glycol/citrate systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105-108, p. 787-797, 2003.
- [41] OLIVEIRA, L. A.; SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; LIMA-FILHO, J. L.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; TAMBOURGI, E. B. Physical and rheological characterisation of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B.** v. 766, p. 27-36, 2001.

- [42] OLIVEIRA, R. M. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas**. Dissertação de Mestrado, UFV; Viçosa; 2006.
- [43] PHARMACIA BIOTECH. **Desalting and Buffer Exchange With Sephadex G-25**, Sweden, p.1-5,1998.
- [44] RAHMS I. L. (Ed.), **Gel filtration, Principles and Methods**, Sweden, p.67, 1993.
- [45] RIBEIRO, M. Z. **Extração de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo, 138p., 2001.
- [46] SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. **Fluid Phase Equilibria**, v. 187–188, p. 489–498, 2001.
- [47] SARUBBO, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de Campinas/UNICAMP, Campinas, 174 p., 2000.
- [48] SCHMIDT, A. S.; VENTON, A. M.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 16, p. 131-142, 1994.
- [49] **SIGMA-ALDRICH; Catálogo 2001**.
- [50] SMITHERS, G. W., PEARCE, R. J., REGESTER, G. O. & BRADFORD, R. S. (1991). New casein protein products for the food industry: physical, chemical and enzymatic manipulation of milk. **Food Aust.**, 43, 252-254.
- [51] TABOADA, M. E. Liquid–liquid and solid–liquid equilibrium of the 1-propanol+ lithium sulfate + water system at 25, 35 and 45 °C. **Fluid Phase Equilibria**, v. 5111, p. 1–11. 2002.
- [52] TAKAHASHI, N., ASAKAWA, S. DOSAKO, S. , TADASHI, I. Hypoallergenic nutritive composition. **French Pat. Appl.**, FR 2677850 A1, 1992.

- [53] TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P-A. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. Partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, p. 1036-1043, 1985.
- [54] THOMÄ-WORRINGER, C.; SØRENSEN, J.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Health effects and technological features of caseinomacropetide. **International Dairy Journal**, 16 (2006) 1324 –1333.
- [55] TOLKACH, A., KULOZIK, U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropetide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. **J. Food Eng.**, 67, 13-20, 2005
- [56] TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 293-301, 2004.
- [57] YVON, M., BEUCHER, S., GUILLOTEAU, P., LE HUEROU- LURON I, CORRING, T. Effects of caseinomacropetide (CMP) on digestion regulation. **Reprod Nutr Dev**, 34, n° 6:527-37, 1994.
- [58] ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous Two-Phase Partitioning**. New York: Marcel Decker, 1995. 696 p.

CAPÍTULO 2 - Partitioning of glycomacropeptide in aqueous two-phase systems: influence of type of salt and temperature

Abstract

This study evaluates the influence of type of salt and temperature on the partition coefficient of glycomacropeptide (GMP) to determine the best conditions for the recovery of GMP in aqueous two-phase systems (ATPS) composed by poly(ethylene glycol) (PEG) 1500 and an inorganic salt (potassium phosphate, sodium citrate, lithium sulfate or sodium sulfate). In all systems, GMP presented affinity for the PEG rich-phase. The PEG1500 + lithium sulfate showed the highest values of partitioning coefficient. In addition, thermodynamic parameters (ΔH° , ΔS° , ΔG°) as a function of temperature, were calculated for the system PEG1500-sodium citrate at different PEG concentrations and the results imply thermodynamic differences between partitioning of GMP in this system.

Keywords: aqueous two-phase systems; caseinomacropeptide; hydrophobicity; salt; temperature; thermodynamic parameters.

Abbreviations: GMP, glycomacropeptide; ATPS, aqueous two-phase systems; PEG1500, poly(ethylene glycol) with average molar mass of 1500; ΔH° , standard enthalpy change; ΔS° , standard entropy change; ΔG° , variation of Gibbs free energy.

Introduction

Glycomacropeptide (GMP) or caseinomacropeptide is formed by chymosin (or pepsin) cleavage of κ -casein between Phe105-Met106 during cheese-making [1]. GMP accounts for around 20% of the total protein content in whey protein products. In recent years, GMP has been the subject of growing interest, due to its beneficial biological and physiological properties [2], including the ability to bind cholera and *Escherichia coli* enterotoxins, inhibit bacterial and viral adhesion, modulate immune system responses, promote bifidobacteria growth, suppress gastric secretions and regulate blood circulation, as reviewed by Abd El-Salam et al. [3] and Thomä-Worringer et al. [1]. The most recent isolation techniques for the production of GMP are generally based on chromatography or ultrafiltration techniques using either chymosin-treated casein/caseinate or rennet whey as starting material. However, these techniques are usually expensive and difficult to scale up.

Aqueous two-phase systems (ATPS) have been successfully used for separation and purification of proteins due to their advantages over traditional methods [4]. The ATPS are advantageous over other separation techniques due to the high water content of both phases, which means high biocompatibility and low interfacial tension, thus minimizing degradation of biomolecules [5]. ATPS also provide good resolution, high yield, and a relatively high capacity. In addition, this system is easily scaled-up [6]. ATPS could be a good alternative for a first purification step since such systems allow removal of several contaminants by a simple and low-cost process [7].

The ATPS technology is based on the incompatibility of two different hydrophilic polymers in the common solvent water or aqueous solutions of polymers and salts above certain critical concentrations [5, 8]. The mechanism governing the partition of proteins in ATPS is driven by the van der Waals, hydrogen bond, hydrophobic, and ionic interactions between the biomolecules and the surrounding phase. Therefore, partition may be influenced by the concentrations and molar mass of phase-forming polymer, concentration of phase-forming salt, type and concentration of added salts, temperature and pH. Molar mass, shape, specific bonding sites, and surface hydrophobicity of the biomolecules also affect partition behavior [5, 6]. The net effect of these interactions is not the same in the two phases, and the protein will partition into one phase where energy is more favourable [9].

In this work, the effects of type of salt and temperature on the partition coefficient of GMP were studied aiming to improve the selectivity of the aqueous two-phase systems and to determine the best recovery conditions.

Materials and Methods

Chemicals

Poly (ethylene glycol) (PEG) with average molar mass of 1500 was obtained from Synth (Diadema, SP, Brazil). The polymer and salts were used without further purification. Glycomacropeptide (GMP) was a kindly gift of Davisco Foods International (Eden Prairie, MN, USA), with purity higher than 83 mass %. All chemicals were of analytical grade and readily available commercial products. Ultrapure water for the experiments was obtained from a Milli-Q system (Millipore Inc., MA, U.S.A.).

Preparation of the aqueous two-phase systems

Biphasic systems were prepared by a mixture of PEG1500 and an inorganic salt (potassium phosphate, sodium citrate, lithium sulfate or sodium sulfate). To prepare ATPS, stock solutions of the phase components PEG1500 50 mass %, potassium phosphate, pH 7.0, 40 mass %, and water were mixed to obtain a total system composition. To obtain a stock solution of potassium phosphate, 40 mass % at pH 7.0, monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) and dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4) were weighed and added in the proportion 1:1.82 (mono:di). Sodium citrate, lithium sulfate or sodium sulfate were employed by weighing the solid form; the pH of the PEG-sodium citrate aqueous biphasic system was adjusted (Digimed DM-20 pH meter, Brazil) to 7.0 and the buffer used was 0.1 M HCl; the pH values of the PEG-lithium sulfate and PEG-sodium sulfate biphasic systems were not adjusted since the systems presented pH 7.0. All the systems were prepared in graduated centrifuge tubes. The total weight of the phase system was 10 g. The amount of GMP added to the systems was 20 mg, and was the last component added to the systems. After 2 minutes of gentle stirring, the systems were centrifuged (Centrifuge Eppendorf 5804, Germany) at room temperature and 2000 g for 20 minutes. The tubes were brought to equilibrium in a thermostatic bath (TECNAL, TE-184, Brazil) with a precision of ± 0.1 K, according to

the temperature used (278.15, 298.15, 308.15 and 318.15 K) and left overnight (at least 12 h). Following this treatment, it was observed a well defined interface and clean, transparent bottom and top phases. To determine the concentration of proteins in each of the co-existing phases, samples from each phase were collected using a pipette for the upper phase and a long needle-syringe for the bottom phase. The volumes were determined in graduated centrifuge tubes. The molar mass of the polymer, salt and polymer concentration, temperature and pH were optimized to achieve the maximum partition coefficient for the GMP partitioning using ATPS. The top and bottom phases were withdrawn separately. The tie line length (TLL) was calculated according to the equation (1):

$$TLL = \sqrt{[\Delta PEG]^2 + [\Delta Salt]^2} \quad (1)$$

where $[\Delta PEG]$ and $[\Delta Salt]$ are the differences between the concentration of PEG and salt in the top and bottom phases expressed in mass %.

