

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale

in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

Cromatografia ad interazione idrofobica: valutazione dei fenomeni di adsorbimento di proteine in relazione alla variabilità di resine commerciali



Relatori

prof. Roberto Pisano

prof. Antonello Barresi

Candidato

Lorenzo Durbiano

Dicembre 2021

SOMMARIO

1. Introduzione	5
1.1. Il processo cromatografico	5
1.2. I meccanismi che caratterizzano la cromatografia	10
1.3. Cromatografia ad interazione idrofobica	12
1.4. Metodologia high-throughput per lo screening dei processi cromatografici	16
1.5. Obiettivo.....	21
2. Materiali e metodi	23
2.1. Materiali	23
2.2. Procedura sperimentale per la determinazione delle isoterme	24
2.3. Analisi dei dati	28
2.4. Elaborazione dei dati.....	28
2.5. Valutazione dell'errore	31
2.6. Programmazione degli esperimenti.....	33
3. Presentazione dei risultati	37
3.1. Risultati delle prove sperimentali	37
3.2. <i>Fitting</i> dei dati sperimentali	40
3.3. Variabilità dei lotti di resina: confronto dei risultati.....	54
4. Conclusioni	59
Lista simboli.....	61
Bibliografia	63
Appendice A	65
Appendice B.....	67
Appendice C.....	69
Appendice D	73

1. Introduzione

1.1. Il processo cromatografico

I prodotti biofarmaceutici hanno assunto, nell'ultimo decennio, un'elevata rilevanza all'interno dell'industria farmaceutica; essi sono costituiti principalmente da proteine terapeutiche ^[1,2]. Il processo di produzione di un biofarmaco coinvolge due operazioni fondamentali note come *upstream* e *downstream*. Il processo di *upstream* riguarda la scelta dei mezzi per la produzione del biofarmaco di interesse mentre la sezione di *downstream* concerne la sua separazione e purificazione. La cromatografia liquida è una tecnica di separazione largamente impiegata durante il processo di purificazione di un biofarmaco ^[3,4]. Nell'ambito biofarmaceutico generalmente si trattano delle miscele costituite da più proteine dove una di queste rappresenta il biofarmaco di interesse mentre tutte le altre sono impurità. Queste impurità vanno quindi rimosse al fine di ottenere un prodotto finale con alti valori di purezza della proteina di interesse.

Sulla base del tipo di applicazione è possibile classificare la cromatografia liquida in due grandi famiglie: la cromatografia analitica e la cromatografia preparativa. Entrambe sono finalizzate a separare una certa sostanza di interesse da una miscela di partenza; ciò che cambia è la scala di applicazione. La cromatografia analitica è impiegata in ambito di laboratorio per quantificare in modo accurato i componenti di una certa miscela analizzata. Essa tratta quindi dei quantitativi di prodotto contenuti e ambisce ad ottenere dei prodotti con un elevatissimo grado di purezza, a discapito della resa. La cromatografia preparativa è invece un processo separativo applicato in ambito industriale che tratta una maggiore quantità di prodotto, la quale deve infatti soddisfare le esigenze del mercato. In questo secondo caso i gradi di purezza raggiunti sono generalmente inferiori e sono dettati dalla necessità di trovare un compromesso ragionevole tra la purezza del prodotto finale e la resa del processo.

Il principio di separazione su cui si basa la cromatografia riguarda la diversa ripartizione dei componenti ad essa alimentati tra due diverse fasi, dette fase stazionaria e fase mobile ^[5]. In particolare, la separazione sfrutta il moto relativo tra queste due fasi: la fase stazionaria è fissa mentre quella mobile fluisce attraverso di essa. La scelta della fase mobile e di quella stazionaria è tale da poter sfruttare una determinata differenza presente tra la proteina di interesse e le altre impurità così da permetterne la separazione, come, ad esempio, una differenza di dimensione o di carica superficiale.

La scelta delle due fasi e le condizioni operative adottate, come ad esempio la portata di fase mobile inviata all'apparecchiatura, determinano la bontà della separazione. Un processo di separazione cromatografica si ritiene adeguato quando questo riesce a discriminare tra i diversi componenti costituenti la miscela di partenza, in particolare tra la proteina di interesse e tutte le altre impurità.

1. Introduzione

Come anticipato precedentemente, la separazione cromatografica basa il suo funzionamento su due diverse proprietà: il moto relativo tra la fase stazionaria e quella mobile; la diversa capacità di interazione dei componenti della miscela da trattare tra queste due fasi [5]. Una volta alimentata al sistema la miscela proteica, i diversi componenti potranno interagire in modo più o meno marcato con la fase stazionaria e ciò determinerà la loro separazione. In particolare, più un componente è affine con la fase stazionaria, più forti saranno le interazioni che esso sviluppa con tale fase e quindi più tempo impiegherà il componente per attraversare il sistema cromatografico. Viceversa, un componente meno affine con la fase stazionaria impiegherà meno tempo per attraversare la colonna cromatografica. Le interazioni che si sviluppano tra le specie in soluzione e la fase stazionaria possono essere di diversa natura e la conoscenza di questi meccanismi pone le basi per lo studio del processo di separazione cromatografica.

Come si può osservare in Figura 1, il componente A, rappresentato con un cerchio, si trova preferenzialmente nella fase mobile in quanto instaura interazioni più deboli con la fase stazionaria. Il componente B invece, rappresentato con un triangolo, instaura interazioni di forza maggiore con tale fase. Sulla base di questa diversa interazione con la fase stazionaria, il componente A attraverserà l'apparecchiatura più velocemente del componente B; avviene in questo modo la loro separazione.

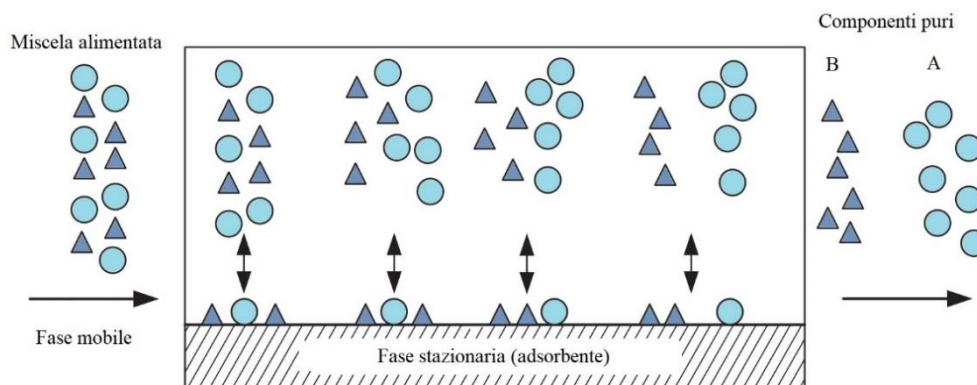


Figura 1. Principio di separazione cromatografica; immagine tratta da [5] e modificata

Come anticipato precedentemente, esistono diversi tipi di cromatografia liquida i quali sfruttano diverse caratteristiche chimico-fisiche dei componenti da separare. Nella cromatografia liquida la fase stazionaria è rappresentata da un solido mentre quella mobile è costituita da una corrente liquida. La fase stazionaria è generalmente sotto forma di particelle, spesso porose, le quali costituiscono il riempimento di una colonna. La fase mobile viene invece alimentata all'apparecchiatura e la attraversa nella sua interezza. Attualmente, nonostante si stiano studiando delle tecniche per poter rendere il processo continuo su scala industriale, le tecniche di purificazione cromatografica sono svolte in batch [6].

Un processo di separazione cromatografica prevede più fasi. Inizialmente si svolge una prima fase di lavaggio ed equilibratura della fase stazionaria; attraverso questa seconda operazione si prepara tale fase ad entrare in contatto con la soluzione nella quale è disciolta la miscela proteica che verrà successivamente alimentata. In seguito all'alimentazione della miscela proteica nell'apparecchiatura, si alimenta in modo continuo la fase mobile. Questa operazione permette di rimuovere eventuali componenti non adsorbiti al solido i quali sono quindi situati nel volume di liquido interstiziale

1.1. Il processo cromatografico

interno all'apparecchiatura. Infine, si svolgono le cosiddette operazioni di eluizione attraverso le quali si recuperano quelle specie proteiche rimaste legate alla fase stazionaria. La fase di eluizione consiste nell'alimentazione in colonna di una o più soluzioni tampone tali da promuovere il desorbimento dei componenti che si erano legati alla fase stazionaria, così che questi possano raggiungere l'uscita dell'apparecchiatura più velocemente. Seguono poi le operazioni di rigenerazione e stoccaggio della fase stazionaria, le quali preparano il sistema per il successivo ciclo di separazione [5].

Sulla base della miscela di partenza che si desidera trattare si può scegliere una fase stazionaria che trattenga preferenzialmente la proteina di interesse oppure che non interagisca in alcun modo con essa. Nel primo caso si parla di cromatografia di eluizione e la proteina di interesse è recuperata dopo la fase di carico per mezzo di soluzioni tampone che ne permettono la rimozione. Nel secondo caso si parla di cromatografia di *breakthrough* e la proteina di interesse, già nella fase di carico, avendo interazioni molto deboli con il solido, si muoverà velocemente verso l'uscita della colonna; tale proteina sarà quindi recuperata come primo prodotto in uscita dal sistema di separazione. Le impurezze invece, in quest'ultimo caso, sono trattenute dalla fase stazionaria.

Per monitorare nel tempo l'andamento della separazione cromatografica si analizza la corrente in uscita dalla colonna mediante un sensore con una lampada UV. Si misura in questo modo l'assorbanza di tale corrente alla lunghezza d'onda desiderata, tipicamente 280 nm, lunghezza d'onda alla quale rispondono i gruppi laterali benzenici presenti in alcuni amminoacidi costituenti le proteine. Si ottengono così i cromatogrammi; essi sono caratterizzati da una serie di picchi che permettono di identificare la presenza di specie proteiche nella corrente uscente dall'apparecchiatura [5]. Un esempio di cromatogramma è rappresentato in Figura 2 dove si osserva la presenza di due picchi relativi a due diversi componenti che il sistema cromatografico è stato in grado di discriminare.

