

PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相相平衡数据的关联及木瓜蛋白酶在该体系中分配模型的建立

董安华, 彭健, 许英豪, 王伟涛, 蒋欣欣, 张海德
(海南大学食品学院, 海南海口 570228)

摘要: 为了研究木瓜蛋白酶在双水相中的分配行为, 用浊点法测定了聚乙二醇(2000、4000、6000)/硫酸铵双水相体系在 298.15 K 下的双节线和液液相平衡数据, 采用 Merchuk 方程、Othmer-Tobisa 方程和 Bancroft 方程对双节线数据、液液相平衡数据进行了关联, 并建立了木瓜蛋白酶在 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系中的分配模型。通过相关系数考察双水相各组分浓度与分配系数的相关度, 得到分配系数的对数与上下相组分的浓度差相关度较高, 提出了木瓜蛋白酶分配系数与双水相成相组分浓度差的经验关系式, 木瓜蛋白酶分配系数的计算值与实验值之间的相对偏差小于 10% 且小于其他同类模型, 表明实验建立的模型对木瓜蛋白酶在聚乙二醇(2000、4000、6000)/硫酸铵双水相体系中关联效果较好, 可用于木瓜蛋白酶分配系数的计算, 为双水相体系中木瓜蛋白酶酶活分配系数的工程计算和双水相萃取过程的设计提供参考。

关键词: 双水相; 液液相平衡; 分配模型; 木瓜蛋白酶

文章编号: 1673-9078(2014)10-194-199

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.033

Correlation of PEG/(NH₄)₂SO₄ Aqueous Two-phase Equilibrium Data and Modeling of Partition of Papain

DONG An-hua, PENG Jian, XU Ying-hao, WANG Wei-tao, JIANG Xin-xin, ZHANG Hai-de
(College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In order to investigate the partition of papain in aqueous two-phase systems, the liquid-liquid phase equilibrium data of the aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) (2000, 4000, 6000) /ammonium sulfate was measured by cloud point measurements at T=298.15 K. The experimental binodal data and liquid-liquid phase equilibrium data were correlated using the Merchuk, Othmer-Tobisa, and Bancroft equations. A model was established to describe the partition of papain in the PEG/(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase system. The degree of correlation between the component concentrations and partition coefficients in different groups of the aqueous two-phase system was examined using relevant coefficients. The logarithm of the partition coefficient and the concentration difference between the two-phase components had a relatively high correlation; meanwhile, an empirical equation describing the papain partition coefficient and concentration difference between the aqueous two-phase components was developed. The mean relative deviation between the experimental and calculated papain partition coefficients was less than 10%, and was also less than the values from similar models. This confirmed that the established model revealed a good correlation between papain in PEG/(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase system and could be used for calculation of papain partition coefficients. The result provided references for engineering calculations of papain partition coefficients in aqueous two-phase systems and design of aqueous two-phase extraction processes.

Key words: aqueous two-phase system; liquid-liquid phase equilibrium; partition model; papain

木瓜蛋白酶来源于未成熟番木瓜果实的新鲜乳汁, 是一种含有巯基的肽链内切酶, 由 212 个氨基酸组成, 由于其耐高温、稳定性好、水解能力强等特点

收稿日期: 2014-05-04

基金项目: 国家自然科学基金(31260401); 海南大学服务地方经济社会发展项目(HDSF201306)

作者简介: 董安华(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物的提取

通讯作者: 张海德(1970-), 男, 教授, 研究方向: 天然产物的提取

被广泛用于食品、医药等领域^[1]。但是, 现有的制备木瓜蛋白酶的方法纯度不高, 规模化生产不足, 高纯度的木瓜蛋白酶主要依赖于进口。因此, 对木瓜蛋白酶分离行为和机制的研究非常紧迫。

双水相体系(Aqueous two-phase system)是指某些亲水性的高分子聚合物与聚合物或聚合物与无机盐溶解在水中, 超过一定浓度能自然分成互不相溶的两相或多相的体系^[2]。双水相由于其萃取条件温和, 易

于放大, 容易操作等特点^[3], 已广泛应用于核酸、蛋白质和病毒等生物产品的分离纯化^[4], 是极有前途的新型分离技术^[5]。该技术在应用方面取得了较大的进展, 但是关于双水相系统的形成机理及生物物质在其中的分配行为的理论探讨仍十分薄弱。