Determination of the protein partition coefficient (K_p)

The partition coefficient (K_p) was defined as:

$$K_p = \frac{[P]_{top}}{[P]_{bottom}} \quad (2)$$

where $[P]_{top}$ and $[P]_{bottom}$ are the equilibrium concentrations of the partitioned protein in the PEG-(top) and salt-(bottom) enriched phases, respectively. This coefficient is used to quantify the degree of separation reached in an extraction process. The partition experiments were carried out in duplicate and the average results are the values reported in this work. To select the ATPS with the best capability of purifying GMP, it was calculated the theoretical recovery (y , %) in the top phase. The recovery percentage for any protein after one extraction step can be calculated according to the equation:

$$y(\%) = \frac{100}{1 + (1/RK_p)} \quad (3)$$

where R is V_T/V_B , V_B and V_T are the bottom and top phase volumes, respectively.

Determination of thermodynamic functions associated with protein partitioning

The partitioning coefficient was determined at different temperatures for the systems compounds for PEG1500-sodium citrate at different PEG concentrations. The sodium citrate was selected due to its environment safe characteristics. The temperature

dependant thermodynamic parameters were obtained from the Van't Hoff plot by fitting $\ln K_p$ vs. the reciprocal of the temperature by a non-linear regression analysis of data and to obtain the parameters a , b , and c :

$$\ln K_p = a + \frac{b}{T} + \frac{c}{T^2} \quad (4)$$

According to Griffin et al. [10], the three parameters a , b , and c can then be used in Eqs. (4)–(5), derived from Kirchoff's relations:

$$\frac{\partial \ln K_p}{\partial (1/T)} = b + 2 \frac{c}{T} = - \frac{\Delta H^\circ}{R} \quad (5)$$

$$\frac{\Delta S^\circ}{R} = a - \frac{c}{T^2} \quad (6)$$

Where, ΔH° denotes the standard enthalpy change (kJ mol^{-1}) and ΔS° ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) the standard entropy change associated to protein partitioning, and R the universal gas constant.

The ΔG° denotes variation of Gibbs free energy (kJ mol^{-1}) of solute transfer between two phases, expressed by

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (7)$$

Protein quantification

Protein quantification in the saline and polymeric phases was conducted using a chromatography ÄKTA Purifier[®] 10/100 system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The eluent was monitored by UV absorption UV-900 at 205 nm and conductivity measurements in a flow cell pH/C-900. Samples were injected by means of a loop of 50 μl . The column used was a Superdex[®] 75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The mobile phase was 0.1 M sodium phosphate monobasic, 0.1 M sodium phosphate dibasic, pH 6.0, with a flow rate of 0.65 mLmin^{-1} . The maximum pressure of the column bed was 1.78 MPa. The polymeric phase was diluted before injection in a 1:2 (sample: water) ratio due to its high viscosity.

Results and Discussion

Effect of phase-forming salt on protein separation

The change of the type and concentration of salt can alter the partition behavior of biological materials [5]. Besides, PEG-phosphate, PEG-citrate and PEG-sulfate ATPS are adequate for continuous large-scale purification of biological origin materials and allow the use of traditional liquid-liquid extraction equipment [11-14]. Thus, four PEG1500-salt systems were tested to investigate the effects of phase-forming salt on the separation of GMP; at temperature of 298.15 K and pH 7.0. The global concentrations of PEG and salt in the different systems, the theoretical recovery and partition coefficients for the GMP in each system tested are shown in Table I. The recoveries of GMP in the top phase were calculated by Eq. 3.

As shown in Table I, the partition coefficient of GMP was higher than one ($K_p > 1$). The type and concentration of salt present a significant effect on the extraction efficiencies in ATPS. The salt influence on the partitioning is caused by the nonuniform distribution of the salt ions in the upper and lower phases, and by the difference of the potential, which is generated by the inequality of the salt distribution [15].

Except for the PEG1500-sodium sulfate system, GMP was recovered with high efficiency in the top phase, which could make the liquid-liquid extraction method suitable to be applied as an isolation method for this protein. The maximum percentage of recovery was 93.95% in ATPS containing 16 mass % PEG1500 and 11.43 mass % potassium phosphate.

Table I. Theoretical recoveries in the top phase and partition coefficients for the GMP in each ATPS formed for PEG1500-salt, at different compositions of the assayed ATPS. Medium conditions: Temperature 298.15 K and pH 7.0.

ATPS	TLL (mass %)	PEG (mass %)	Salt (mass %)	K_p	y (%)
PEG- Sodium Citrate	24.08	14.00	14.89	8.85 ± 0.12	85.59 ± 0.28
	32.31	16.00	16.10	14.73 ± 0.15	92.00 ± 0.08
	34.60	18.00	17.28	18.56 ± 0.17	92.85 ± 0.07
PEG- Potassium Phosphate	19.67	14.00	10.52	3.29 ± 0.32	83.88 ± 1.36
	31.55	16.00	11.43	9.89 ± 0.08	93.95 ± 0.14
	34.86	18.00	11.45	10.61 ± 0.26	93.66 ± 0.09
PEG- Lithium Sulfate	29.35	10.00	13.03	10.91 ± 0.21	78.86 ± 0.31
	33.46	10.50	13.77	14.62 ± 0.36	88.33 ± 0.16
	37.57	11.00	14.52	22.25 ± 0.34	83.35 ± 0.34
PEG- Sodium Sulfate	26.79	10.00	9.52	2.02 ± 0.05	50.56 ± 0.21
	29.74	10.25	10.48	3.03 ± 0.10	59.59 ± 0.52
	35.12	10.50	11.87	6.04 ± 0.20	71.40 ± 1.13

In spite of the difficulty in developing a model that predicts the partition coefficient for the target molecules, many investigators have been searched for a mathematical relationship to the K_p values. Thus, Blázquez et al. [9] proposed the following simple linear relation to correlate protein partitioning in ATPS:

$$\ln K_p = A(w_{bottom} - w_{top}) \quad (8)$$

where, w_{bottom} and w_{top} are the salt mass fractions in the bottom and top phase and A is a function of the interaction between salt and water. This simplified relationship could adequately describe the partition data of α -amylase.

Figure 1 shows the partition data for GMP in different PEG1500-salt systems at increasing salt concentration difference ($\Delta[\text{salt}]$) values, calculated as the difference between salt equilibrium concentration in the top and bottom phases, w_{top} and w_{bottom} , respectively. The trend observed is a linear relationship between $\ln K_p$ vs. $\Delta[\text{salt}]$. In all cases, higher values of the determination coefficients ($R^2 > 0.96$) were obtained. The increase of $\Delta[\text{salt}]$ for all types of salt induced an increment in the K_p value. Also, the slope values modify for each type of salt, suggesting the presence of salt-protein interactions.

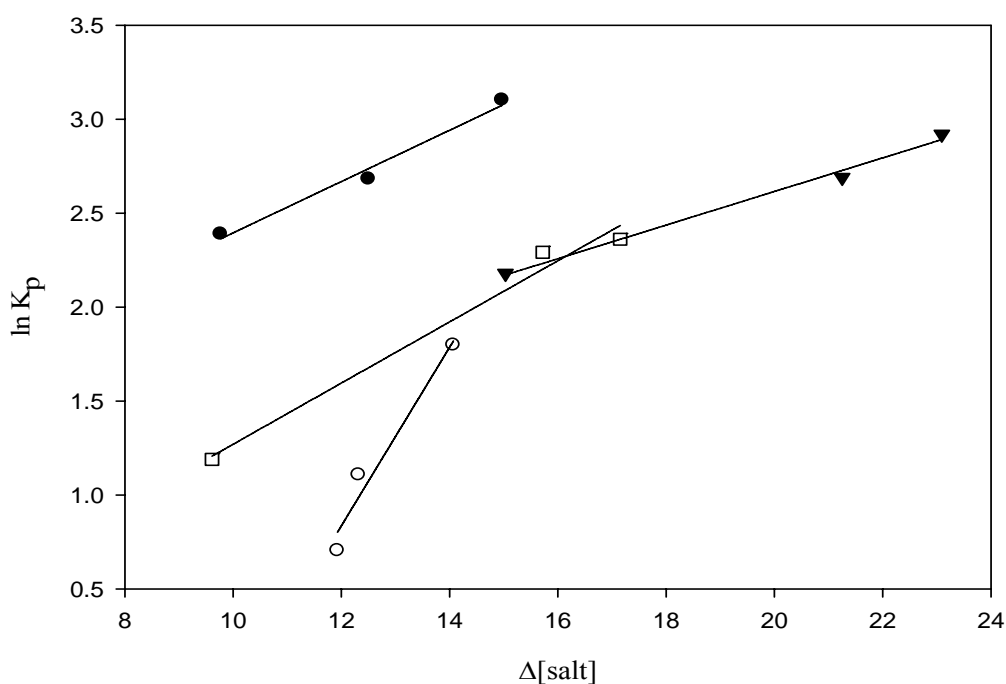


Figure 1. Dependence of the salt concentration difference between the top and bottom phases for the GMP partition. Sodium citrate (▼), sodium sulfate (○), potassium phosphate (□), and lithium sulfate (●). Temperature: 298.15 K.