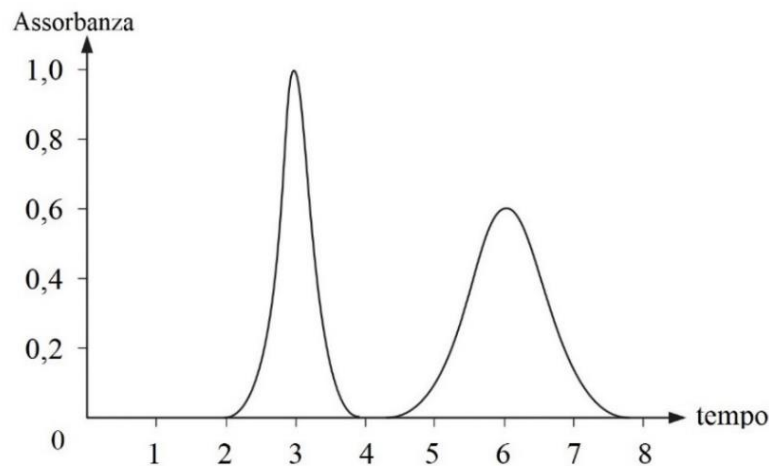


Figura 2. Esempio di cromatogramma; immagine tratta da [5] e modificata

In base a quella che è la miscela da dover trattare ed in particolare al componente che si desidera isolare dalle altre impurità è possibile ricorrere a diverse tipologie di cromatografia. Le diverse tecniche cromatografiche sfruttano sempre il moto relativo tra la fase stazionaria e la fase mobile ma ciò che le distingue è la tipologia di interazione che si sviluppa tra i componenti della miscela da trattare e la fase stazionaria. Si distinguono la cromatografia ad esclusione molecolare, la cromatografia a scambio ionico, la cromatografia di affinità, la cromatografia di ripartizione e la

1. Introduzione

cromatografia ad adsorbimento. La cromatografia ad esclusione molecolare basa la separazione sulla diversa dimensione e forma dei componenti che costituiscono la miscela da trattare. La cromatografia a scambio ionico sfrutta l'attrazione e la repulsione di natura elettrostatica che nasce rispettivamente tra composti con carica opposta e composti con la medesima carica. La cromatografia di affinità è una tecnica cromatografica altamente specifica la quale ha come obiettivo l'interazione selettiva con un determinato componente, generalmente la proteina di interesse. La cromatografia di ripartizione è caratterizzata da una fase stazionaria e una fase mobile entrambe liquide. La cromatografia ad adsorbimento basa la separazione sulla diversa capacità dei componenti nel formare interazioni deboli con una determinata fase stazionaria. La cromatografia ad interazione idrofobica è una tipologia particolare di cromatografia ad adsorbimento che sfrutta la diversa capacità di interazione tra una fase stazionaria idrofobica e i gruppi idrofobici esposti superficialmente dalle proteine. Vi è infine la cromatografia liquida ad elevate prestazioni (*High Pressure Liquid Chromatography*) la quale è caratterizzata da un'elevata superficie di contatto tra la fase stazionaria e quella mobile permettendo così di ottenere, a parità di volume dell'apparecchiatura, una migliore separazione dei diversi componenti costituenti la miscela trattata.

I sistemi cromatografici, essendo altamente efficienti, rappresentano il cuore del processo di purificazione dei biofarmaci ^[7]. Generalmente a livello industriale, per ottenere una purezza del prodotto accettabile, si eseguono diversi processi di cattura cromatografica in serie; si combinano quindi diverse tipologie di cromatografia con l'obiettivo di aumentare la purezza del biofarmaco trattato ^[8]. Bisogna comunque considerare che i sistemi cromatografici sono piuttosto complessi e vanno progettati con estremo rigore, inoltre, il loro corretto funzionamento è strettamente correlato alla tipologia e complessità della miscela da trattare nonché alle condizioni operative adottate. Infine, la separazione cromatografica risulta essere un processo particolarmente oneroso dal punto di vista economico. Esempi di costi legati allo svolgimento di questo processo riguardano il pompaggio della fase liquida in colonna, l'impiego di soluzioni tampone apposite per la fase di eluizione e rigenerazione della colonna e, nel caso della cromatografia di affinità, la realizzazione di una resina specifica che permetta l'interazione selettiva con la proteina di interesse.

L'efficienza di un sistema cromatografico è descritta attraverso l'altezza dei piatti teorici costituenti la colonna o HETP (*Height of an Equivalent Theoretical Plate*); essa è pari all'altezza totale della colonna divisa per il numero di piatti teorici che compongono la colonna stessa. Il piatto teorico corrisponde a quella porzione di colonna nella quale si raggiunge l'equilibrio termodinamico tra la concentrazione di un componente di interesse adsorbito sulla fase stazionaria e la concentrazione dello stesso componente nella fase mobile ^[5]. Il numero di piatti che costituiscono una colonna cromatografica, e quindi la loro altezza, è legato a diversi fattori come, ad esempio, le resistenze al trasferimento di materia e la fluidodinamica che si instaura nel sistema.

L'equazione di van Deemter permette di relazionare la velocità della fase mobile alimentata all'apparecchiatura con l'altezza del singolo piatto della colonna ^[5, 9, 10]. Tale equazione considera diversi fenomeni che si verificano all'interno di un sistema cromatografico. Un primo aspetto considerato riguarda i fenomeni di diffusione che si sviluppano nel sistema; essi sono dovuti ad imperfezioni della fase stazionaria. Tale equazione considera inoltre la resistenza al trasferimento di materia che si oppone al passaggio della specie di interesse dalla fase mobile alla fase stazionaria.

1.1. Il processo cromatografico

Infine, è considerata anche la diffusione assiale all'interno della fase liquida; quest'ultimo fenomeno è legato, ad esempio, all'instaurarsi di gradienti di concentrazione all'interno della stessa fase liquida.

Tramite l'equazione di van Deemter è quindi possibile correlare l'altezza del piatto teorico alla velocità della fase fluida inviata nell'apparecchiatura; tale funzione è caratterizzata da un minimo, come rappresentato in Figura 3. Il punto di minimo della funzione rappresenta la condizione ottimale nella quale operare in quanto corrisponde a quel valore di portata di fase mobile che permette di minimizzare l'altezza del singolo piatto teorico. A parità di altezza della colonna cromatografica quindi, si avrà così un maggior numero di piatti teorici nella colonna, ovvero un maggior numero di stadi di equilibrio; ciò determina una migliore efficienza di separazione.

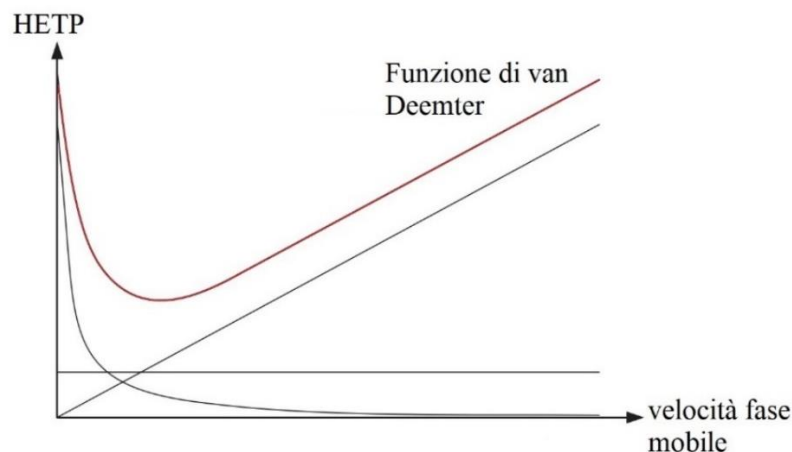


Figura 3. Rappresentazione della funzione di van Deemter (curva rossa); immagine tratta da [5] e modificata

Un secondo parametro molto importante per quantificare la bontà di una separazione cromatografica è rappresentato dalla cosiddetta risoluzione. La risoluzione indica la capacità della colonna cromatografica di separare uno specifico composto da una miscela e tale proprietà si può quantificare in modo qualitativo osservando i cromatogrammi. È evidente che due specie siano correttamente separate quando i loro rispettivi picchi nel cromatogramma risultano essere sufficientemente stretti e distanti; essi chiaramente non dovranno sovrapporsi. Come si può osservare in Figura 4, il caso (a) rappresenta una buona separazione dei due componenti in quanto si distinguono i due rispettivi picchi nel cromatogramma. Il caso (b) rappresenta invece una separazione inadeguata in quanto i due picchi sono parzialmente sovrapposti, indice che i relativi componenti non siano stati correttamente separati. Ancora peggiore è il caso (c) in cui i due picchi risultano essere praticamente sovrapposti, situazione che evidenzia come la colonna cromatografica non sia stata in grado di discriminare, se non in minima parte, i due diversi componenti costituenti la miscela alimentata.

1. Introduzione

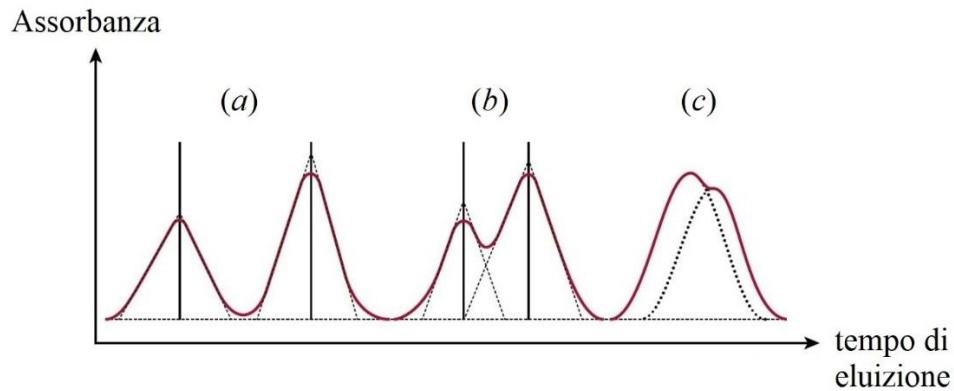


Figura 4. Esempio di cromatogrammi, diversa capacità del sistema cromatografico nella separazione dei componenti di una miscela; immagine tratta da [11] e modificata

1.2. I meccanismi che caratterizzano la cromatografia

Per poter avere l'adsorbimento della sostanza di interesse sulla superficie del solido o all'interno delle sue porosità, devono verificarsi una serie di eventi sequenziali all'interno del sistema cromatografico; si considera, come esempio, una generica molecola. Il processo di adsorbimento inizia con la convezione e diffusione della molecola di interesse dal bulk della fase liquida (fase mobile) fino in prossimità della superficie del solido (fase stazionaria). La fase solida è immersa nella fase liquida: tale fase liquida sarà libera di muoversi quando essa si trova sufficientemente lontana dalla fase solida mentre assume il comportamento di un liquido stagnante quando si trova in prossimità di essa. Una volta che la molecola è giunta in prossimità della fase solida, essa dovrà diffondere all'interno del liquido stagnante che circonda tale fase; la molecola potrà in questo modo raggiungere l'effettiva superficie del solido e le sue porosità. Una volta raggiunta la superficie del solido avviene il fenomeno di adsorbimento, il quale è descrivibile attraverso una specifica cinetica ^[5]. È possibile osservare gli *step* che costituiscono il processo di adsorbimento appena descritto in Figura 5.

Generalmente, in presenza di particelle solide porose, le molecole tendono ad interagire inizialmente con i siti attivi presenti lungo la superficie della particella e soltanto successivamente si addentrano all'interno delle porosità del solido, così da poter interagire con i restanti siti attivi. Ovviamente l'adsorbimento si verifica soltanto se, sulla superficie del solido, sono presenti dei siti attivi liberi residui.