近年来, 对双水相体系相平衡及分配系数的研究十分活跃。Mohammed Taghi Zafarani 等^[6]用 Othmer-Tobias 和 Bancroft 方程对聚乙烯吡咯烷酮 3500/硫酸钠双水相相平衡数据进行了关联, 结果较理想。谢国红等^[7]用一个修饰的多元维里渗透模型描述了 Triton X-100/无机盐双水相体系的相平衡, 研究表明模型模拟效果较好。对于双水相分配系数的模型近年来也时有报道, Mirjana A 等^[8]研究了果胶酶在 PEG/Na₂SO₄ 双水相系统中的分配行为, 采用响应面实验设计方法建立了统计学模型, 预测果胶酶分配比与双水相成相剂的关系。Diamond 和 Hsu^[9]关联了 PEG/葡聚糖体系的分配系数与 PEG 的质量分数, 结果表明对于双聚合物体系分配系数的预测效果较好。

目前关于木瓜蛋白酶双水相萃取的研究主要集中在双水相体系优化这个阶段, 对于其分配理论的研究报道比较少。本文采用浊点法测定了 PEG/(NH₄)₂SO₄ 在 298.15 K 下的双节线及相平衡的数据, 并通过经验方程对数据进行了关联; 研究了木瓜蛋白酶分配系数与双水相体系特征值的相关度, 并建立了木瓜蛋白酶在该体系中的分配系数模型。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

木瓜蛋白酶 (BR) 生物生工有限公司; PEG2000 (化学纯)、PEG4000 (化学纯)、PEG6000 (化学纯), 国药集团化学试剂有限公司; 硫酸铵 (分析纯)、甲醛溶液 (分析纯)、氢氧化钠 (分析纯) 广州化学试剂厂; 其他均为市售分析纯。

1.2 仪器与设备

TU1901 紫外可见分光光度计, 北京普析通用有限责任公司; DK-98-1 型恒温水浴锅, 天津泰斯特仪器有限公司; PHS-3C 型 pH 计, 上海雷磁仪器厂; 阿贝折射仪, 上海光学仪器一厂。

1.3 方法

1.3.1 双节线的测定

利用浊点滴定法测定双节线的组成, 在 298.15 K

恒温条件下进行操作。取一定量已知浓度的不同分子量的 PEG 放在 100 mL 的小烧杯里, 向其中滴加已知浓度的 (NH₄)₂SO₄ 溶液, 同时利用磁力搅拌器进行搅拌直到溶液出现浑浊, 变为两相区。算出浊点时溶液各组分的质量百分含量。再向浑浊溶液中滴加去离子水, 直至溶液变为澄清, 变为单相区, 再继续滴加已知浓度的 (NH₄)₂SO₄ 溶液直到下一个浑浊点出现, 反复重复上述操作。

1.3.2 液-液相平衡数据的测定

以相图为指导, 选取大致适当的点配置溶液, 将溶液加入 50 mL 的离心管中, 在恒温振荡器上振荡半小时, 在 25 °C 下放置 2.5 h, 待溶液分相完全, 体系达到平衡, 测定上下相各组分质量分数。上下相中 (NH₄)₂SO₄ 的质量分数由甲醛滴定法^[10]来确定, PEG 的质量分数由测得的折射率来确定^[11]。折射率 n , PEG 的质量分数 w_p , (NH₄)₂SO₄ 的质量分数 w_s , 三者之间的关系为:

$$n = a_0 + a_1 w_p + a_2 w_s \quad (1)$$

方程参数见表 1。

表 1 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相方程 (1) 参数

Table 1 Parameters in Equation (1) for PEG/(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase system.

a_0	a_1	a_2
1.3310	PEG2000, 1.41×10^{-3}	
	PEG4000, 1.50×10^{-3}	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.47×10^{-3}
	PEG6000, 1.46×10^{-3}	

1.3.3 双水相萃取木瓜蛋白酶及其酶活的测定

双水相体系按质量进行配置, 各组分用质量分数表示, 体系总质量为 20.0 g, 木瓜蛋白酶的添加量为 20.0 mg, 体系 pH 值固定为 7.0, 恒温振荡 30 min 混合均匀, 体系在 25 °C 下静置分相, 读取上下相体积。以酪蛋白为反应底物, 在 275 nm 测定上下相的吸光值, 计算上下相木瓜蛋白酶的酶活 U ^[12], 按 1.3.2 方法测定上下相各组分的含量。