Although partitioning depends on a number of factors such as hydrophobic properties, addition of salts, electrical potential between the phases, molecular size, and conformation of the molecules, the hydrophobic characteristics are considered to be the dominant factor when the influence of type of salts is analyzed. Hydrophobic effect is defined as an unfavorable interaction of nonpolar substances or moieties of molecules with water, which is responsible for their low solubility [16]. Moreover, the hydrophobicity of a substance could be described as a measure of the overall intensity

of its total interactions with an aqueous medium (including hydrogen bonding, van der Waals, electrostatic interactions, etc.) [17].

When a protein is partitioned in PEG-salt ATPS, the type of salt and salt concentration have an effect on the hydrophobic interactions between the proteins and the hydrophobic media; the salt ions will interact with the oppositely charged groups in the protein to form a double layer of ionic groups. Thus, the protein will be dehydrated due to the hydration effect of salt molecules surrounding the protein, and the hydrophobic zones of the protein will be gradually naked, increasing with the salt concentration increment [18]. The influence of the salt ions on the protein behavior is usually related to their position in the Hofmeister series. The effectiveness of the Hofmeister series is given for anions by $\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$, and for cations by $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Mg}^{2+}$ [19]. At higher concentrations, the ions to the left of the series decrease protein solubility (salting-out effect) by increasing hydrophobic interaction and aggregation, and the hydration effect of the salt molecule surrounding the protein [20]. Thus, most proteins strongly favor the phase with lower salt concentration, increasing the interaction between the protein and the PEG molecules, improving the extraction to PEG rich phase. According to Figure 1 and Table I, the PEG1500-lithium sulfate showed the highest values of coefficient partitioning, suggesting that the hydrophobic effect in ATPS was influenced by the Hofmeister series, and consequently by the type of salt.

Effect of the temperature on protein partitioning

The partitioning coefficient was determined at different temperatures for the systems compounds for PEG1500-sodium citrate at different PEG concentrations. The sodium citrate was selected due to citrates characteristics as a biodegradable and nontoxic compound. As can be seen in Figure 2 the temperature affected the partition behavior of GMP. Willauer et al [21], studying the influence of temperature and type of salt on the lignin distribution using ATPS verified that the increase of the salt concentration of any salt is identical to the effect of increasing temperature on partitioning. Recent studies have shown that polymer-salt interactions are endothermic events, and the rise in temperature should be favorable to this reaction, which leads to an increase in the amount of salt necessary for phase splitting, enlarging the biphasic area and increasing the slope of the tie line [22, 23]. Thus, it is expected in our study an increase in the

phase divergence with the increase of the temperature. Consequently, the GMP will exhibit higher partitioning coefficients due to its preference for the PEG-rich phase, as it was found in this work in the systems with high salt concentration.

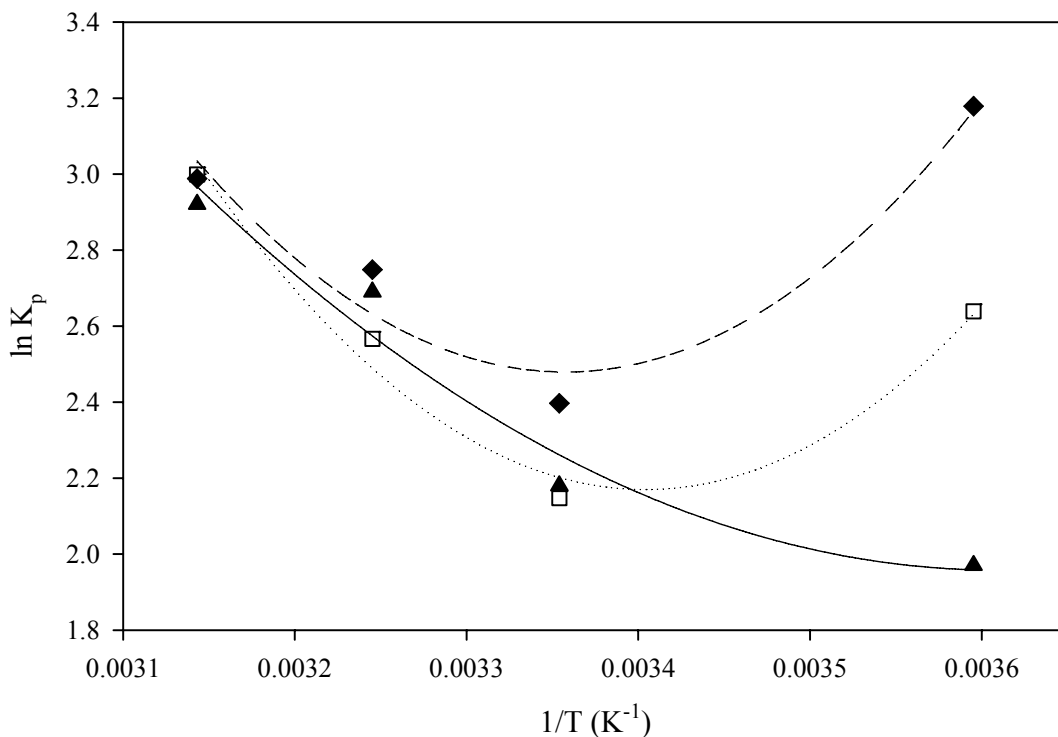


Figure 2. Van't Hoff plots. Temperature effect of the partition equilibrium of GMP at different concentrations of PEG 14 mass % PEG1500 (\blacktriangle), 16 mass % PEG1500 (\square), and 18 mass % PEG1500 (\blacklozenge). pH 8.0.

Figure 2 shows the temperature effect on the partitioning coefficient, expressed as non linear Van't Hoff plots. Changes in temperature and PEG concentration affected the partitioning coefficient of GMP. The increase of PEG concentration in the system increases the partitioning coefficient, but this behavior is in contrast with the excluded volume effect theory. This theory suggests that the increase of either the PEG concentration or the PEG molar mass induces a reduction of the protein solubility in the phase where the protein is placed. Spelzini et al. [24] reported that the PEG–protein–salt interaction prevails on the excluded volume effect. Furthermore, as the PEG concentration increases, the number of polymer units involved in the bio-molecular partitioning also increases, and, hence, more protein molecules partition into the PEG phase, due to the hydrophobic interaction between the protein and PEG [14].

Figure 2 also suggests that the enthalpic change associated to protein partition is temperature-dependent. The solids curves in the figure represent the predicted values using the quadratic form of Eq. (4). The adjusted parameters of the Van't Hoff equation obtained are presented in Table II. In all cases, higher values of the coefficients of determination ($R^2 > 0.93$) were obtained.

Table II. Adjusted parameters of the Van't Hoff equation.

PEG (mass %)	Parameters			
	a	b	c	R^2
14.00	62.33	-33446.57	4632541.66	0.96
16.00	148.63	-86047.14	12638755.51	0.97
18.00	139.32	-81520.27	12141187.73	0.93

The thermodynamic parameters for the partitioning of GMP were calculated based on Table 2 data and using Eqs. (4)-(7). The results are shown in Table III and Figures 4-6.

Table III. Thermodynamic parameters for the partitioning of GMP in ATPS, at different PEG concentrations.

Temperature (K)	PEG 1500 (mass %)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (Jmol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (kJmol ⁻¹)
278.15	14.00	1.14	20.38	-4.53
298.15		19.72	84.93	-5.61
308.15		28.10	112.60	-6.60
318.15		35.96	137.69	-7.85
278.15	16.00	-40.16	-122.50	-6.09
298.15		10.53	53.61	-5.46
308.15		33.40	129.09	-6.38
318.15		54.84	197.56	-8.02
278.15	18.00	-48.05	-146.42	-7.32
298.15		0.64	22.76	-6.15
308.15		22.61	95.26	-6.74
318.15		43.21	161.04	-8.03