Il processo di desorbimento coinvolge gli stessi step analizzati per l'adsorbimento, tuttavia essi sono compiuti nell'ordine inverso: si avrà quindi il desorbimento della molecola dalla superficie del solido; la diffusione della molecola nel film stagnante che circonda la particella solida; la diffusione e convezione della molecola all'interno del bulk fluido.

1.2. I meccanismi che caratterizzano la cromatografia

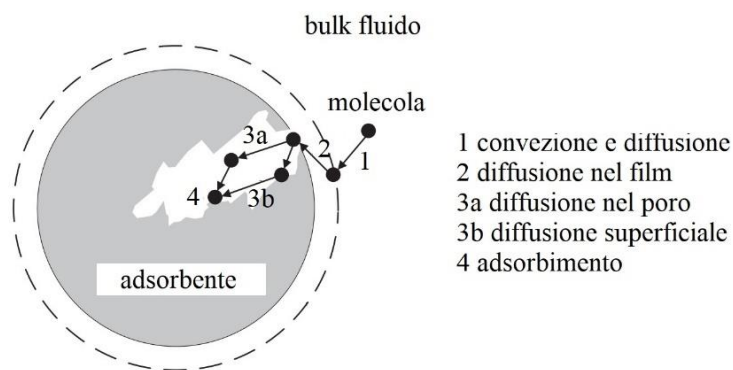


Figura 5. Successione dei meccanismi che si susseguono tra un componente ed il solido poroso durante il processo di adsorbimento; immagine tratta da [5] e modificata

Si è osservato che generalmente il *mass transfer* della molecola all'interno del bulk liquido e il fenomeno di effettivo adsorbimento siano molto veloci rispetto al processo di diffusione all'interno del film stagnante che circonda la particella solida e alla diffusione all'interno dei suoi pori. Questi ultimi due fenomeni costituiscono quindi le resistenze al trasporto di materia controllanti l'intero processo. In particolare, la resistenza alla diffusione all'interno dei pori varia in relazione alla morfologia stessa dei pori. Bisogna infatti considerare che i pori non agiscono soltanto da setaccio, impedendo alle molecole con dimensione troppo elevata di penetrare al loro interno; essi influenzano anche l'entità stessa della resistenza al trasporto di materia. Le molecole con dimensione eccessiva non potranno quindi penetrare all'interno delle porosità della particella solida e potranno adsorbirsi soltanto lungo la sua superficie esterna. Le particelle sufficientemente piccole potranno adsorbirsi sia lungo la superficie esterna del solido, sia lungo la superficie interna alle sue porosità. In ogni caso, tanto più tortuosa risulterà essere la morfologia del poro e tanto maggiore sarà la resistenza al trasferimento di materia associata alla diffusione nel poro stesso.

I diversi fattori che influenzano la buona riuscita di un processo di separazione cromatografica riguardano la fluidodinamica della fase mobile all'interno del letto impaccato, i fenomeni di trasferimento di materia che si instaurano nel sistema^[9] e l'eventuale raggiungimento delle condizioni di equilibrio. In particolare, la ripartizione di un determinato componente in condizioni di equilibrio termodinamico tra le due fasi, per una data temperatura, è calcolabile dalla cosiddetta isoterma di adsorbimento. Se si considera quindi un sistema ideale, allora sarà possibile descrivere il processo di adsorbimento mediante le relative isoterme. Invece, nel caso di un sistema reale, è necessario considerare anche i processi di trasferimento di materia e i fenomeni fluidodinamici che si instaurano nell'apparecchiatura. Un esempio di problematica che riguarda i sistemi reali, in particolar modo le colonne con diametri importanti, riguarda la dispersione radiale del fluido, la quale non sempre risulta essere omogenea. Queste disomogeneità possono essere dovute, ad esempio, alla presenza di difetti nell'impaccamento stesso della colonna, il quale può presentare delle regioni vuote^[12].

Il processo di adsorbimento può essere descritto attraverso diversi modelli presenti in letteratura, tali modelli si basano su una serie di ipotesi e possono essere più o meno complessi in relazione alle semplificazioni adottate. Alcuni dei modelli che ambiscono alla descrizione del processo di adsorbimento per quanto concerne la cromatografia ad interazione idrofobica sono riportati nella sezione successiva.

1.3. Cromatografia ad interazione idrofobica

Nel seguente lavoro di Tesi si è studiato il meccanismo di adsorbimento per quanto riguarda la cromatografia ad interazione idrofobica, la quale costituisce uno dei possibili step di separazione all'interno del processo di purificazione dei biofarmaci. La cromatografia ad interazione idrofobica è una particolare tipologia di cromatografia ad adsorbimento che sfrutta l'interazione reversibile che si instaura tra la regione idrofobica di una proteina e i ligandi idrofobici della fase stazionaria presente nella colonna cromatografica ^[13]. In particolare, ciascuna proteina è caratterizzata da alcune porzioni della sua struttura che sono idrofobiche ed altre porzioni che sono idrofile per cui, sulla base della diversa estensione di queste due regioni, è possibile eseguire la separazione di diverse tipologie di proteine attraverso questa tecnica cromatografica ^[14]. Per modulare le interazioni delle diverse proteine con la fase stazionaria e quindi, per agire sulla ritenzione di tali proteine, si impiegano generalmente delle soluzioni con concentrazione di sale variabile. La presenza di sali in soluzione permette infatti di modificare la solubilità della proteina nella fase mobile; variando quindi la concentrazione salina nel sistema è possibile agire sull'entità delle interazioni che si instaurano tra la proteina e la fase stazionaria ^[13, 15].

Le fasi stazionarie più impiegate nella cromatografia ad interazione idrofobica consistono in resine polimeriche alle quali vengono legati dei gruppi butilici o fenilici ^[13]. Alcuni dei sali più utilizzati sono il solfato di ammonio, il solfato di potassio e il cloruro di sodio.

Per comprendere meglio il processo cromatografico per quanto riguarda la cromatografia ad interazione idrofobica si illustra, in sintesi, un esempio di procedura attuata a livello industriale. Il processo inizia con l'equilibratura della fase stazionaria: essa consiste nel lavaggio della colonna attraverso una soluzione tampone ad elevata concentrazione di sale. Avviene poi la diluizione della miscela proteica da trattare all'interno di una soluzione tampone con la medesima concentrazione di sale (e quindi conducibilità) della soluzione impiegata per l'equilibratura della colonna. Il campione contenente le proteine diluite nella soluzione salina è quindi caricato nella colonna ed avviene l'adsorbimento di tali proteine sulla fase stazionaria. Si svolge quindi la fase di eluizione; essa è effettuata con la stessa soluzione salina impiegata inizialmente ma con concentrazione decrescente nel tempo. Si verifica in questo modo la progressiva riduzione dell'interazione tra la fase stazionaria e le proteine che si erano precedentemente legate ad essa. Avviene infine il lavaggio e rigenerazione della colonna con soluzioni tampone diluite. Qualora vi siano delle proteine legate in modo molto forte alla fase stazionaria si esegue generalmente un secondo lavaggio con urea o idrossido di sodio. Bisogna infine considerare che si adsorbiranno alla fase stazionaria diverse tipologie di proteine; esse sono separate durante la fase di eluizione sulla base delle diverse estensioni delle loro regioni idrofobiche.

I fenomeni di convezione e diffusione all'esterno e all'interno dei pori sono comuni per tutte le tipologie di cromatografia. Per quanto riguarda la cromatografia ad interazione idrofobica, tuttavia, non si è ancora spiegato con esattezza il processo di adsorbimento. Sono comunque presenti in letteratura diversi modelli che ambiscono ad una sua descrizione ^[13].

1.3. Cromatografia ad interazione idrofobica

Come anticipato in precedenza, in generale, è possibile descrivere la ripartizione dei diversi componenti della miscela tra le due fasi, la fase stazionaria e la fase mobile, attraverso le isoterme di adsorbimento; questa ripartizione è sempre valida qualora il sistema abbia raggiunto l'equilibrio termodinamico. L'isoterma rappresenta il luogo dei punti che descrive la relazione di equilibrio esistente tra la concentrazione di un componente adsorbito alla fase solida e la concentrazione di quello stesso componente nella fase liquida. Sono stati svolti diversi studi su quello che è l'effettivo meccanismo di adsorbimento per quanto riguarda la cromatografia ad interazione idrofobica e sono stati proposti altrettanti modelli che potessero descriverne la dinamica.

Uno dei modelli più semplici ed utilizzati per descrivere le isoterme di adsorbimento è il modello di Langmuir ^[16]; secondo tale modello le isoterme sono descritte attraverso l'Equazione (1).

$$q = \frac{q_{max} C_p}{K + C_p} \quad (1)$$

dove q_{max} identifica la concentrazione di saturazione, ovvero la massima concentrazione del componente di interesse che la fase stazionaria può ospitare (nelle condizioni operative adottate), K la costante di equilibrio del sistema mentre C_p e q rappresentano rispettivamente la concentrazione della proteina di interesse nella fase liquida e solida quando queste si trovano all'equilibrio termodinamico.

Graficamente, l'isoterma di Langmuir ha un andamento descrivibile attraverso la Figura 6.

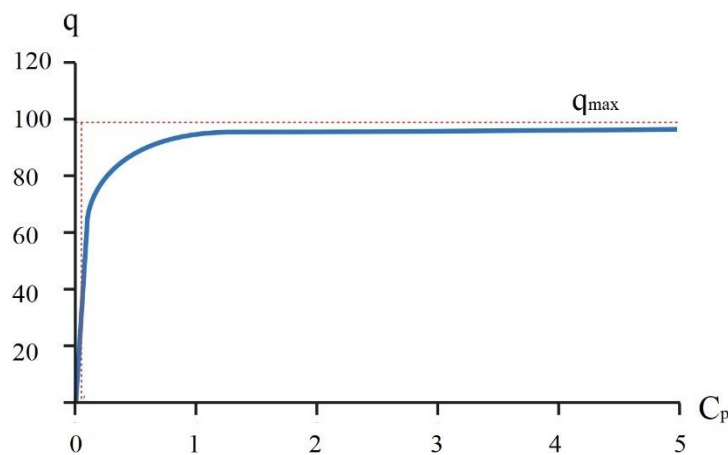


Figura 6. Esempio di isoterma di Langmuir; immagine tratta da [18] e modificata

Osservando la Figura 6 si nota che per valori bassi di C_p l'andamento è pressoché lineare e q incrementa linearmente con l'aumento di C_p . Per valori di C_p sufficientemente alti, q diventa indipendente da C_p , ovvero il grafico tende ad un asintoto, il quale è rappresentato da q_{max} .