1.3.4 数据处理及数据分析

采用 Origin8.0 和 Mathematic9.0 对数据进行处理和分析, 每组均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 双节线数据的关联

采用 1.3.1 的方法测定 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系中双节线上的数据, 并通过 Merchuk 方程对实验数据

进行关联。

$$w_p = a \exp(bw_s^{0.5} - cw_s^3) \quad (2)$$

a 、 b 、 c 为经验方程参数， w_p 和 w_s 分别代表PEG和 $(NH_4)_2SO_4$ 的质量分数。近年来，Merchuk方程已经成功的用于聚合物/盐和离子液体/盐双水相双节线数据的关联。Merchuk经验方程形式简洁，比Pitzer、Cabezas等半经验半理论的热力学模型具有更广泛的实际应用价值^[13]。相关系数(R^2)和标准偏差(sd)见表2。从表2中可知，双节线关联方程的关联度很好，对此体系双水相相图的制作有现实的指导意义。

表2 298.15K时PEG/(NH₄)₂SO₄双节线关联结果

Table 2 Binodal correlation results of PEG/(NH₄)₂SO₄ system at 298.15 K

PEG 分子量	a	b	c	R^2	sd^a
PEG2000	88.87	-0.49	6.14×10^{-4}	0.9992	0.25
PEG4000	62.29	-0.35	7.35×10^{-4}	0.9995	0.1
PEG6000	96.12	-0.53	7.22×10^{-4}	0.9998	0.08

注： $sd^a = \sqrt{\sum_{i=1}^N (w_p^{cal} - w_p^{exp})^2} / N$ ， N 是双节点的数。

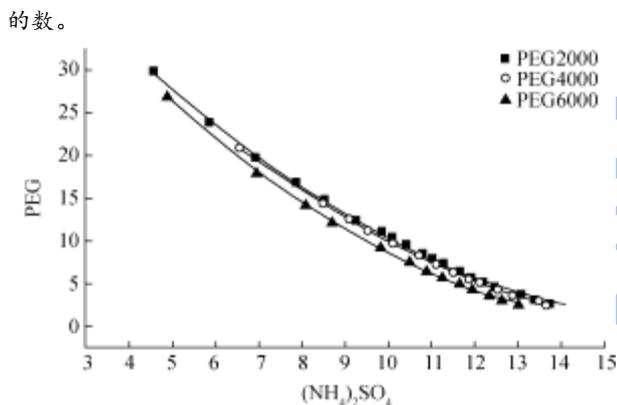


图1 T=298.15K 温度下 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相双节曲线

Fig.1 Binodal curve of the PEG/(NH₄)₂SO₄ system at 298.15 K

2.2 利用 Othmer-Tobias 和 Bancroft 方程对液液平衡数据进行关联

Othmer-Tobias 和 Bancroft 经验关联方程^[6]的表达式如下：

$$\left(\frac{1-W_p^t}{W_p^t}\right) = K \left(\frac{1-W_s^b}{W_s^b}\right)^n \quad (3)$$

$$\left(\frac{W_w^b}{W_s^b}\right) = K_1 \left(\frac{W_w^t}{W_p^t}\right)^r \quad (4)$$

W_p^t 代表上相中PEG的质量分数， W_s^b 代表下相中 $(NH_4)_2SO_4$ 的质量分数， W_w^t 、 W_w^b 代表上相、下相中水的质量分数， K 、 K_1 、 n 和 r 为方程参数。

表3 PEG/(NH₄)₂SO₄双水相方程(3)和方程(4)中的参数

Table 3 Parameters of Equations (3) and (4) for PEG/(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase system

PEG 分子量	K	n	R^2	K_1	r	R^2
2000	0.3039	1.3027	0.9994	2.4894	0.7877	0.9980
4000	0.2354	1.4243	0.9963	2.8151	0.701	0.9942
6000	0.3250	1.1172	0.9973	2.7759	0.9339	0.9980

将298.15 K时PEG/(NH₄)₂SO₄体系液液相平衡实验数据做图2、图3，结果见表3。线性相关系数(R^2)表明Othmer-Tobias方程和Bancroft方程可以很好的关联PEG/(NH₄)₂SO₄相平衡的数据。