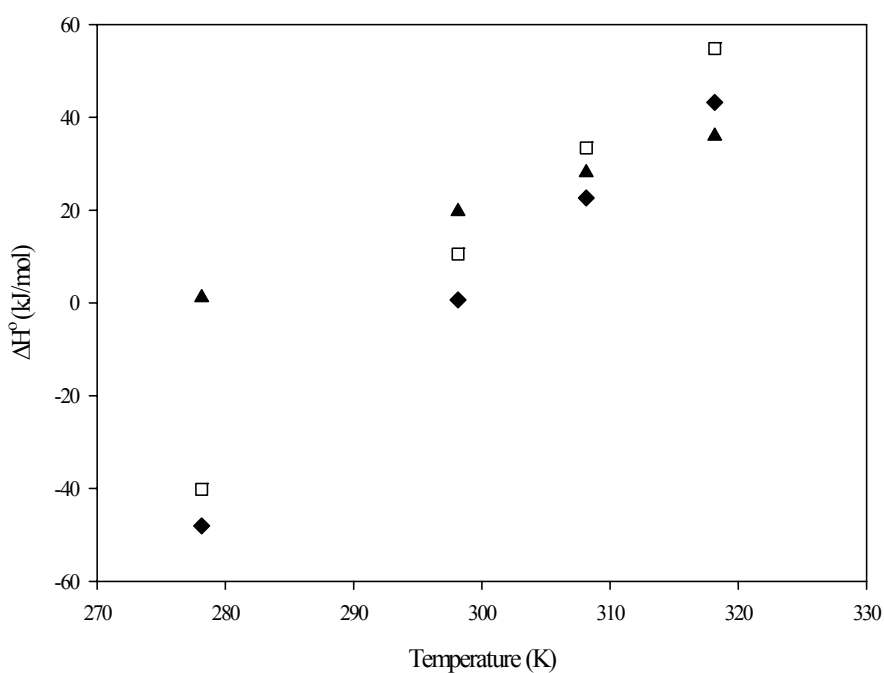


Figure 3. Enthalpy change of the partition equilibrium of GMP at different concentrations of PEG 14 mass % PEG1500 (▲), 16 mass % PEG1500 (□), and 18 mass % PEG1500 (◆). pH 8.0.

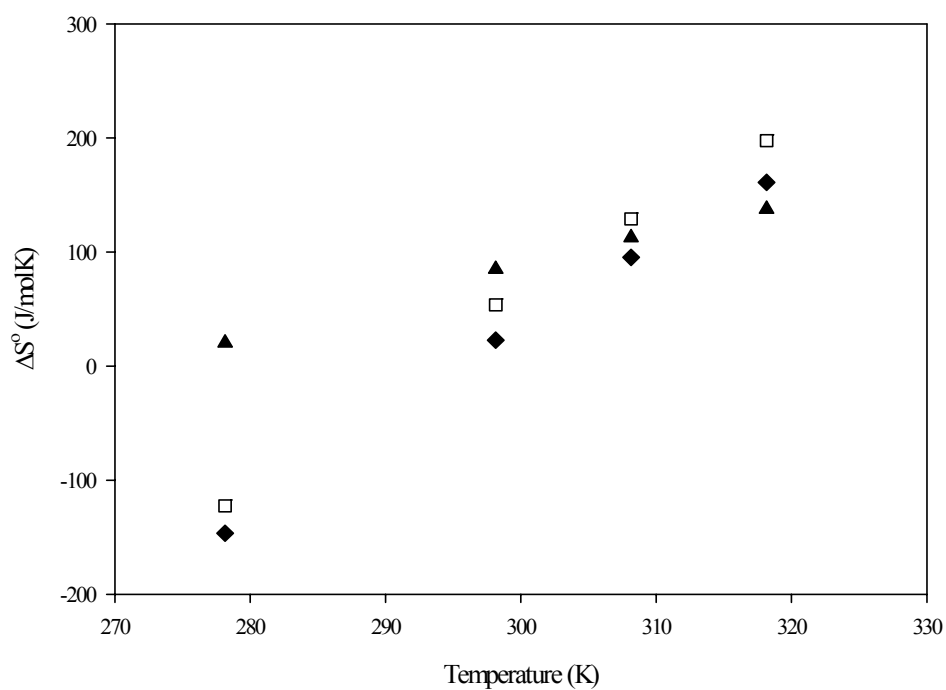


Figure 4. Entropy change of the partition equilibrium of GMP at different concentrations of PEG 14 mass % PEG1500 (▲), 16 mass % PEG1500 (□), and 18 mass % PEG1500 (◆). pH 8.0.

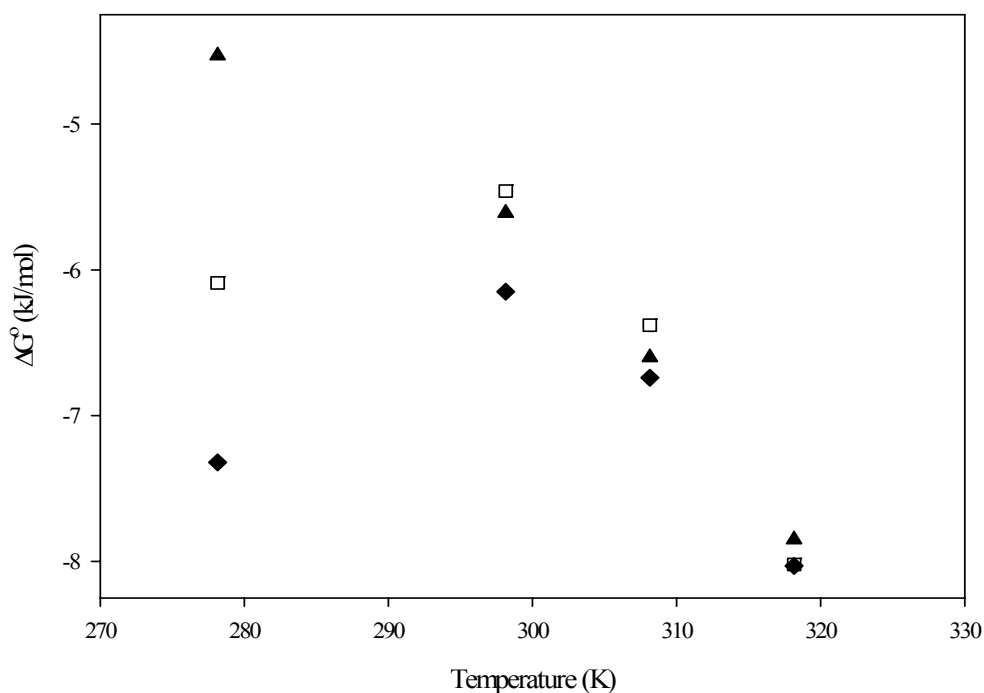


Figure 5. Free energy change of the partition equilibrium of GMP at different concentrations of PEG: 14 mass % PEG1500 (▲), 16 mass % PEG1500 (□), and 18 mass % PEG1500 (◆). pH 8.0.

These thermodynamic functions provide information on the molecular mechanism taking part in the protein transfer from the salt to the PEG-rich phase. The results presented demonstrate that protein partitioning enthalpy and protein partitioning entropy increase with temperature for GMP at all PEG concentrations. The partitioning process tends to be more enthalpic favorable with increase in temperature [22, 23]; therefore, the transfer of GMP to the top phase was endothermic at the temperature range 298.15-318.15 K, while at 278.15 K, an inversion of the sign in ΔH° was observed for concentrations of 16 and 18 mass % PEG1500. A similar inversion in the ΔS° sign was verified. In Figures 3 and 4, a linear dependence of ΔH° and ΔS° on temperature was observed for all PEG concentrations. The partitioning process was found to be entropically driven as temperature increased [22, 23]. The results also indicated that the change in Gibbs free energy is negative in all cases, a characteristic of spontaneous process, and becomes more negative as temperature is increased, in nearly all cases.

Conclusions

The influence of type of salt (potassium phosphate, sodium citrate, lithium sulfate or sodium sulfate) and temperature (278.15-318.15 K) on the GMP partition coefficient in the PEG/salt ATPS was studied. The GMP is a protein source of promising industrial potential. Thus, the influence of various factors on its partitioning was analyzed. Efficient and low cost GMP extraction can be achieved by using PEG-salt biphasic system. The most favorable condition for recovery was found at 16 mass % PEG 1500 + 11.43 mass % potassium phosphate + 72.57 mass % water, pH 7.0 and room temperature (298.15 K), being approximately 93.95% of GMP recovered. The effect of temperature on the partition behavior of GMP was also studied. The thermodynamic parameters (ΔH° , ΔS° , and ΔG°) as a function of temperature were calculated for the system PEG1500-sodium citrate at different PEG concentrations and the results explicit thermodynamic differences between partitioning of GMP. The ΔH° , ΔS° , and ΔG° values of the process studied have shown that this process is driven by entropy. Furthermore, GMP partitioning needs to be investigated in other polymer–polymer systems and the partitioning parameters must be determined, especially under a continuous mode of operation, to make the technique commercially viable.

References

- [1] C. Thoma-Worringer, J. Sørensen, and R. López-Fandiño. Health effects and technological features of caseinomacropptide. **International Dairy Journal** 16 (2006) 1324–1333.
- [2] C. Thomä, I. Krause, and U. Kulozik. Precipitation behaviour of caseinomacropptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. **International Dairy Journal**, 16 (2006) 285 –293.
- [3] M.H. Abd El-Salam, S. El-Shibini, and W. Buchheim. Characteristics and potential uses of the casein macropptide. **International Dairy Journal** 6 (1996) 327-341.
- [4] G. Picó, D. Romanini, B. Nerli, and B. Farruggia. Polyethyleneglycol molecular mass and polydispersivity effect on protein partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B** 830 (2006) 286-292.