Il modello di Langmuir appena descritto è basato su diverse ipotesi: la fase solida e liquida sono ideali così che si possa approssimare l'attività di una soluzione con la sua concentrazione; l'adsorbimento prosegue fino a quando sono disponibili dei siti attivi di legame liberi; si può formare al più un monostato di materiale adsorbito; i diversi siti si equivalgono dal punto di vista energetico, essi hanno

1. Introduzione

quindi la stessa probabilità di essere occupati; la superficie solida è uniforme, ovvero piana su scala microscopica; l'adsorbimento è reversibile; l'interazione adsorbato-adsorbente prevale su quella adsorbato-adsorbato, la quale risulta trascurabile ^[17].

Il modello di Langmuir appena presentato è piuttosto semplice tuttavia non considera, ad esempio, l'influenza della concentrazione di sale nel sistema; tale parametro è infatti implicito nel modello. Per superare questo limite del modello di Langmuir è stato proposto il modello descritto dall'Equazione (2) nel quale compare l'esponenziale della concentrazione del sale presente nel sistema ^[16, 19].

$$q = \frac{q_{max} \exp(-kC_s)C_p}{K + \exp(-kC_s)C_p} \quad (2)$$

dove C_s è la concentrazione del sale e k rappresenta un parametro dell'equazione.

Mollerup *et al* hanno proposto un modello alternativo che potesse spiegare la dinamica del fenomeno di adsorbimento; esso è descritto dall'Equazione (3). Tale modello assume che le proteine si leghino in modo reversibile ai ligandi idrofobici della fase stazionaria. Esso considera inoltre che, tra tutti i ligandi, alcuni siano liberi, alcuni risultino impegnati nel legame con le proteine mentre altri siano inaccessibili a causa di impedimenti di natura sterica dovuti ad esempio al legame di una proteina con alcuni ligandi limitrofi ^[20].

$$\frac{q}{C_p} = K \left(\frac{\Lambda}{C_p} \right)^v \left(1 - \frac{q}{q_{max}} \right)^\gamma \quad (3)$$

dove v identifica il coefficiente stechiometrico legato al processo di adsorbimento, γ il coefficiente di attività delle proteine in fase liquida e Λ la densità dei ligandi nella fase stazionaria.

Un ulteriore modello che permette di descrivere la dinamica dell'adsorbimento è stato proposto da Chen e Sum; tale modello è descritto dall'Equazione (4). Il modello si basa sulle seguenti assunzioni: la fase liquida e la fase solida sono ideali dal punto di vista termodinamico; le proteine possono trovarsi soltanto in due differenti stati, lo stato idratato e lo stato non idratato dove, dei due possibili stati, soltanto le proteine nello stato non idratato possono legarsi ai ligandi idrofobici della fase stazionaria; il legame di una proteina con la fase stazionaria può ostacolare, a causa di fattori di natura sterica, l'accessibilità dei ligandi limitrofi, i quali non saranno più disponibili per l'adsorbimento di altre proteine ^[16].

$$\frac{q}{C_p} = \frac{K_s K_p C_s^\alpha [\Lambda - (n + \sigma)q]^n}{1 + K_s C_s^\alpha} \quad (4)$$

dove K_s e K_p sono rispettivamente la costante di equilibrio della disidratazione della proteina e la costante di equilibrio dell'adsorbimento ($K_s K_p = K'$), α è il coefficiente alla quale è elevata la concentrazione di sale, n il numero di ligandi con cui interagisce una proteina e σ è il cosiddetto fattore sterico, il quale rappresenta il numero di siti inaccessibili a causa di impedimenti di tipo sterico come conseguenza del legame di una proteina sull'adsorbente.

1.3. Cromatografia ad interazione idrofobica

Il modello appena descritto si può semplificare in quanto i valori di K_s sono generalmente molto piccoli. Inoltre, se il mezzo idrofobico ha una capacità di legame sufficientemente bassa, allora si possono assumere rispettivamente σ nullo ed n unitario ^[16]. Si ottiene in questo modo l'Equazione (5) dove la concentrazione di sale, la quale è elevata a potenza tramite il parametro α , risulta essere un parametro esplicito.

$$q = \frac{K' C_s^\alpha \Lambda C_p}{1 + K' C_s^\alpha C_p} \quad (5)$$

Un limite del modello appena descritto riguarda il fatto per cui questo presupponga che le proteine possano esistere soltanto in due differenti stati: lo stato idratato e lo stato deidratato; nella realtà, il passaggio tra questi due stati è graduale e l'idrofobicità delle proteine aumenta gradualmente con l'incremento della concentrazione del sale nel sistema ^[16].

Chen e Sum hanno inoltre fornito una loro descrizione del processo di adsorbimento. Esso prevede la formazione e distruzione di gusci di molecole d'acqua in prossimità delle regioni idrofobiche delle proteine ^[16]. In particolare, quando una proteina è inserita in un mezzo acquoso, le molecole d'acqua che si trovano in prossimità di una regione idrofobica della proteina si organizzano in una struttura ordinata, la quale prende il nome di clatrato. I clatrati rendono inaccessibili questi gruppi idrofobici non permettendo così l'instaurarsi dei legami tra la proteina in questione e la fase stazionaria. Quando si inseriscono dei sali in soluzione, se la loro concentrazione è sufficientemente elevata, essi interagiscono con la struttura ordinata dei clatrati e ne promuovono la disgregazione. In questo modo i gruppi idrofobici della proteina sono nuovamente accessibili e possono quindi interagire con la fase stazionaria della colonna; avviene così l'adsorbimento delle proteine sulla fase solida.

Wang *et al* hanno proposto un ulteriore modello che potesse descrivere l'adsorbimento; esso è descritto dall'Equazione (6) ^[1]. Anche in questo caso si considera l'effetto della presenza di molecole d'acqua sul processo di adsorbimento in modo analogo a quanto visto in precedenza.

$$K = \frac{\nu q^{1+n\beta'}}{C_p (\Lambda_{tot} - (n + \sigma)q)^n} \quad (6)$$

dove β' rappresenta il numero di molecole d'acqua che stabilizzano i siti di legame e Λ_{tot} la capacità totale della fase stazionaria.

1.4. Metodologia high-throughput per lo screening di processi cromatografici

Il metodo high-throughput permette di effettuare, dal punto di vista sperimentale, alcune analisi relative ai processi cromatografici. Queste metodologie sperimentali si servono di piastre multipozzetto le quali permettono di indagare diverse condizioni operative in parallelo; si accorciano in questo modo i tempi necessari per la fase sperimentale. Un ulteriore vantaggio di questa tecnica riguarda il fatto per cui siano sufficienti dei quantitativi contenuti di campione e reagenti. Il principale svantaggio della metodologia high-throughput è rappresentato dall'elevato sforzo sperimentale richiesto per portare a termine l'analisi e ad una accuratezza non sempre accettabile [18]. Per questo motivo è necessario svolgere un'analisi dettagliata degli errori associati alla fase sperimentale per valutare l'accuratezza e la riproducibilità della procedura stessa.

Attraverso il metodo high-throughput si simula in piastra l'interazione tra la proteina e la fase stazionaria, interazione che normalmente si verifica all'interno di una colonna cromatografica. Questa tecnica permette principalmente di effettuare due differenti tipologie di analisi: si può svolgere uno screening di diverse condizioni operative, così da poterne determinare la migliore; si può studiare il meccanismo di adsorbimento, così da determinare le isoterme di adsorbimento delle proteine analizzate [18]. Come già illustrato, le isoterme di adsorbimento forniscono la ripartizione della proteina di interesse tra la fase stazionaria e quella mobile quando queste si trovano all'equilibrio termodinamico. Se una colonna cromatografica può essere descritta attraverso una sequenza di stadi all'equilibrio termodinamico, ciascun pozzetto della piastra rappresenta un singolo stadio di equilibrio. La procedura operativa consiste quindi nel sottoporre il singolo stadio di equilibrio, ovvero il singolo pozzetto, alle medesime operazioni alle quali viene sottoposta una generica colonna cromatografica [18]. Un esempio di procedura è mostrato in Figura 7; si osserva che il pozzetto è sottoposto ad operazioni di lavaggio, equilibratura, carico del campione da analizzare, incubazione e miscelazione ed infine lavaggio ed eluizione.

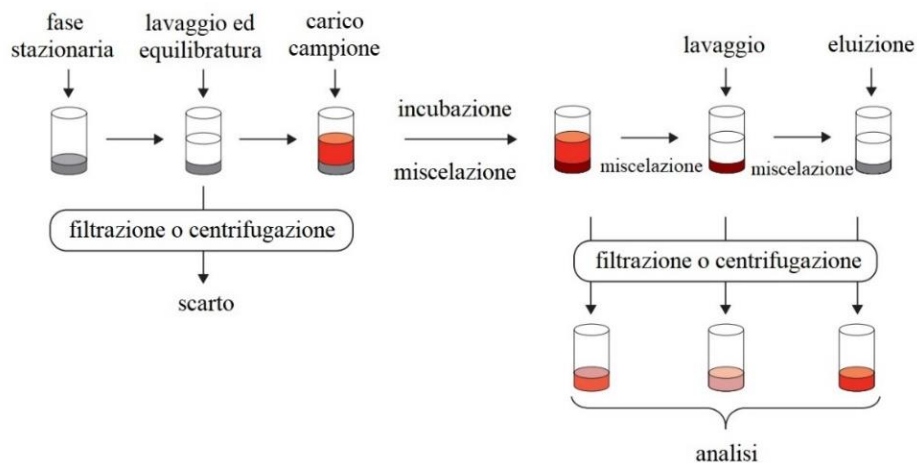


Figura 7. Esempio di procedura di tipo batch per la determinazione delle isoterme di adsorbimento di una proteina campione; immagine tratta da [18] e modificata

1.4. Metodologia high-throughput per lo screening di processi cromatografici

Una volta caricato il campione nella piastra, all'interno di ogni singolo pozzetto sarà presente una certa quantità di proteina nota e costante. La proteina, sulla base delle condizioni operative adottate, si andrà a ripartire tra la fase stazionaria e la fase mobile ^[18], ovvero tra la fase solida e quella liquida come si può osservare in Figura 8. La proteina presente nel sistema sarà quindi in parte legata al mezzo solido e in parte libera all'interno della fase liquida. Una volta trascorso un tempo sufficientemente lungo, corrispondente al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico, la ripartizione della proteina tra le due fasi sarà quella descritta dall'isoterma di adsorbimento.