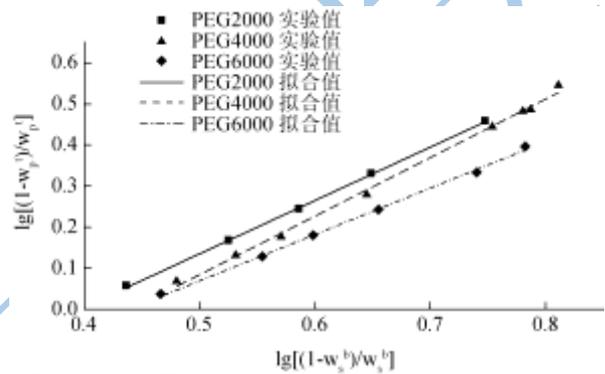


图2 Othmer-Tobias 方程的线性相关性

Fig.2 Linear correlation of the Othmer-Tobias equation

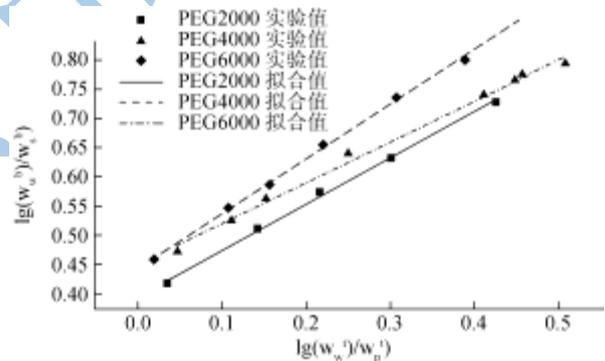


图3 Bancroft 方程的相关性

Fig.3 Linear correlation of the Bancroft equation.

由回归参数和下相各组分质量分数可以计算上相各组分的质量分数，结果见表4，PEG2000、PEG4000和PEG6000的平均相对误差分别为0.0059%、0.015%、-0.33%。 $(NH_4)_2SO_4$ 的平均绝对误差分别为-0.018%，-0.0025%，0.0035%。可见，方程拟合结果较好。

2.3 分配系数模型

双水相体系中木瓜蛋白酶的分配系数 K 定义为双水相相后上相中木瓜蛋白酶酶活(U_t)与下相中木瓜蛋白酶酶活(U_b)的比值，公式表达如下：

$$K = \frac{U_t}{U_b} \quad (5)$$

变量 x 和 y 的相关度 ρ 定义为

$$\rho(x, y) = \frac{\text{cov}(x, y)}{\sqrt{Dx} \sqrt{Dy}} \quad (6)$$

式中

$$\text{cov}(x, y) = E[(x - Ex)(y - Ey)] \quad (7)$$

$$Dx = E(x - Ex)^2 \quad (8)$$

$$Ex = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (9)$$

表 4 298.15K 时 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相液相平衡拟合结果

Table 4 Fitting result of liquid-liquid equilibrium of PEG/(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase system at 298.15 K

实验值			拟合值			误差		
PEG/Wt%	(NH ₄) ₂ SO ₄ /Wt%	H ₂ O/Wt%	PEG/Wt%	(NH ₄) ₂ SO ₄ /Wt%	H ₂ O/Wt%	PEG/Wt% ^{**}	(NH ₄) ₂ SO ₄ /Wt% [*]	H ₂ O/Wt% ^{**}
PEG2000+(NH ₄) ₂ SO ₄								
25.86	5.49	68.65	25.92	5.87	68.21	0.23	0.38	-0.64
31.89	4.30	63.81	32.00	4.14	63.85	0.34	-0.16	0.06
36.45	3.64	59.91	36.20	3.15	60.64	-0.68	-0.49	1.21
40.65	3.01	56.34	40.55	2.83	56.63	-0.24	-0.18	0.51
46.83	2.37	50.80	47.01	2.73	50.27	0.38	0.36	-1.04
PEG4000+(NH ₄) ₂ SO ₄								
24.59	5.07	70.34	24.36	5.16	70.48	-0.94	0.09	0.20
26.45	5.24	68.31	26.47	5.10	68.44	0.077	-0.14	0.0019
24.80	5.62	69.58	24.71	5.36	69.94	-0.36	-0.26	0.52
22.23	6.07	71.60	22.88	6.48	70.64	2.92	0.41	-0.013
34.61	3.85	61.54	33.84	3.12	63.03	-2.22	-0.73	2.42
42.39	2.8	54.77	42.65	2.87	54.49	0.61	0.07	-0.51
46.18	2.44	51.38	46.84	2.87	50.29	1.43	0.43	-2.12
40.08	3.11	56.82	39.52	3.22	57.27	-1.40	0.11	0.0079
PEG6000+(NH ₄) ₂ SO ₄								
27.77	4.40	67.84	28.89	5.54	65.77	4.02	0.95	-3.14
31.75	3.84	64.41	31.41	4.32	64.27	-1.07	0.48	-0.22
36.33	3.38	60.30	35.38	3.78	60.83	-2.60	0.41	0.87
39.89	2.93	57.18	38.95	3.21	57.83	-2.36	0.29	1.13
42.76	2.48	54.77	42.46	2.64	54.88	-0.69	0.17	0.22
47.78	2.19	50.03	48.13	2.01	49.87	0.72	-0.18	-0.32