- [5] P.A. Albertsson, **Partition of Cell Particles and Macromolecules**, Third ed., John Wiley and Sons, New York, 1971.
- [6] C.K. Su, and B.H. Chiang. Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. **Process Biochemistry** 41 (2006) 257-263.
- [7] A.S. Lima, R.M. Alegre, and A.J.A. Meirelles. Partitioning of pectnolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers** 50 (2002) 63-68.
- [8] E.E.G. Rojas, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, A.D.G. Zuniga, S. H. Saraiva, and V.P.R. Minim. Size-exclusion chromatography applied to the purification of whey proteins from the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry** 39 (2004) 1751-1759.
- [9] G. Blázquez, F. Camacho, P. González-Tello, and F.J. Alarcón. Partition coefficients of α -amylase in aqueous two-phase systems PEG + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + H_2O at 298K. **Biochimica et Biophysica Acta** 1379 (1998) 191-197.
- [10] S.T. Griffin, M. Dilip, S.K. Spear, J.G. Huddleston, and R.D. Rogers. The opposite effect of temperature on polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems versus aqueous biphasic extraction chromatographic resins. **Journal of Chromatography B** 844 (2006) 23-31.
- [11] J.D. Coimbra, J. Thommes, A.J. Meirelles, and M.R. Kula. Performance of a Graesser contactor in the continuous extraction of whey proteins: Mixing, mass transfer and efficiency. **Bioseparation** 5 (1995) 259-268.
- [12] J.S.R. Coimbra, J. Thömmes, and M.R. Kula. Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a Graesser contactor. **Journal of Chromatography A** 668 (1994) 85-89.
- [13] A.D. Giraldo-Zuniga, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, and E.E.G. Rojas. Dispersed phase hold-up in a Graesser raining bucket contactor using aqueous two-phase systems. **Journal of Food Engineering** 72 (2006) 302-309.
- [14] S. Saravanan, J. R. Rao, T. Murugesanb, B. U. Nair, and T. Ramasami. Partition of tannerywastewater proteins in aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-magnesium

sulfate systems: Effects of molecular weights and pH. **Chemical Engineering Science** 62 (2007) 969-978.

[15] J. H. Han, and C.H. Lee. Effects of salts and poly(ethylene glycol)-palmitate on the partitioning of proteins and *Bacillus subtilis* neutral protease in aqueous two-phase systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 9 (1997) 109-116.

[16] A. Vailaya, and C. Horváth. Retention Thermodynamics in Hydrophobic Interaction Chromatography. **Ind. Eng. Chem. Res.** 35 (1996) 2964-2981.

[17] B.Y. Zaslavsky, **Aqueous two-phase partitioning. Physical Chemistry and Bioanalytical Applications**, Marcel Dekker Inc., New York, 1994.

[18] R.C.F. Bonomo, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, R.C.I. Fontan, L.H.M. Da Silva, and V.P.R. Minim. Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis. **Journal of Chromatography B** 844 (2006) 6-14.

[19] R.A Curtis, and L. Lue. A molecular approach to bioseparations: Protein–protein and protein–salt interactions. **Chemical Engineering Science** 61 (2006) 907-923.

[20] F. Vojdani, in G.M. Hall (Ed.), **Methods of testing protein functionality**, Blackie Academic and Professional, London, 1996.

[21] H.D. Willauer, J.G. Huddleston, M. Li, and R.D. Rogers. Investigation of aqueous biphasic systems for the separation of lignins from cellulose in the paper pulping process. **Journal of Chromatography B** 743 (2000) 127–135.

[22] L.H.M. Silva, and W. Loh. Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly (ethylene oxide) and electrolytes (or dextran). **J. Phys. Chem. B** 104 (2000) 10069-10073.

[23] C.P. Carvalho, J.S.R. Coimbra, I.A.F. Costa, L.A. Minim, L.H.M. Silva, and M.C. Maffia. Equilibrium data for PEG 4000 + salt + water systems from (278.15 to 318.15) K. **Journal of Chemical and Engineering Data** 52 (2007) 351-353.

[24] D. Spelzini, B. Farruggia, and G. Picó. Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–phosphate: Chymosin and pepsin. **Journal of Chromatography B** 821 (2005) 60-66.

CAPÍTULO 3 - Partitioning features of glycomacropeptide in aqueous two-phase systems compound by polyethylene glycol-sodium citrate

Abstract

The partition behavior of glycomacropeptide (GMP) in poly (ethylene glycol) (PEG) sodium citrate aqueous two-phase systems have been characterized. The GMP partitioned preferentially into the PEG phase. Investigation on the effect of the PEG molar mass, tie-line length, pH, NaCl addition and temperature of system lead to the conclusion that the system properties had affected the GMP partition coefficients. The ATPS composed by 15.00 mass % PEG1500 + 18.91 mass % sodium citrate at 318.15 K showed to have the best capability of recovering the GMP. In this system, the recovery of this protein was of 94.66% in the top phase, thus, ATPS was shown to be suitable as a starting point to separation of the GMP.

Keywords: aqueous two-phase systems; PEG molar mass; NaCl addition; tie line length; pH.

Abbreviations: GMP, glycomacropeptide; ATPS, aqueous two-phase systems; PEG1500, poly(ethylene glycol) with average molar mass of 1500; PEG2000, poly(ethylene glycol) with average molar mass of 2000; PEG4000, poly(ethylene glycol) with average molar mass of 4000; TLL, tie-line length; STL, slope of the tie line; NaCl, sodium chloride.

Introduction

Glycomacropeptide (GMP) comprises the 64 amino acids in the hydrophilic C-terminal portion of κ -CN, this peptide is formed by chymosin (or pepsin) cleavage of κ -casein between Phe105-Met106 during the manufacture of cheese [1-2]. Next to β -lactoglobulin and α -lactalbumin, GMP is the most abundant protein/peptide in whey proteins produced from cheese whey with typical concentrations between 20 % and 25 % of proteins [1]. In recent years, an increasing number of studies show that GMP may exert important biological activities. The literature has highlighted the ability of GMP to bind cholera and *Escherichia coli* enterotoxins, growth-promoting effects on bifidobacteria, suppression of gastric secretion and the inhibition of viral or bacterial adhesion to intestinal epithel cell [1, 3]. This explains the growing interest in developing techniques for the isolation and purification of GMP. Thus as an alternative to the first purification step of GMP, we proposed a purification process based on aqueous two-phase systems (ATPS).

Aqueous two-phase extraction has been developed since the mid 1950s as a mild separation method of wide applicability within biochemistry, cell biology and biotechnology [4]. An ATPS is formed when two water-soluble polymers, such as poly (ethylene glycol) (PEG) and dextran, or a polymer and a salt are dissolved in water beyond a critical concentration at which two immiscible phases form [5]. However PEG–salt ATPS have certain advantages over PEG–dextran such as low viscosity and lower cost [6]. PEG had been combined with sodium citrate to form ATPS, due to citrates characteristics as a biodegradable and nontoxic compound. PEG + citrate salts form environmentally safe ATPS, which are more suitable for the extraction of biological materials [7].

ATPS have several advantages as regards the conventional methods for the isolation and purification of proteins such as their low cost, nontoxic, the possibility of applying them on large scale and the short time required for reaching the equilibrium condition [8]. The selective distribution of constituents of ATPS may be affected by different factors like the nature and size of the biocompound, molecular structure and size chain of the polymer, type of salt, pH, initial composition of the system, and temperature [9, 10]. Thus, the goal of this work is to make a preliminary study about the partition of GMP using the PEG-sodium citrate system. Some relevant parameters such as pH, polymer

molar mass, tie line length, NaCl addition, and temperature which affect the partitioning behavior of the protein were investigated.

Materials and Methods

Chemicals

Glycomacropeptide (GMP) was a kindly gift of Davisco Foods International (USA), with purity higher than 83 mass %. Poly (ethylene glycol) (PEG) with average molar mass of 1500, 2000 and 4000 (PEG1500, PEG2000 and PEG4000) were purchased from Synth (Brazil), Riedel de Haen (Germany) and Isofar (Brazil), respectively. All chemicals were of analytical grade. The polymer and salts were used without further purification. Ultrapure water for the experiments was obtained from a Milli-Q system (Millipore Inc., MA, U.S.A).