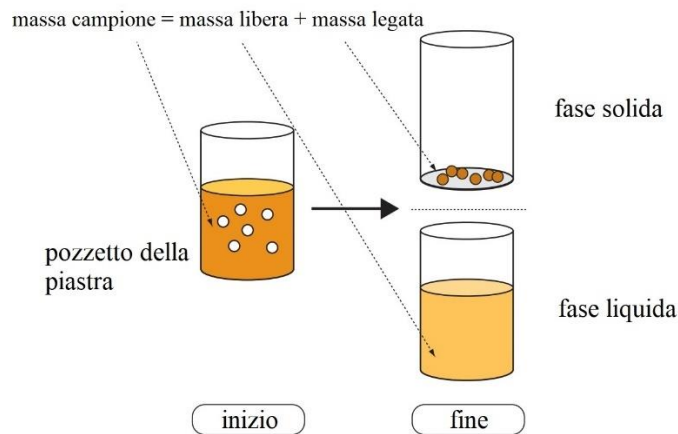


Figura 8. Ripartizione della proteina tra la fase solida e quella liquida all'interno del singolo pozzetto; immagine tratta da [18] e modificata

Poiché le isoterme descrivono ciò che si verifica nel sistema all'equilibrio termodinamico, durante le analisi sarà fondamentale la scelta di un corretto tempo di contatto tra la proteina e il mezzo adsorbente. Se infatti non fosse garantito un tempo di contatto adeguato non si verificherebbe il raggiungimento delle condizioni di equilibrio e la ripartizione della proteina tra le due fasi non risulterebbe essere quella prescritta dall'isoterma di adsorbimento. Generalmente, per effettuare studi sulle isoterme di adsorbimento, si adottano dei tempi di contatto di alcune ore ^[18]; è buona norma non impiegare tempi inferiori alle 3 ore, così da ottenere dei risultati sufficientemente accurati. In Figura 9 si può osservare come la capacità di legame di un certo mezzo solido aumenti con l'aumentare del tempo, fino a tendere ad un asintoto. L'asintoto è rappresentativo della capacità di legame che il solido mostra all'equilibrio termodinamico per le condizioni operative adottate; raggiunto l'asintoto, infatti, la capacità di legame del mezzo risulta essere indipendente dal tempo, ovvero non risulta più essere legata alla cinetica del processo.

1. Introduzione

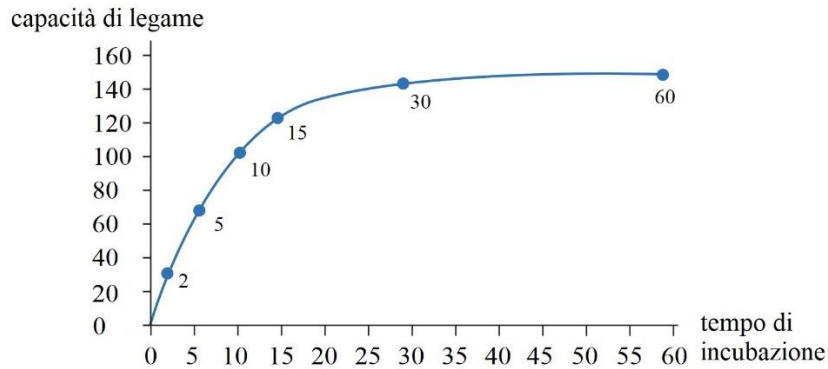


Figura 9. La curva mostra come varia la capacità di legame di un solido con il variare del tempo di contatto tra il componente di interesse e il solido stesso; immagine tratta da [18] e modificata

In Figura 10 si può osservare una rappresentazione alternativa di quanto appena descritto. Il grafico mostra l'isoterma di adsorbimento e la cosiddetta retta operativa. Tale retta ha origine in $c=c_0$ e ha una pendenza pari a $-\beta$; c_0 rappresenta la concentrazione iniziale del campione in analisi (concentrazione di proteina presente inizialmente nella fase liquida) mentre β rappresenta il rapporto tra le due fasi del sistema, ovvero la fase liquida e quella solida.

È possibile ricavare la definizione di β manipolando il bilancio di massa del campione (proteina) effettuato all'interno del singolo pozzetto. La proteina inserita nel pozzetto, infatti, potrà essere legata alla fase solida oppure libera nella fase liquida per cui, per differenza, si ricava la massa di proteina legata alla fase solida come mostrato nell'Equazione (7) [19].

$$m_{legata} = m_{campione} - m_{libera} \quad (7)$$

dove $m_{campione}$ indica la massa di proteina introdotta nel pozzetto, m_{legata} la massa di proteina che si è legata alla fase solida mentre m_{libera} rappresenta la massa di proteina presente nella fase liquida. In particolare, inizialmente la proteina sarà contenuta interamente nella fase liquida mentre, una volta raggiunto l'equilibrio termodinamico, tale proteina si sarà ripartita tra le due fasi, in accordo con l'isoterma di adsorbimento.

Esprimendo la massa di proteina attraverso il prodotto tra il volume della fase considerata e la rispettiva concentrazione di proteina presente in tale fase si ottiene l'Equazione (8).

$$V_{mezzo}q = V_{liquido}(c_0 - c_{libera}) \quad (8)$$

dove V_{mezzo} rappresenta il volume della fase solida, q la concentrazione di proteina adsorbita alla fase solida quando questa è all'equilibrio termodinamico con la fase liquida; $V_{liquido}$ è il volume della fase liquida, c_0 la concentrazione iniziale del campione (pari alla concentrazione della proteina alimentata

1.4. Metodologia high-throughput per lo screening di processi cromatografici

al pozzetto) e c_{libera} la concentrazione di proteina presente in fase liquida una volta raggiunto l'equilibrio termodinamico.

Dividendo entrambi i membri dell'Equazione (8) per V_{mezzo} e definendo il rapporto tra le due fasi come illustrato nell'Equazione (9):

$$\beta = \frac{V_{liquido}}{V_{mezzo}} \quad (9)$$

si ottiene l'Equazione (10), la quale descrive la retta operativa citata in precedenza.

$$q = \beta c_0 - \beta c_{libera} \quad (10)$$

Durante l'analisi sperimentale, con l'avanzare del tempo, le misurazioni svolte su un singolo pozzetto per una determinata concentrazione iniziale di proteina si collocano lungo la retta operativa verso concentrazioni crescenti di proteina legata alla fase solida; questo fenomeno è indice che non si sia ancora raggiunto l'equilibrio termodinamico nel sistema. Si osserva quindi che, per tempi di contatto insufficienti, ciò che si misura non è l'effettiva capacità di legame del solido, la quale è prescritta dall'isoterma di adsorbimento, bensì un valore inferiore, in quanto le condizioni di equilibrio termodinamico non sono state raggiunte. Per tempi sufficientemente alti, in Figura 10 sessanta minuti, la retta operativa interseca l'isoterma di adsorbimento, restituendo così l'effettiva capacità di legame che il solido mostra all'equilibrio termodinamico.

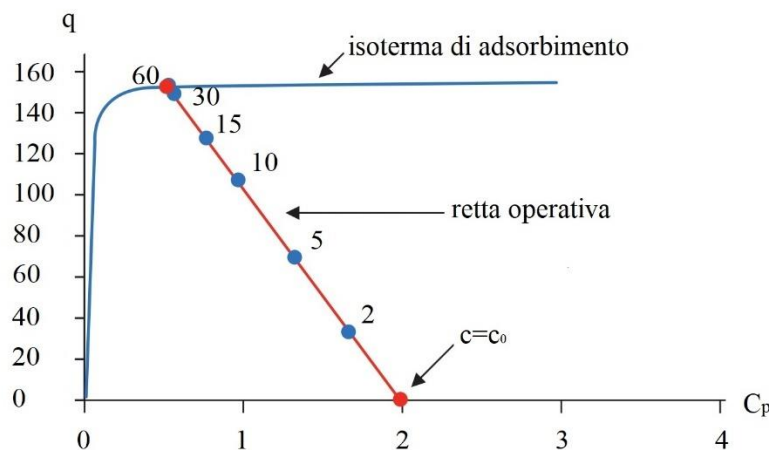


Figura 10. Rappresentazione grafica dell'isoterma di adsorbimento (in blu) e della retta operativa (in rosso); immagine tratta da [18] e modificata

Bisogna infine considerare che, se il volume del solido è eccessivo rispetto al volume del liquido contenente la proteina, allora non sarà possibile ricavare l'effettiva capacità di legame del solido a causa di questa sproporzione tra le due fasi.

1. Introduzione

Un parametro fondamentale per il processo riguarda la miscelazione del sistema; essa evita di ricadere in condizioni di trasferimento di materia limitante. Diversi fattori influiscono sulla resistenza al trasferimento di materia, tra cui le dimensioni del pozzetto, il volume di liquido presente al suo interno, la viscosità di tale liquido e, come appena anticipato, l'agitazione del sistema. Sulla base di una serie di osservazioni sperimentali si è osservato che, se il volume di liquido presente nel singolo pozzetto è compreso tra 100 e 300 μl si ottiene un'adeguata agitazione del sistema operando a 1100 rpm [18].

Come anticipato inizialmente, una tipologia di analisi che è possibile condurre tramite la metodologia high-throughput permette di determinare le isoterme di adsorbimento per una determinata proteina. Per far ciò sono possibili diverse strategie: è possibile mantenere costante la concentrazione del campione variando il rapporto tra le due fasi (solida e liquida); è possibile mantenere costante il rapporto tra le due fasi andando a variare la concentrazione del campione analizzato; è possibile combinare le due strategie precedenti [18]. In Figura 11 è rappresentata la costruzione delle isoterme di adsorbimento attraverso le prime due strategie descritte. Si può osservare come nel caso A rappresentato in figura si sia mantenuta costante la concentrazione del campione e si sia variato il rapporto tra le due fasi; le rispettive rette operative, infatti, si dipartono tutte dal medesimo punto e mostrano delle pendenze differenti. Viceversa, si osserva che nel caso B si sia mantenuto costante il rapporto tra le due fasi e si sia modificata la concentrazione del campione analizzato; le rette operative rappresentate hanno infatti tutte la stessa pendenza mentre intersecano l'asse delle ascisse in punti diversi.