注：“***”表示平均相对误差，“*”表示平均绝对误差。

表 5 分配系数与双水相体系组分浓度的相关度

Table 5 Correlation between partition coefficient and difference in the concentrations of components in an aqueous two-phase system.

	ρ					
	PEG ^t	(NH ₄) ₂ SO ₄ ^t	PEG ^b	(NH ₄) ₂ SO ₄ ^b	Δ PEG	Δ (NH ₄) ₂ SO ₄
lnK (PEG2000)	0.6331	-0.4586	-0.2347	0.6983	0.8737	0.9001
lnK (PEG4000)	0.5771	-0.5507	-0.4221	0.6639	0.7835	0.8321
lnK (PEG6000)	0.5894	0.3219	0.4786	0.6383	0.7253	0.8579

注：t代表上相，b代表下相， Δ 代表上下相浓度差。

根据双节线拟合方程和液液相平衡的实验数据，选取不同组成的双水相体系萃取木瓜蛋白酶，测定上下相组分及酶活，考察组分浓度与分配系数的相关度，见表 5。从表 5 可以看出分配系数与上下相各组分浓

度的相关度较低且相关系数都小于 0.7，但与 PEG 的上下相浓度差和(NH₄)₂SO₄ 的上下相浓度差的相关性较好且相关系数都大于 0.7。关联体系的分配系数与 PEG 和(NH₄)₂SO₄ 在上下相的浓度差得：

$$\frac{\ln K - C}{\sqrt{w_p^2 + w_s^2}} = A(w_p^2 + w_s^2) + B\sqrt{w_p^2 + w_s^2} \quad (10)$$

w_p 、 w_s 分别代表 PEG 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在上下相中的浓度差， A 、 B 、 C 代表方程参数。方程形式与 Diamond-Hus 模型相似。用上述模型模拟了木瓜蛋白酶在 PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相中的酶活分配系数，用

Mathematic 软件对模型(10)进行了回归，参数拟合采用最小二乘法，结果见表 6、图 4、图 5 和图 6。由表 6 可知，本文模型的相对偏差均小于 10%，与 Diamond-Hus^[9]模型和彭钦华等^[15]提出的模型相比，本实验建立的模型相对偏差较小。

表 6 模型参数和分配系数预测值与实验值的相对偏差

Table 6 Parameters of models and relative deviations between predicted and experimental partition coefficients

双水相组成	A	B	C	ARD / %		
				本文模型	彭钦华模型	D-H 模型
PEG2000+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-337.45	378.97	-102.19	9.21	21.75	25.35
PEG4000+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	288.80	-103.66	-17.72	3.75	28.22	20.27
PEG6000+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	198.35	-110.63	5.56	3.45	29.94	19.46

注： $ARD = \frac{1}{N} (\sum (K^{cal} - K^{exp}) / K^{exp})$ ，相对偏差。

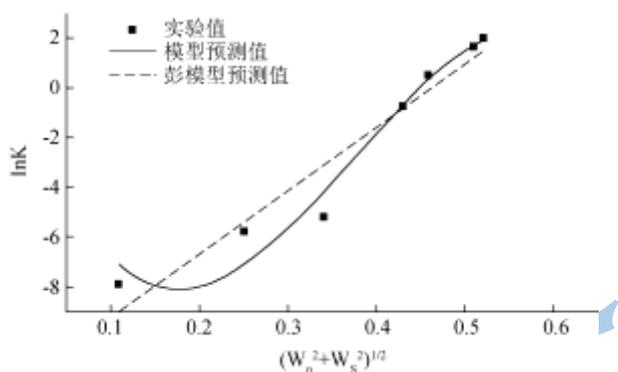


图 4 PEG2000/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相中木瓜蛋白酶分配系数的预测值

Fig.4 Prediction of papain partition coefficient for PEG2000/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aqueous two-phase system