Preparation of the aqueous two-phase systems

Biphasic systems were prepared by a mixture of PEG (1500, 2000, and 4000) and sodium citrate. To prepare ATPS, stock solutions of the PEG 50 mass %, sodium citrate and water were mixed to obtain a total system composition. Sodium citrate was employed by weighing the solid form; the desired pH (6.0, 7.0 or 8.0) of the ATPS was adjusted (Digimed DM-20 pH meter, Brazil) by the addition of sodium hydroxide or citric acid. All the systems were prepared in graduated centrifuge tubes. The total mass of the phase system was 10 g. The amount of GMP added to the systems was 20 mg, and it was the last component added. For study of sodium chloride addition, systems were prepared by dissolving the powdered compound directly into the systems, to achieve concentrations of 0.1 or 0.5 M. Each system was further centrifuged (Centrifuge Eppendorf 5804, Germany) at 2000 g for 20 min and transferred to a thermostatic bath (TECNAL, TE-184, Brazil) with a precision of ± 0.1 K, where the mixture was allowed to settle for 12 h at the operational temperature (298.15, 308.15, and 318.15) K to obtain clear phase separation and to reach the equilibrium. After equilibration, estimates of the volumes of top and bottom phases were made in graduated centrifuge tubes. In order to determine the concentration of proteins in each of the co-existing phases, samples from each solution phase was collected using a syringe. The top and bottom phases were

withdrawn separately. The tie line length (TLL) was calculated according to the equation (1):

$$TLL = \sqrt{[\Delta PEG]^2 + [\Delta Salt]^2} \quad (1)$$

where $[\Delta PEG]$ and $[\Delta Salt]$ are the differences between the concentration of PEG and salt in the top and bottom phases expressed in mass %. And the slope of the tie line (STL) was calculated by:

$$STL = \frac{\Delta PEG}{\Delta Salt} \quad (2)$$

Determination of the protein partition coefficient (K_p)

The partition coefficient (K_p) was defined by equation (3):

$$K_p = \frac{[P]_{top}}{[P]_{bottom}} \quad (3)$$

where $[P]_{top}$ and $[P]_{bottom}$ are the equilibrium concentrations of the partitioned protein in the PEG and sodium citrate rich-phases, respectively. The partition experiments were carried out in duplicate and the average results are the values reported in this work. To select the ATPS with the best capability of purifying GMP, it was calculated the theoretical recovery (y , %) in the top phase. The recovery percentage can be calculated according to the equation (4):

$$y(\%) = \frac{100}{1 + (1/RK_p)} \quad (4)$$

where R is V_T/V_B , V_B and V_T are the bottom and top phase volumes, respectively. It is generally desirable to recover the target protein in the top phase, which is better for protein stability; recovery in the bottom salt phase also requires desalting if followed by an ion exchange step [5]

Protein quantification

Protein quantification in the saline and polymeric phases was conducted using a chromatography ÄKTA Purifier[®] 10/100 system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The eluent was monitored by UV absorption UV-900 at 205 nm and conductivity measurements in a flow cell pH/C-900. Samples were injected by means of a loop of 50 μ l. The column used was a Superdex[®] 75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The mobile phase was 0.1 M sodium phosphate monobasic, 0.1 M

sodium phosphate dibasic, pH 6.0, with a flow rate of 0.65 mLmin⁻¹. The maximum pressure of the column bed was 1.78 MPa. The polymeric phase was diluted before injection in a 2:1 (water: sample) ratio due to its high viscosity.

Results and Discussion

Effect of the addition of sodium chloride and pH on protein partitioning

The ATPS formed by 14.00 mass % PEG1500 and 14.89 mass % sodium citrate systems was used to investigate the effect of addition of sodium chloride (NaCl) and pH on partitioning and recovery of GMP. The partition experiments were carried out at different pH values (6.0, 7.0, and 8.0) and NaCl concentration (0.0, 0.1, and 0.5 M). The results are shown in Table I and in Figure 1. In spite of GMP pI between 4 and 5 [1], these pH values were chosen to study so that the aqueous phase is neither too acidic nor too basic. This is important since, too acidic or too basic solution cannot be discharged in the environment without further treatment.

The partition coefficient of the systems without NaCl for pH values of 6.0, 7.0, and 8.0 are 5.69, 7.58 and 8.82, respectively. In these systems, the percentage yield of the extraction in the ATPS, as seen from Table I, increases from 79.24 to 85.60. This provides better partitioning of the proteins in the top phase (PEG rich-phase) on increasing the pH from 6 to 8. This increase in partition coefficient value could be due to hydrophobic interaction and net charge. According to Mikkelsen et al. [2], the sequence-derived molar mass (MM) of GMP is 6.7 kDa, however, previous studies suggest that GMP forms aggregates, and that aggregation occurs at pH values above 4.5. Kawasaki et al. [11], reported a pH-dependent association/dissociation of the GMP. At pH 7.0, the apparent molar mass of GMP ranged from 20 to 50 kDa but at pH 3.5 it ranged from 10 to 30 kDa. Mikkelsen et al. [2], verified that tetrameric forms (MM above 35 kDa) of GMP from size exclusion chromatography (SEC) fractions were significantly more hydrophobic than the dimeric and monomeric forms of GMP isolated by SEC. Moreover, proteins with great hydrophobic surface area exposed to solvent, have the possibility of interacting with PEG [12], consequently, this hydrophobic interaction between PEG and protein when pH values increase is the factor that drives the GMP partition in favor of the PEG-rich phase, which is more hydrophobic than the salt rich phase [13-14].

It is known that salt concentration alters protein partition in aqueous two phase systems. To obtain a more complete characterization of protein partition, the effect of the addition of sodium chloride to the system at two concentrations (0.1 and 0.5 M) was measured at pH values of 6.0, 7.0 and 8.0. From the Table I and the Figure 1 it is observed a decrease trend of the partition coefficient with the increase of the NaCl content in the system. The partition coefficient at pH 8.0 decreases from 8.82 to 2.40 with increase in NaCl concentration for 0.5 M. Similar behavior was verified for pH values of 6.0 and 7.0. This effect is probably verified because of the addition of electrolytes, e. g. NaCl, at a concentration in order of 0.1-1 M may increase protein solubility [15-16]. This electrostatic repulsive force should also prevent protein association or aggregation; in other words, it should increase the solubility of the GMP in system, which is fully in agreement with the known protein salting-in property of NaCl. Thus, we suggested a dissociation of GMP tetrameric form with the increase of the NaCl content in the system. In addition, originally, the monomeric form of GMP is a highly acidic and hydrophilic [1], consequently, the affinity that had between GMP and PEG is lower and a decreasing in the K_p values is verified. According to the results, the ATPS composed by PEG1500-sodium citrate at pH 8.0 and without addition of NaCl was chosen for the subsequent studies.

Table I. Theoretical recoveries in the top phase and partition coefficients for the GMP in each system formed for PEG1500 (14.00 mass %) and sodium citrate (14.89 mass %), at different pH values and NaCl concentration of the assayed ATPS. Medium condition: Temperature 298.15 K.

pH	NaCl (M)	K_p	y (%)
6.00	0.00	5.69 ± 0.20	79.24 ± 0.57
	0.10	3.97 ± 0.05	72.65 ± 0.22
	0.50	2.65 ± 0.06	64.01 ± 0.48
7.00	0.00	7.58 ± 0.26	82.85 ± 1.46
	0.10	2.82 ± 0.12	65.48 ± 1.01
	0.50	2.06 ± 0.05	58.03 ± 0.53
8.00	0.00	8.82 ± 0.12	85.60 ± 0.28
	0.10	4.31 ± 0.28	74.23 ± 1.80
	0.50	2.40 ± 0.21	61.67 ± 2.01

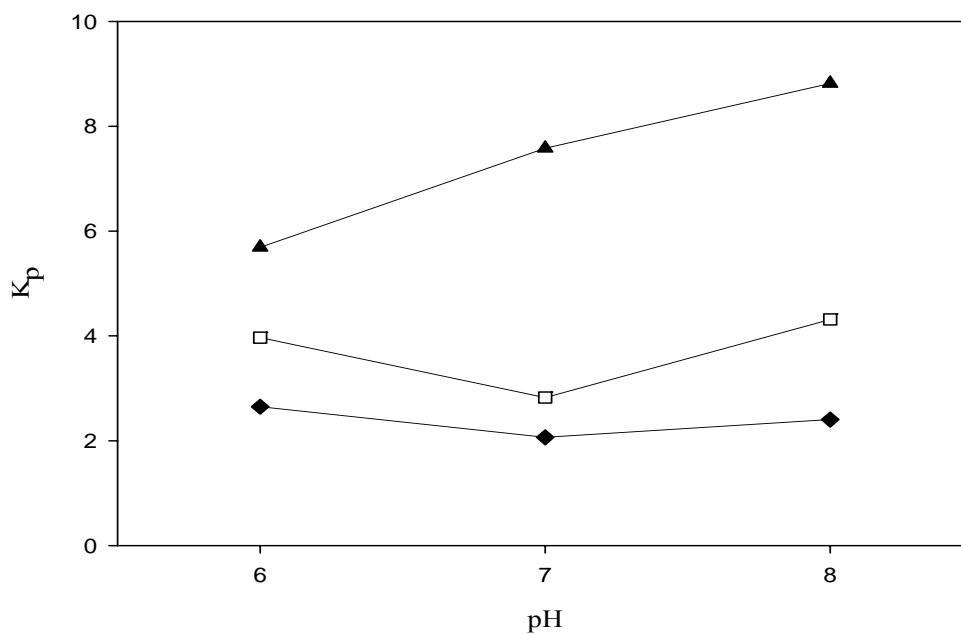


Figure 1. Influence of pH on GMP partitioning in PEG1500-sodium citrate ATPS at different NaCl concentrations. 0.0 M (\blacktriangle), 0.1 M (\square), and 0.5 M (\blacklozenge). Temperature: 298.15 K.