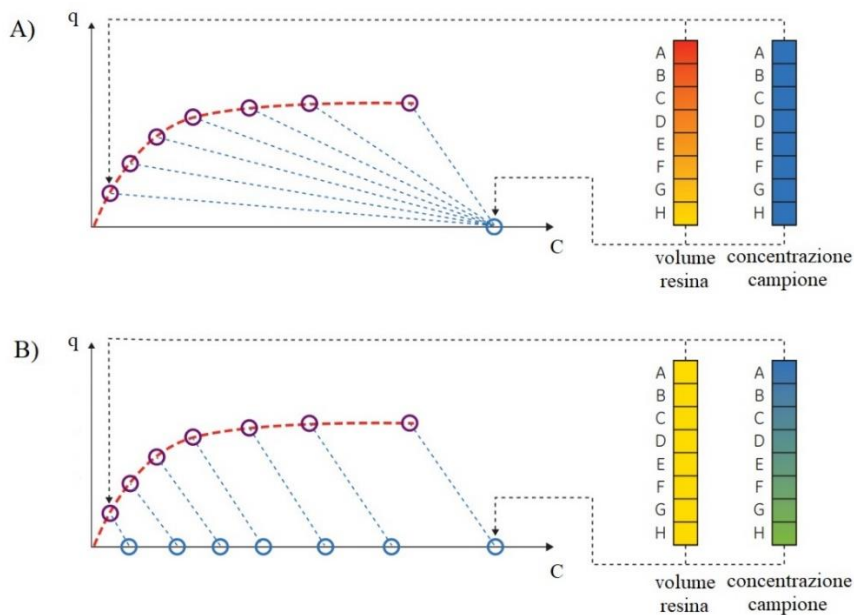


Figura 11. Rappresentazione grafica della determinazione dei punti costituenti un'isoterma di adsorbimento tramite le rette operative; confronto tra le isoterme ottenute andando a variare il rapporto tra le due fasi (caso A) e la concentrazione del carico (caso B); immagine tratta da [18] e modificata

1.5. Obiettivo

Come descritto in precedenza, il comportamento di una proteina all'interno di una colonna cromatografica è influenzato da diversi fattori; questi definiscono l'efficienza di separazione del sistema cromatografico. Se alcuni parametri operativi sono ben noti, come ad esempio la dimensione della colonna, l'impaccamento della fase stazionaria, le concentrazioni delle soluzioni proteiche e saline ^[13, 15], la temperatura ^[21, 22, 23] e il pH ^[13]; vi sono altri parametri il cui effetto è ancora non chiaro. Uno di questi parametri è rappresentato dalla variabilità della densità di ligandi che si riscontra nei diversi lotti di resina. Attualmente, infatti, sia a livello industriale che a livello di laboratorio, raramente si svolgono queste tipologie di analisi in quanto considerate secondarie rispetto a quegli altri parametri più conosciuti e il cui effetto sull'efficienza di separazione risulta essere più marcato.

L'obiettivo del seguente lavoro di Tesi coinvolge due diversi aspetti. Un primo obiettivo riguarda la raccolta di dati che permettano di descrivere il comportamento di alcune proteine campione quando sottoposte al processo di adsorbimento nell'ambito della cromatografia ad interazione idrofobica. Il secondo obiettivo riguarda lo studio del processo cromatografico impiegando diversi lotti di resina, i quali sono caratterizzati da diversi valori di densità di ligandi. Più in particolare, si desidera valutare l'effetto che l'impiego di diversi lotti di resina all'interno del processo cromatografico ha sul processo stesso.

2. Materiali e metodi

Come anticipato nella precedente sezione, attraverso il seguente lavoro si desidera analizzare il fenomeno di adsorbimento di alcune proteine campione per quanto concerne la cromatografia ad interazione idrofobica. Poiché le dinamiche di adsorbimento sono determinanti nel processo di purificazione cromatografica, si sono ricavate le isoterme di adsorbimento per le proteine di interesse impiegando due resine con differente densità di ligandi; si è valutata in questo modo l'influenza della densità di ligandi sul fenomeno di adsorbimento. L'adsorbimento è stato studiato considerando diverse concentrazioni di sale nel buffer. In particolare, si sono analizzate soluzioni proteiche con concentrazioni di proteina comprese tra 1 e 10 mg/ml in 0 M, 0,5 M, 1 M, 1,4 M di solfato di ammonio e 50 mM di diidrogenofosfato di potassio. Le resine impiegate hanno una densità di ligandi rispettivamente di 51 e 55 $\mu\text{mol/ml}$; il valore dichiarato dal fornitore risulta essere di 40 $\mu\text{mol/ml}$.

2.1. Materiali

Le proteine campione analizzate sono l'albumina, la BSA, l' α -chymotripsina e la β -lactoglobulina. L'albumina deriva dal bianco dell'uovo di pollo, ha una massa molecolare di 44,3 kDa ed una purezza superiore al 98%. La BSA deriva dal siero bovino, ha una massa molecolare di 66 kDa ed una purezza superiore al 98%. L' α -chymotripsina deriva da pancreas bovino, ha una massa molecolare di 25 kDa ed una purezza superiore all'85%. La β -lactoglobulina deriva da latte bovino, ha una massa molecolare di 18,4 kDa ed una purezza superiore al 90%. Tutte le proteine oggetto di studio sono state acquistate presso Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

La resina impiegata come fase stazionaria è la Butyl Sepharose HP ed è stata acquistata presso GE Healthcare (Uppsala, Svezia). I sali che sono stati impiegati sono l'idrossido di potassio, il solfato di ammonio e il diidrogenofosfato di potassio. L'idrossido di potassio e il solfato di ammonio sono stati acquistati presso CARLO ERBA Reagents (Milano, Italia); il diidrogenofosfato di potassio è stato acquistato presso Sigma-Aldrich.

Le piastre filtranti impiegate sono le AcroPrep 96 wells filter plates e sono state acquistate presso Pall Corporation (New York, USA); le piastre di raccolta utilizzate sono le Deepwell plates e sono state acquistate presso Eppendorf (Amburgo, Germania); le piastre impiegate per l'analisi spettrofotometrica sono le Greiner UV-Star 96 wells plates e sono state acquistate presso Merck (Darmstadt, Germania).

L'agitatore impiegato è il Thermo-Shaker TS-100 ed è stato acquistato da Biosan (Latvia, Lettonia). L'alloggiamento per le piastre collegato alla pompa da vuoto è il Multiwell plate Manifold ed è stato acquistato presso Pall Corporation. Lo spettrofotometro utilizzato è il Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer ed è stato acquistato presso Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

2.2. Procedura sperimentale per la determinazione delle isoterme

Per svolgere una singola prova, ovvero per determinare le isoterme di adsorbimento di una delle proteine campione è necessario preparare la rispettiva piastra, come accennato nella descrizione del metodo high-throughput. La preparazione di una piastra coinvolge la realizzazione di alcune soluzioni saline. Due soluzioni costituiscono le soluzioni madre dalle quali si ottengono, per diluizione, le soluzioni all'interno delle quali è solubilizzata la proteina. Una terza soluzione è impiegata come tampone per neutralizzare il pH delle due precedenti. Le piastre impiegate sono costituite da 96 pozzetti disposti su 8 righe e 12 colonne, come si può osservare in Figura 12. Il layout delle piastre adottato prevede che esse contengano la proteina con una concentrazione crescente muovendosi all'interno delle colonne ed una concentrazione di sale crescente muovendosi all'interno delle righe. Come anticipato, si sono impiegate soluzioni proteiche con concentrazione di proteina di 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 mg/ml e soluzioni saline a 0 M, 0,5 M, 1 M e 1,4 M di solfato di ammonio e 50 mM di diidrogenofosfato di potassio. Si sono quindi disposte tali soluzioni all'interno delle prime quattro colonne delle piastre; le restanti otto colonne sono state impiegate per la realizzazione del duplicato e del triplicato sperimentale come illustrato in Tabella 1.

Tabella 1. Layout della piastra adottato in fase sperimentale

PIASTRA			C _s , M												
			0	0,5	1	1,4	DUPLICATO				TRIPLICATO				
C _p , mg/ml			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	1	A													
	1,5	B													
	2	C													
	3	D													
	4	E													
	6	F													
	8	G													
	10	H													

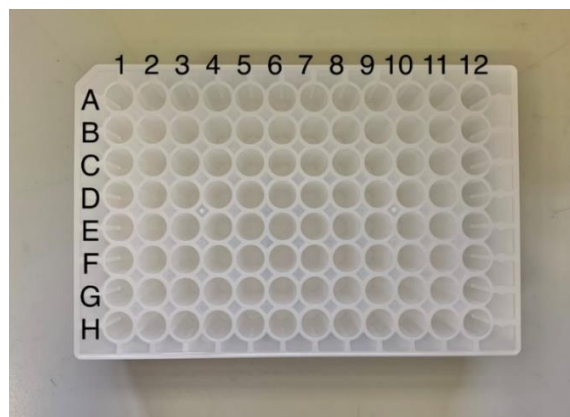


Figura 12. Vista dall'alto di una piastra a 96 pozzetti; le colonne sono identificate attraverso una numerazione progressiva 1-12 mentre le righe sono identificate attraverso le lettere A-H

2.2. Procedura sperimentale per la determinazione delle isoterme

Si riportano nella seguente sezione le operazioni da eseguire per la preparazione di una piastra, ovvero per lo studio di una singola proteina. Attraverso la successiva analisi ed elaborazione dei dati ottenuti è possibile ricavare le corrispondenti isoterme di adsorbimento per la proteina analizzata.

Per la preparazione di una piastra si deve inizialmente mettere a sedimentare la resina, la quale è stoccata in etanolo. Una volta che la resina è completamente sedimentata si aggiunge al sistema acqua distillata fino al raggiungimento di un volume apparente di resina pari al 50% del volume totale del sistema.

Si procede poi con la preparazione di tutte le soluzioni saline. Si preparano quindi una soluzione di idrossido di potassio, una soluzione di solfato di ammonio e diidrogenofosfato di potassio ed una soluzione contenente soltanto il diidrogenofosfato di potassio. La soluzione 6 M di idrossido di potassio è necessaria per la neutralizzazione delle restanti due soluzioni; si pesa quindi l'idrossido di potassio, si discioglie il sale in acqua distillata ed infine si porta a volume la soluzione. Per far fronte all'incremento di temperatura legato all'esotermicità del processo di dissoluzione del sale in acqua si svolge l'operazione all'interno di un bagno di raffreddamento.

Si procede poi con la preparazione della soluzione 2,5 M di solfato di ammonio e 50 mM di diidrogenofosfato di potassio e della soluzione 50 mM di diidrogenofosfato di potassio. La diluizione di questa prima soluzione con la seconda permetterà di raggiungere i valori di concentrazione di solfato di ammonio richieste per le analisi mantenendo inalterata la concentrazione del diidrogenofosfato di potassio. Si pesano quindi i due sali e si disciolgono in acqua distillata senza portare a volume le due soluzioni. Successivamente si analizza il pH delle due soluzioni appena realizzate sfruttando un pHmetro. Tale pH sarà leggermente acido per cui sarà necessario portare a neutralità le soluzioni tramite l'aggiunta della soluzione di idrossido di potassio preparata inizialmente. Si alimenta quindi la soluzione di idrossido di potassio in entrambe le soluzioni fino al raggiungimento di un valore di pH=7. Una volta che entrambe le soluzioni saline sono state neutralizzate, si portano a volume tali soluzioni tramite l'aggiunta di acqua distillata. Si effettua infine l'operazione di diluizione della soluzione ad alta concentrazione di solfato di ammonio con la soluzione a concentrazione nulla di solfato di ammonio.

Una volta realizzate le soluzioni saline si procede con la preparazione delle soluzioni di proteina. Anche in questo caso si preparano delle soluzioni madre di partenza, con concentrazione pari a 10 mg/ml e poi, attraverso un'operazione di diluizione, si ottengono le soluzioni proteiche alle concentrazioni desiderate. Si pesa quindi la proteina, la quale è stoccata in forma di polvere liofilizzata o di cristalli e la si discioglie all'interno delle soluzioni saline precedentemente preparate.