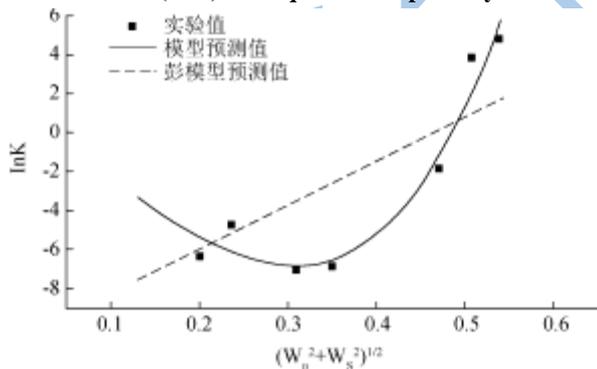


图 5 PEG4000/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相中木瓜蛋白酶分配系数的预测值

Fig.5 Prediction of papain partition coefficient for PEG4000/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aqueous two-phase system

图 4、图 5 和图 6 给出了木瓜蛋白酶在 PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系的酶活分配系数与浓度差的关联结果，由图可得，分配系数的对数与浓度差呈线性关系，拟合结果令人满意，说明本实验建立的模型是有效的。从图 4、图 5、图 6 和表 6 中的相对偏差

的比较均可看出，本实验建立的模型与其他模型相比有较大的改进。虽然 PEG2000 的相对偏差大于 PEG4000 和 PEG6000，但其相对偏差均小于 10%，说明本实验建立的分配模型适用于拟合木瓜蛋白酶在 PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系中的分配行为。在本实验建立的体系中，木瓜蛋白酶在 PEG4000 体系中的分配系数较高于 PEG2000 体系，与文献^[15]报道一致。其原因可能是由于盐离子的水化作用，使木瓜蛋白酶表面疏水区附近的水化层脱离而暴露疏水区域，增大了木瓜蛋白酶表面的疏水性，导致木瓜蛋白酶更倾向于进入 PEG 分子量较大的一相。

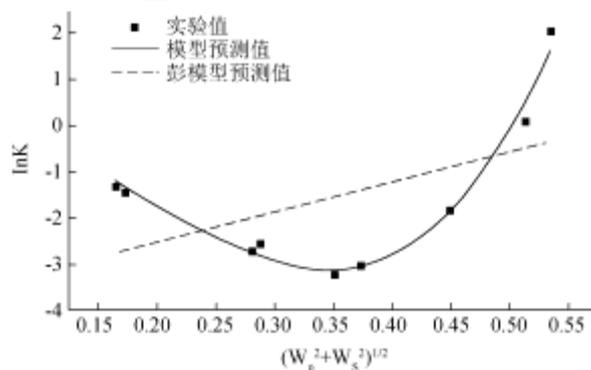


图 6 PEG6000/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相中木瓜蛋白酶分配系数的预测值

Fig.6 Prediction of papain partition coefficient for PEG600/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aqueous two-phase system.

3 结论

在 298.15 K 温度下，测定了 PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系的液液相平衡数据。用非线性 Merchuk 参数方程关联双节线数据，效果较为理想。通过 Othmer-Tobias 和 Bancroft 方程关联了液液相平衡的数

据,列出各方程的参数,丰富了双水相液液相平衡的数据库。实验测定了 298.15 K 温度下木瓜蛋白酶在 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系中的酶活分配系数,并用实验建立的模型对分配系数进行了关联,相对偏差均在 10%以内,计算值与实验值符合较好,且 PEG4000 和 PEG6000 分配模型的相对偏差小于 PEG2000 分配模型的相对偏差,本实验建立的模型对大分子量的 PEG 拟合效果更好。实验测定的液液相平衡数据和建立的分配模型可为双水相萃取过程的设计和木瓜蛋白酶在双水相体系中酶活分配系数的工程计算提供参考。