Influence of PEG molar mass, tie-line length and temperature on the protein partitioning

Tables II-IV and Figures 2-4 show the effect of the tie line length (TLL), PEG molar mass and temperature on the GMP partitioning at pH 8.0, without addition of NaCl. The results indicate that the system studied is slightly influenced by the PEG molar mass. The effect of polymer molar mass could be attributed to the excluded volume effects that increase with increasing polymer molar mass. According to this theory, the increase in the molar mass of PEG induces a reduction of the protein solubility in the phase where the protein is located [17], due to this effect. The general tendency expected is a decrease of the partition coefficients on the PEG molar mass increase which was verified in our results. However, it is important to have in mind that by changing the polymer molar mass, one needs to alter the polymer and salt concentration. Consequently, the effect of the tie line length on the partition coefficients of GMP should also be analyzed.

From the Tables II-IV and Figures 2-4, it has been observed that the partitioning of GMP in PEG-sodium citrate system is dependent on the TLL. When the TLL increase it was observed an increase in the K_p values for molar mass of PEGs studied. This effect of TLL on a protein can be due to a fine balance between two factors: the high ionic strength created by the increasing in the salt concentration, which improves the movement of the protein to the PEG rich-phase as a consequence of the electrostatic repulsion effects [18]; and the PEG-GMP binding through the hydrophobic area of the protein exposed to the solvent [2].

According to the results, changes in the temperature are able to increase the partition coefficient of GMP. Aiming to analyze the temperature effect on the K_p , we applied the slope of the tie line (STL) concept. The STL explains the effect of the operational conditions on system composition. When the temperature increase, the slope of the tie line (STL) tends to increase, reducing the quantity of salt necessary to form a biphasic system with a given amount of PEG at higher temperatures [10]. Thus, for a given system composition, tie line length increases with increasing temperature as also with increasing STL (Tables II-IV). Thus, the effect of increasing temperature in an ATPS may be considered similar to increasing tie line length [19]. Moreover, PEG seems to be a molecule for which each ethylene group in its structure interacts with 14 water molecules, however, the ordered water formation is very sensitive to the temperature

changes. Thus a temperature increase causes the water molecules to lose their order around the hydrophobic polymer surface, which could improve the interaction protein-PEG and increase the K_p values [20].

Table II. Theoretical recoveries in the top phase and partition coefficients for the GMP in each ATPS formed for PEG1500-sodium citrate, at different compositions of the assayed ATPS. pH 8.0.

TLL (mass %)	STL	PEG (mass %)	Salt (mass %)	K_p	y (%)
298.15 K					
24.08	1.50	14.00	14.89	8.82 ± 0.12	85.60 ± 0.28
32.31	1.43	14.25	17.23	15.60 ± 0.13	90.76 ± 0.08
34.60	1.38	15.00	19.25	29.74 ± 0.35	94.31 ± 0.06
308.15 K					
26.57	1.53	14.00	14.52	8.56 ± 0.49	85.92 ± 0.72
31.27	1.49	14.25	16.62	18.39 ± 0.86	91.51 ± 0.37
36.60	1.41	15.00	18.79	24.66 ± 0.75	93.55 ± 0.27
318.15 K					
27.93	1.54	14.00	14.93	10.99 ± 0.40	87.77 ± 1.40
30.54	1.48	14.25	16.77	20.60 ± 0.50	91.25 ± 0.21
34.96	1.46	15.00	18.91	33.41 ± 0.10	94.66 ± 0.03

Table III. Theoretical recoveries in the top phase and partition coefficients for the GMP in each ATPS formed for PEG2000-sodium citrate, at different compositions of the assayed ATPS. pH 8.0

TLL (mass %)	STL	PEG (mass %)	Salt (mass %)	K_p	y (%)
298.15 K					
22.00	1.65	14.00	14.53	5.16 ± 0.07	81.07 ± 0.26
26.90	1.57	14.25	16.21	6.09 ± 0.19	86.52 ± 0.05
31.20	1.55	18.00	17.40	8.86 ± 0.01	86.66 ± 0.05
308.15 K					
18.37	2.04	14.00	11.92	2.89 ± 0.02	69.12 ± 0.03
25.04	1.85	14.25	13.62	5.17 ± 0.18	77.93 ± 0.74
30.36	1.81	15.00	15.04	9.44 ± 0.09	83.92 ± 0.45
318.15 K					
25.40	2.20	14.00	11.40	3.08 ± 0.30	65.07 ± 2.25
29.81	2.10	14.25	12.68	3.71 ± 0.30	68.04 ± 2.16
35.46	2.05	15.00	13.59	5.70 ± 0.08	76.83 ± 0.26

Table IV. Theoretical recoveries in the top phase and partition coefficients for the GMP in each ATPS formed for PEG4000-sodium citrate, at different compositions of the assayed ATPS. pH 8.0.

TLL (mass %)	STL	PEG (mass %)	Salt (mass %)	K_p	y (%)
298.15 K					
35.52	1.77	14.00	14.85	2.31 ± 0.29	60.01 ± 2.99
38.13	1.64	14.25	16.81	4.14 ± 0.46	72.07 ± 2.40
43.17	1.68	15.00	18.36	5.01 ± 0.35	73.27 ± 1.39
308.15 K					
37.99	1.88	14.00	14.98	2.19 ± 0.07	59.80 ± 0.71
41.92	1.78	14.25	17.24	4.96 ± 0.31	74.33 ± 3.04
44.04	1.64	15.00	18.65	5.54 ± 0.14	76.30 ± 1.13
318.15 K					
39.32	1.93	14.00	14.87	2.05 ± 0.18	54.52 ± 2.17
42.84	1.89	14.25	16.42	3.47 ± 0.04	65.02 ± 0.32
44.61	1.71	15.00	18.95	6.77 ± 0.13	78.65 ± 0.32

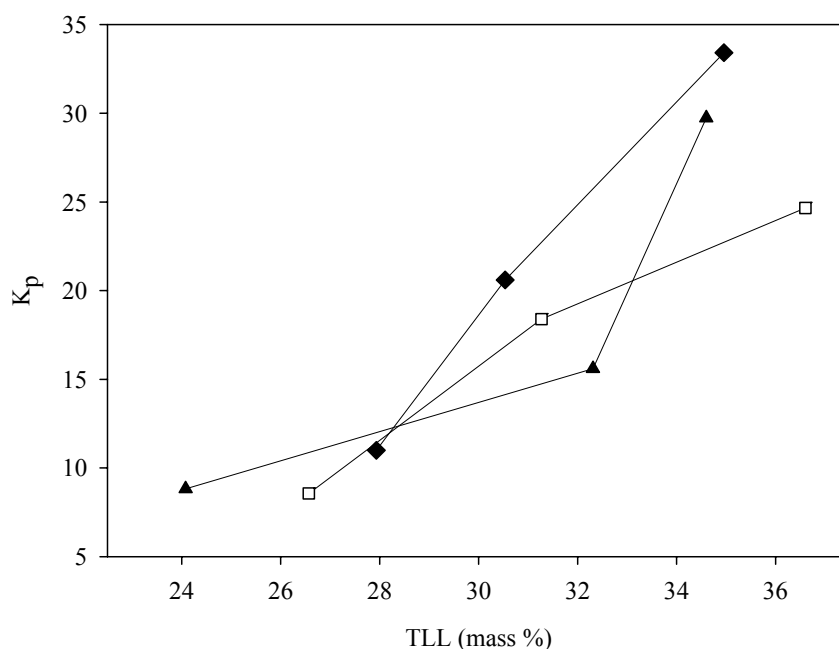


Figure 2. Dependence of the GMP partition coefficients on the TLL for the PEG1500-sodium citrate ATPS at different temperatures of the system. 298.15 K (▲), 308.15 K (□), and 318.15 K (◆). pH 8.0.