Si effettuano infine le diluizioni delle quattro soluzioni proteiche in modo da ottenere le concentrazioni di proteina desiderate. Per effettuare l'operazione di diluizione si alimentano le stesse soluzioni saline impiegate inizialmente per disciogliere al loro interno la proteina, così da mantenere inalterata la concentrazione dei sali nelle rispettive soluzioni.

2. Materiali e metodi

Terminata la preparazione delle soluzioni si svolgono le seguenti operazioni:

- Si riporta in sospensione la resina e si alimentano 50 μ l di resina all'interno di ciascun pozzetto della piastra filtrante.
- Si esegue il lavaggio della resina alimentando 300 μ l di acqua distillata in ciascun pozzetto della piastra e la si agita per 5 minuti a 1100 rpm e temperatura ambiente (25 °C) sfruttando l'agitatore da banco mostrato in Figura 13.
- Si rimuove l'acqua, ora mista all'etanolo nel quale era stoccata la resina, sfruttando una pompa da vuoto collegata ad un alloggiamento per piastre, il quale è rappresentato in Figura 14. Si eseguono più passaggi di lavaggio, minimo tre, per assicurare una buona accuratezza dell'operazione.

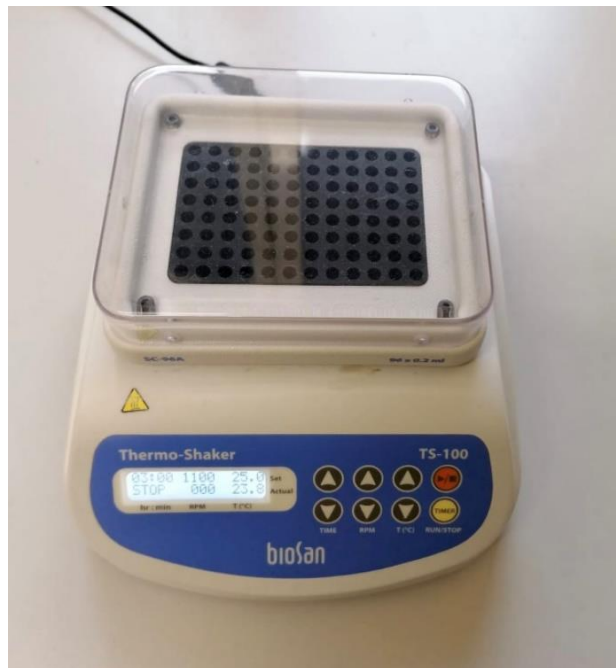


Figura 13. Thermo-Shaker TS-100

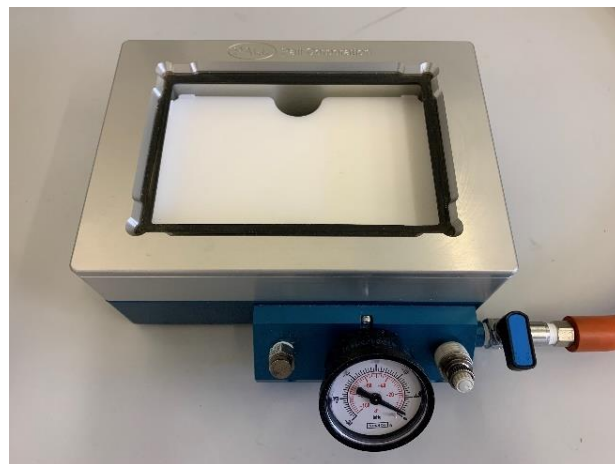


Figura 14. Multiwell plate Manifold; alloggiamento per piastra collegato alla pompa da vuoto

2.2. Procedura sperimentale per la determinazione delle isoterme

- Si esegue l'equilibratura della resina alimentando alla piastra 300 μ l di soluzione salina per ogni pozzetto della piastra rispettando il layout riportato in Tabella 1. Si agita la piastra per 5 minuti a 1100 rpm e temperatura ambiente. Si prepara in questo modo la resina nel venire a contatto con le soluzioni nelle quali sono state disciolte le proteine che verranno successivamente caricate all'interno della piastra.
- Si rimuove la soluzione salina dalla piastra sfruttando la pompa da vuoto. Anche lo step di equilibratura, così come quello di lavaggio, va eseguito più volte; minimo tre.
- Si effettua il carico del campione andando ad inserire 120 μ l di soluzione proteica in ciascun pozzetto della piastra filtrante seguendo il layout riportato in Tabella 1.
- Si pone in agitazione la piastra tramite agitatore da banco per 6 ore a 1100 rpm e temperatura ambiente.
- Si recuperano infine le soluzioni proteiche, le quali sono raccolte in una piastra apposita a 96 pozzetti, sfruttando la pompa da vuoto.

Si analizzano quindi le soluzioni proteiche ottenute attraverso uno spettrofotometro, il quale è mostrato in Figura 15; si determina in questo modo l'assorbanza delle soluzioni analizzate. Tali soluzioni conterranno al loro interno la proteina libera, ovvero quel quantitativo di proteina che non si è legato alla resina. Si trasferiscono quindi 70 μ l di soluzione proteica da ciascun pozzetto della piastra di raccolta all'interno di una piastra apposita per l'analisi allo spettrofotometro, anch'essa a 96 pozzetti così da poter mantenere il layout adottato finora. Si svolge quindi l'analisi spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 280 nm.



Figura 15. Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer, dettaglio piastra a 96 pozzetti impiegata per l'analisi

Si misura infine l'assorbanza di una serie di soluzioni proteiche con concentrazione nota a 280 nm tramite spettrofotometro; la proteina analizzata in questa fase è la stessa proteina campione della quale si stanno valutando le isoterme di adsorbimento. Si potrà realizzare in questo modo la cosiddetta retta

2. Materiali e metodi

di taratura; essa permette di correlare tra loro i valori di assorbanza con i valori di concentrazione per le soluzioni proteiche in analisi. La raccolta dati termina con l'analisi spettrofotometrica delle soluzioni proteiche realizzate inizialmente (il cosiddetto carico) e dei bianchi, ovvero le soluzioni saline nelle quali sono state disciolte le proteine. L'analisi dei bianchi permette di valutare l'entità dell'interferenza dei sali presenti in soluzione nella valutazione dell'assorbanza delle soluzioni proteiche. Si inseriscono quindi 70 μ l delle soluzioni di interesse all'interno delle piastre apposite per l'analisi spettrofotometrica e si svolge tale analisi in modo analogo a quanto descritto in precedenza.

2.3. Analisi dei dati

Come anticipato in precedenza, le analisi allo spettrofotometro si effettuano impiegando sempre lo stesso volume di soluzione all'interno di ciascun pozzetto della piastra. Bisogna infatti considerare che i diversi campioni analizzati sono attraversati dal fascio luminoso in direzione ortogonale. Per questo motivo, il cammino ottico del fascio luminoso è legato al volume di soluzione presente in ciascun pozzetto della piastra analizzata. Adottando quindi lo stesso volume durante ogni analisi spettrofotometrica, il cammino ottico sarà il medesimo per ciascuna prova; tale cammino rappresenterà così una costante nelle diverse analisi svolte.

Sfruttando la legge di Lambert-Beer è possibile correlare l'assorbanza di una soluzione alla sua concentrazione e al cosiddetto cammino ottico come riportato nell'Equazione (11).

$$Abs = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (11)$$

dove *Abs* è l'assorbanza, ε il coefficiente di assorbimento molare (costante una volta fissata la specie chimica in analisi), *c* la concentrazione della soluzione analizzata e *l* il cammino ottico.

Poiché il cammino ottico adottato è sempre il medesimo (ovvero risulta essere costante), è possibile correlare in modo diretto l'assorbanza della soluzione con la rispettiva concentrazione.

Le analisi allo spettrofotometro sono state effettuate tre volte per ciascun campione; si ottiene in questo modo, oltre al triplicato sperimentale, un triplicato analitico. Si aumenta così la consistenza e robustezza dei dati ottenuti dalle prove sperimentali.

2.4. Elaborazione dei dati

Al termine della raccolta dati si sono ottenuti i valori di assorbanza del carico, della soluzione post agitazione contenente le proteine libere, dei bianchi e delle soluzioni proteiche relative alla retta di taratura. Nell'elaborazione dei dati sono stati rimossi eventuali *outlier* e, poiché tutte le misurazioni effettuate comprendevano un triplicato sperimentale ed un triplicato analitico, si è effettuata una media aritmetica tra i diversi valori a disposizione.

2.4. Elaborazione dei dati

Per poter ricavare le isoterme di adsorbimento per la proteina in analisi è necessario innanzitutto determinare la concentrazione delle soluzioni proteiche analizzate tramite spettrofotometro. Per ricavare tale concentrazione, nota l'assorbanza delle soluzioni, si impiega la retta di taratura. La retta di taratura si determina sperimentalmente misurando l'assorbanza della soluzione proteica a diverse concentrazioni note e diagrammando come questa varia con il variare della concentrazione della soluzione; tali rette sono riportate nell'Appendice A.

L'elaborazione dei dati inizia andando a considerare i valori di assorbanza ricavati per il carico e per le soluzioni proteiche post agitazione. A tali valori di assorbanza si va a sottrarre il valore di assorbanza misurato per il bianco, ovvero quel contributo legato alla soluzione salina nella quale la proteina si trova disciolta. Si ottiene in questo modo il valore di assorbanza delle soluzioni legato al solo contributo proteico. Questi valori di assorbanza vengono quindi convertiti in concentrazione sfruttando la retta di taratura citata in precedenza.

La retta di taratura è descritta attraverso l'Equazione (12):

$$Abs = m \cdot c \quad (12)$$

dove Abs rappresenta l'assorbanza della soluzione e c la sua concentrazione mentre m rappresenta il coefficiente angolare della retta. Si può osservare che l'intercetta della retta sia nulla in quanto, in accordo con la legge di Lambert-Beer, una soluzione a concentrazione nulla ha un'assorbanza nulla. Per ricavare il valore di concentrazione del carico e delle soluzioni post agitazione è quindi sufficiente ricavare c dall'Equazione (12) come mostrato nell'Equazione (13).

$$c = \frac{Abs}{m} \quad (13)$$

Per determinare i punti che costituiscono le isoterme di adsorbimento per proteina in analisi si applica il bilancio di materia sul singolo pozzetto, come descritto nell'Equazione (7) e nell'Equazione (8).

Isolando q dall'Equazione (8) si ricava l'Equazione (14):

$$q = \frac{V_{liquido}(c_0 - c_{libera})}{V_{mezzo}} \quad (14)$$

In particolare, il valore di c_{libera} è il valore di concentrazione della soluzione proteica post agitazione ricavato dalla misura spettrofotometrica svolta in fase sperimentale.