参考文献

- [1] 张海德,王伟涛,蒋欣欣.木瓜蛋白酶在亲和双水相系统中的分配行为及机制研究进展[J].食品安全质量检测学报, 2013, 4(2):328-332
ZHANG Hai-de, WANG Wei-tao, JIANG Xin-xin. Progress on the study of mechanism and partition behavior of papain in affinity aqueous two-phase systems [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2013, 4(2): 328-332
- [2] Farahnaz J, Mozaffar A, Nahid H. Thermodynamic equilibrium of the polyethylene glycol 2000 and sulphate salts solutions [J]. J. Chem. Thermodynamics, 2014, 69: 125-131
- [3] 苏艳玲.PEG/(NH₄)₂SO₄双水相体系萃取杏鲍菇多糖[J].现代食品科技,2013,29(6):1333-1336
SU Yan-ling. Extraction of pleurotus eryngii polysaccharides with peg/(nh₄)₂so₄ two-phase aqueous system [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1333-1336
- [4] Luisa A F, Pier P, Jose A T, et al. Effect of NaCl additive on properties of aqueous PEG-sodium sulfate two-phase system [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1220: 14-20
- [5] Riedl W, Raiser T. Membrane-supported extraction of biomolecules with aqueous two-phase systems [J]. Desalination, 2008, 224(1-3): 160-167
- [6] Zafarani-Moattar M T, Abdizadeh-Aliyar V. Phase diagrams for (liquid+liquid) and (liquid+solid) equilibrium of aqueous two-phase system containing {poly(vinylpyrrolidone) 3500(PVP3500) +sodium sulfite (Na₂SO₃)+water} at different temperatures [J]. J. Chem. Thermodynamics, 2014, 72: 125-133
- [7] 谢国红,王跃军,孙溢.Triton X-100-无机盐双水相体系的平衡模型及碱性蛋白酶在该体系中的分配系数模型[J].化工学报,2006,57(9):2027-2032
XIE Hong-guo, WANG Yue-jun, SUN Mi. Modeling of triton x-100-salt aqueous two-phase systems and distribution of alkaline protease [J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2006, 57(9): 2027-2032
- [8] Mirjana A, Radovan O. Pectinase partitioning in polyethylene glycol 1000/Na₂SO₄ aqueous two-phase system: statistical modeling of the experimental results [J]. Bioprocess Biosyst. Eng., 2009, 32: 235-240
- [9] Diamond A D, Hus J T. Correlation of protein partitioning in aqueous two-phase systems [J]. Journal of Chromatography A, 1990, 513: 137-143
- [10] 陆瑾.温度诱导双水相金属螯合亲和分配技术的研究[D].浙江:浙江大学,2004
LU Jin. Study on a novel separation technology combining metal chelating affinity partitioning and temperature-induced phase separation with aqueous two-phase partitioning [D]. Zhejiang University, 2004
- [11] Zafarani-Moattar M T, Sadeghi R. Liquid-liquid equilibrium of an aqueous two phase system containing polyethyleneglycol and sodium citrate: experimental and correlation [J]. Fluid Phase Equilib, 2004, 219: 149-155
- [12] 张兴灿,陈朝银,李汝荣.木瓜蛋白酶的活力检测标准研究[J].食品工业科技,2011,32(10):435-437
ZHANG Xin-can, CHEN Chao-yin, LI Ru-rong. Study on determination standards of papain activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(10): 435-437
- [13] Zafarani-Moattar M T, Emamian S, Hamzehzadeh S. Effect of temperature on the phase equilibrium of the aqueous two-phase poly(propylene glycol)+tripotassium citrate system [J]. Chem. Eng. Data, 2008, 53(2): 456-461
- [14] 彭钦华,李总成,李以圭.蛋白质-磷酸钾-聚乙二醇双水相体系热力学研究[J].化工学报,1994,45(5):515-522
PENG Qin-hua, LI Zong-cheng, LI Yi-gui. Thermodynamics of protein-K₂HPO₄-KH₂PO₄-PEG aqueous two-phase systems [J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 1994, 45(5): 515-522
- [15] 乐薇,陆志强.双水相体系萃取木瓜蛋白酶的研究[J].化学与生物工程,2011,28(2):40-42
YUE Wei, LU Zhi-qiang. Study on extraction of papain by aqueous two-phase system [J]. Chemistry & Bioengineering, 2011, 28(2): 40-42