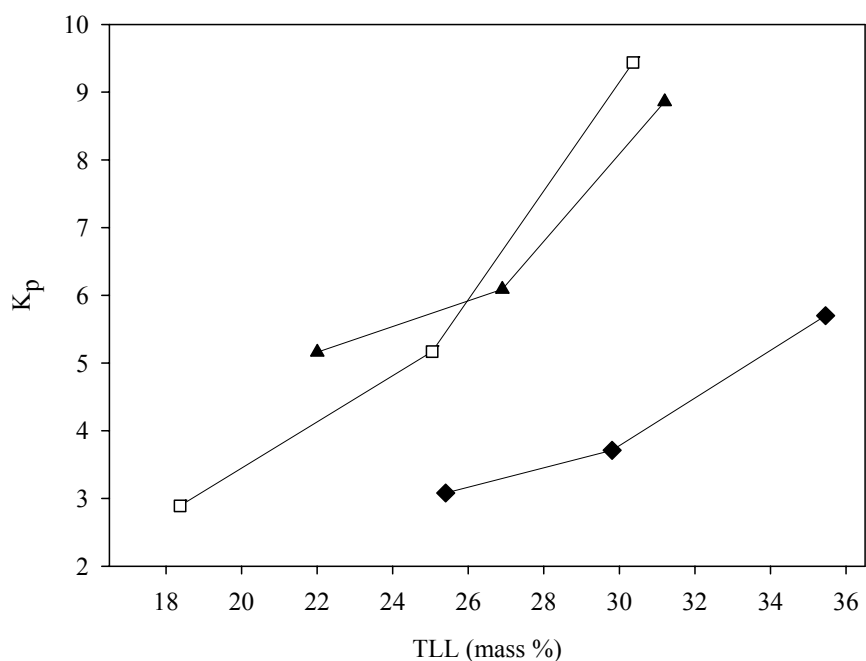


Figure 3. Dependence of the GMP partition coefficients on the TLL for the PEG2000-sodium citrate ATPS at different temperatures of the system. 298.15 K (▲), 308.15 K (□), and 318.15 K (◆). pH 8.0.

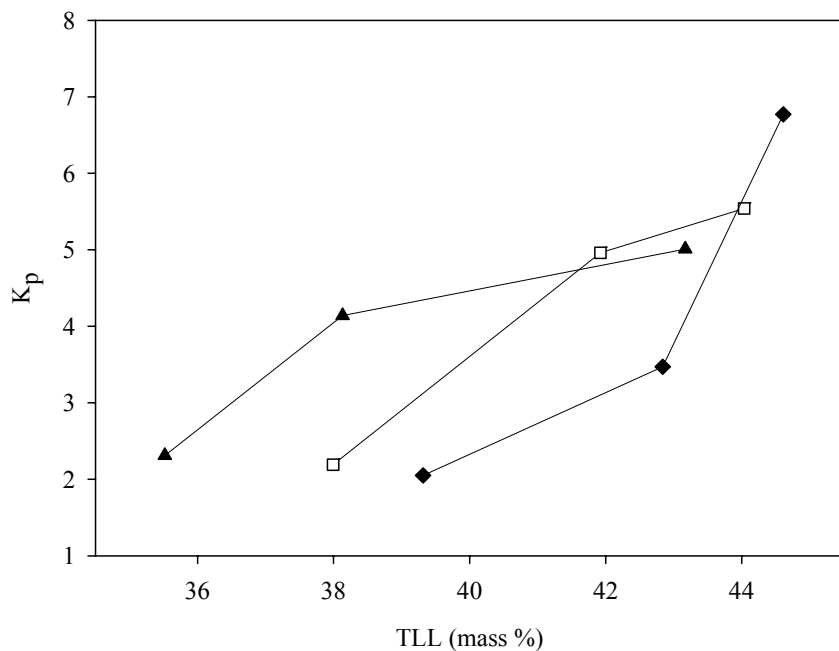


Figure 4. Dependence of the GMP partition coefficients on the TLL for the PEG4000-sodium citrate ATPS at different temperatures of the system. 298.15 K (▲), 308.15 K (□), and 318.15 K (◆). pH 8.0.

Conclusions

In all cases, the GMP partitioning behavior showed that it is possible to change the degree of partitioning by selecting the right conditions of the system. The results show that the GMP is obtained in the PEG-rich phase, where the prevalent non-protein contaminants are PEG and a little amount of the sodium citrate (a biodegradable and nontoxic salt), which can easily be removed from the target protein by means of size exclusion chromatography technique. Moreover it was verified that the GMP partitioning can be influenced by many factors, including PEG molar mass, TLL, temperature and pH. It has been observed that lower molar mass of PEG1500 is beneficial for extraction of GMP. When the 15.00 mass % of PEG1500 + 18.91 mass % of sodium citrate + water ATPS was operated at pH 8.0 and temperature 318.15 K without addition of sodium chloride, approximately 94.66 % of GMP was recovered in the top phase. This study has clearly shown that ATPS can be successfully used for recovery and initial purification of GMP.

References

- [1] C. Thoma-Worringer, J. Sørensen, and R. López-Fandiño. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. **International Dairy Journal** 16 (2006) 1324–1333.
- [2] T. L. Mikkelsen, H. Frøkiær, C. Topp, F. Bonomi, S. Iametti, G. Picariello, P. Ferranti, and V. Barkholt. Caseinomacropeptide Self-Association is Dependent on Whether the Peptide is Free or Restricted in κ -Casein. **Journal of Dairy Science** 88 (2005) 4228–4238.
- [3] M.H. Abd El-Salam, S. El-Shibini, and W. Buchheim. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. **International Dairy Journal** 6 (1996) 327-341.
- [4] L.A. Oliveira, L.A. Sarubbo, A.L.F. Porto, G.M. Campos-Takaki, and E.B. Tambourgi. Partition of trypsin in aqueous two-phase systems of poly (ethylene glycol) and cashew-nut tree gum. **Process Biochemistry** 38 (2002) 693-699.
- [5] Z. Gu, and C. E. Glatz. Aqueous two-phase extraction for protein recovery from corn extracts. **Journal of Chromatography B** 845 (2007) 38–50.

- [6] D. Balasubramaniam, C. Wilkinson, K. Van Cott, and C. Zhang. Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction. **Journal of Chromatography A** 989 (2003) 119-129.
- [7] T. Muregesan, and M. Perumalsamy. Liquid-Liquid Equilibria of Poly (ethylene glycol) 2000 + Sodium Citrate + Water at (25, 30, 35, 40, and 45) °C. **Journal of Chemical and Engineering Data** 50 (2005) 1392-1395.
- [8] A. Boaglio, G. Bassani, G. Picó, and B. Nerli. Features of the milk whey protein partitioning in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems with the goal of isolating human alpha-1 antitrypsin expressed in bovine milk. **Journal of Chromatography B** 837 (2006) 18-23.
- [9] P.A. Albertsson, **Partition of Cell Particles and Macromolecules**, third ed., Wiley, New York, 1986.
- [10] C.P. Carvalho, J.S.R. Coimbra, I.A.F. Costa, L.A. Minim, L.H.M. Silva, and M.C. Maffia. Equilibrium data for PEG 4000 + salt + water systems from (278.15 to 318.15) K. **Journal of Chemical and Engineering Data** 52 (2007) 351-353.
- [11] Y. Kawasaki, H. Kawakami, M. Tanimoto, S. Dosako, A. Tomizawa, M. Kotake, and I. Nakajima. pH-Dependent molecular weight changes of kappa-casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. **Milchwissenschaft** 48 (1993) 191–196.
- [12] B.Y. Zaslavsky, in: B.Y. Zaslavsky (Ed.), **Aqueous two-phase partitioning. Physical Chemistry and Bioanalytical Applications**, Marcel Dekker, New York, 1994.
- [13] D. Spelzini, B. Farruggia, and G. Picó. Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–phosphate: Chymosin and pepsin. **Journal of Chromatography B** 821 (2005) 60-66.
- [14] E.E.G. Rojas, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, A.D.G. Zuniga, S. H. Saraiva, and V.P.R. Minim. Size-exclusion chromatography applied to the purification of whey proteins from the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry** 39 (2004) 1751-1759.

- [15] T. Arakawa, and S.N. Timasheff. Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. **Biochemistry** 21 (1982) 6545-6552.
- [16] F. Vojdani. Solubility. In G.M. Hall (Ed.), **Methods of testing protein functionality**, Blackie Academic and Professional, London, 1996.
- [17] M.C. Almeida, A. Venancio, J.A. Teixeira, and M.R. Aires-Barros. Cutinase purification on poly(ethylene glycol)–hydroxypropyl starch aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B** 711 (1998) 151-159.
- [18] S. Saravanan, J. R. Rao, T. Murugesanb, B. U. Nair, and T. Ramasami. Partition of tannerywastewater proteins in aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-magnesium sulfate systems: Effects of molecular weights and pH. **Chemical Engineering Science** 62 (2007) 969-978.
- [19] S.T. Griffin, M. Dilip, S.K. Spear, J.G. Huddleston, and R.D. Rogers. The opposite effect of temperature on polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems versus aqueous biphasic extraction chromatographic resins. **Journal of Chromatography B** 844 (2006) 23-31.
- [20] G. Tubio, B. Nerli, and G. Pico. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–dextran. **Journal of Chromatography B** 799 (2004) 293-301.