Nella precedente equazione, al valore di c_0 non si sostituisce direttamente il valore di concentrazione iniziale della soluzione proteica in quanto bisogna considerare il fenomeno della cosiddetta ritenzione. Quando si estrae la fase liquida dalla piastra sfruttando la pompa da vuoto, una frazione di liquido è trattenuta al suo interno. Per questo motivo, quando si alimentano le soluzioni proteiche nella piastra, all'interno dei pozzetti sarà presente un residuo delle soluzioni impiegate durante la fase

2. Materiali e metodi

di lavaggio ed equilibratura della resina. Tale soluzione andrà a diluire il campione proteico caricato all'interno della piastra per cui, per considerare questo aspetto, c_0 viene valutata attraverso l'Equazione (15) [18, 24]:

$$c_0 = \frac{c_{campione} V_{campione}}{V_{campione} + V_{ritenuto}} = \frac{c_{campione} V_{campione}}{V_{liquido}} \quad (15)$$

dove $c_{campione}$ è la concentrazione iniziale del campione proteico caricato nella piastra, $V_{campione}$ il volume di tale soluzione, $V_{ritenuto}$ il volume di liquido legato al fenomeno di ritenzione e $V_{liquido}$ rappresenta volume totale di liquido presente nel pozzetto; esso è pari alla somma del volume del campione e del volume ritenuto.

Il volume ritenuto all'interno del singolo pozzetto si valuta attraverso una correlazione empirica descritta dall'Equazione (16):

$$V_{ritenuto} = 6 [\mu\text{l}] + 0,6 \cdot V_{mezzo} \quad (16)$$

Evidenze sperimentali hanno infatti dimostrato che mediamente siano trattenuti 6 μl di soluzione nel filtro e che la fase solida trattenga al suo interno una quantità di soluzione pari al 60% del suo volume apparente [18, 24].

Si riportano in Tabella 2 i valori dei parametri noti:

Tabella 2. Valori operativi adottati durante la fase sperimentale

$V_{campione}, \mu\text{l}$	120
$V_{mezzo}, \mu\text{l}$	25
$V_{ritenuto}, \mu\text{l}$	21
$V_{liquido}, \mu\text{l}$	141
$c_{campione}, \text{mg/ml}$	1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10

Valutata c_0 e quindi q attraverso le precedenti formule; andando a diagrammare q in funzione di c_{libera} si ottengono i punti che costituiscono l'isoterma di adsorbimento per la proteina in analisi. Ripetendo questa operazione per ciascuna soluzione proteica, dove ciascuna soluzione è caratterizzata da una differente concentrazione di sale disciolto, si ottengono quattro isoterme di adsorbimento per la proteina analizzata.

Una volta ricavati i punti sperimentali delle isoterme di adsorbimento, si è effettuato il *fitting* di tali dati. Il *fitting* è stato effettuato basandosi sul modello di Langmuir, il quale è descritto dall'Equazione (1). In particolare, si è inizialmente svolto il *fitting* sulle singole isoterme di adsorbimento; successivamente si è considerato l'intero fascio di curve, dove ciascuna curva corrisponde

2.4. Elaborazione dei dati

all'isoterma di adsorbimento della proteina analizzata per una specifica concentrazione di solfato di ammonio. Per svolgere questo secondo tipo di analisi si sono impiegati i due modelli descritti rispettivamente dall'Equazione (2) e dall'Equazione (5).

Per effettuare il *fitting* delle singole curve si è sfruttato un toolbox di Matlab, il *Curve Fitting Toolbox* mentre per effettuare il *fitting* dell'intero fascio di curve si è implementato un codice Matlab.

2.5. Valutazione dell'errore

Per quantificare l'entità degli errori compiuti in fase sperimentale è stata valutata la semidispersione dei dati tramite l'Equazione (17):

$$\Delta x = \frac{x_{max} - x_{min}}{2} \quad (17)$$

dove x_{max} e x_{min} indicano rispettivamente il massimo e il minimo tra i diversi valori misurati per la grandezza in analisi.

I risultati provenienti dalla valutazione della semidispersione sono poi stati rappresentati graficamente sottoforma di barre di errore; si visualizza così in modo immediato l'entità dell'incertezza dei dati sperimentali ottenuti.

Una valutazione più approfondita dell'errore e dell'incertezza sperimentale è stata effettuata conducendo una serie di sperimentazioni in laboratorio. Per svolgere queste analisi si sono impiegate le medesime piastre utilizzate per ricavare le isoterme di adsorbimento e si è applicata la stessa procedura descritta in precedenza (lavaggio ed equilibratura della resina, carico del campione, agitazione e prelievo del surnatante). Il layout della piastra impiegato è rappresentato in Tabella 3.

Tabella 3. Layout della piastra adottato per l'analisi dell'errore sperimentale

PIASTRA		C _s , M													
		0						1							
C _p , mg/ml	10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
		A													
		B													
		C													
		D													
		E													
		F													
		G													
		H													

2. Materiali e metodi

Si sono analizzate delle soluzioni proteiche con una concentrazione di 10 mg/ml in una soluzione di solfato di ammonio con concentrazione di 0 M e 1 M. In questo modo si è valutata la variabilità dei risultati sia nel caso di un legame pressoché assente tra la proteina e la fase stazionaria (assenza di adsorbimento), sia nel caso della presenza di un legame piuttosto marcato tra le due (presenza di adsorbimento). Tutte le proteine per le quali sono state studiate le isoterme di adsorbimento sono state sottoposte a questo tipo di valutazione.

In seguito all'agitazione della piastra e al prelievo del surnatante, dopo aver effettuato l'analisi spettrofotometrica a 280 nm, si sono ottenuti i valori di assorbanza delle soluzioni precedentemente estratte dalla piastra. Si è quindi analizzata la variabilità tra questi diversi valori per entrambe le condizioni oggetto di studio. L'analisi è stata effettuata sia considerando direttamente i valori di assorbanza ottenuti in seguito all'analisi spettrofotometrica, sia considerando i valori di concentrazione delle rispettive soluzioni; questi ultimi sono stati ricavati tramite le rette di taratura. Attraverso questa seconda analisi è stato possibile valutare anche l'errore introdotto dall'impiego della retta di taratura come strumento per la conversione dell'assorbanza di una soluzione nella sua concentrazione.

Per la stima dell'errore si sono impiegati due diversi criteri, il teorema di Tukey e la deviazione mediana assoluta.

Attraverso il teorema di Tukey si valutano inizialmente quelli che costituiscono gli *outliers* del set di dati in analisi. Per la determinazione di tali *outliers* si calcolano inizialmente gli estremi massimo e minimo accettabili per il set di dati analizzato impiegando le Equazioni (18) e (19) ^[25]:

$$x_{max} = \frac{3}{2}(Q_3 - Q_1) + \bar{x} \quad (18)$$

$$x_{min} = \frac{3}{2}(Q_3 - Q_1) - \bar{x} \quad (19)$$

dove x_{max} e x_{min} indicano rispettivamente il valore massimo e minimo accettabili per il set di dati analizzato, \bar{x} il valore medio tra tutti i valori del set mentre Q_1 e Q_3 sono rispettivamente il primo e il terzo quartile del set di dati in analisi.

Una volta rimossi dal set di dati tutti i valori esterni all'intervallo $[x_{min}, x_{max}]$, si valuta il coefficiente di variazione attraverso l'Equazione (20):

$$\sigma^* = \frac{\sigma'}{\bar{x}'} \quad (20)$$

dove σ^* identifica il coefficiente di variazione mentre σ' e \bar{x}' sono rispettivamente la deviazione standard e il valore medio valutati sul set di dati dal quale sono stati rimossi gli *outliers* precedentemente identificati tramite il metodo di Tukey.

2.5. Valutazione dell'errore

Nella seconda analisi si è valutata la deviazione mediana assoluta. La deviazione mediana assoluta è definita come la mediana del valore assoluto delle deviazioni dei dati ricavati sperimentalmente dalla loro mediana, come riportato nell'Equazione (21):

$$MAD = \text{mediana}(|\text{mediana}(X) - x_i|) \quad (21)$$

dove MAD è la deviazione mediana assoluta, X identifica l'intero set di dati in analisi e x_i il valore i -esimo del set di dati considerato.

Si è quindi valutato il coefficiente di variazione tramite l'Equazione (22):

$$\sigma^* = \frac{MAD}{\text{mediana}(X)} \quad (22)$$

Infine, si è valutato l'errore associato alla preparazione delle piastre da analizzare allo spettrofotometro. Per effettuare questa valutazione si è analizzata tramite spettrofotometro una piastra multipozzetto contenente al suo interno la stessa soluzione proteica; la soluzione analizzata è costituita da una soluzione standard di BSA con concentrazione di 1 mg/ml. Anche in questo caso, i dati provenienti dall'analisi allo spettrofotometro sono stati elaborati sfruttando i due criteri citati in precedenza.

2.6. Programmazione degli esperimenti

Come spiegato in precedenza, sono stati svolti più esperimenti per poter analizzare il comportamento di differenti proteine nei confronti di resine con una differente densità di ligandi. In Tabella 4 sono sintetizzate le condizioni operative relative alle diverse prove effettuate e per ciascuna di esse è fornito un codice identificativo.

Come si può osservare in Tabella 4, tutte le proteine sono state sottoposte allo stesso protocollo di agitazione, ad eccezione dell' α -chimotripsina. Tale proteina richiede infatti di essere stoccata a temperature ben inferiori (-20 °C) alle classiche temperature di refrigerazione per cui, per limitare eventuali fenomeni degradativi della proteina, si è accorciato il tempo di agitazione passando da 6 ore a 3 ore. Tale scelta è giustificata dalla presenza di evidenze sperimentali che dimostrano che un tempo di agitazione di 3 ore sia comunque accettabile e permetta di ottenere dei risultati sufficientemente accurati ^[18].

Per quanto riguarda le prove in laboratorio volte all'analisi delle incertezze sperimentali, esse sono state svolte impiegando, per ciascuna proteina, la resina con densità di ligandi di 55 $\mu\text{mol/ml}$. In questo modo si è eliminata l'eventuale variabilità dei risultati legata all'impiego di resine con differente densità di ligandi.

2. Materiali e metodi

Tabella 4. Elenco delle prove sperimentali svolte associate alle relative condizioni e ad un codice identificativo

Codice identificativo	Condizioni della prova
ALB51	Analisi albumina con resina avente densità di ligandi di 51 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 6 ore a 1100 rpm e 25 °C.
ALB55	Analisi albumina con resina avente densità di ligandi di 55 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 6 ore a 1100 rpm e 25 °C.
BSA51	Analisi BSA con resina avente densità di ligandi di 51 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 6 ore a 1100 rpm e 25 °C.
BSA55	Analisi BSA con resina avente densità di ligandi di 55 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 6 ore a 1100 rpm e 25 °C.
CHI51	Analisi α -chimotripsina con resina avente densità di ligandi di 51 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 3 ore a 1100 rpm e 25 °C.
CHI55	Analisi α -chimotripsina con resina avente densità di ligandi di 55 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 3 ore a 1100 rpm e 25 °C.
LAC51	Analisi β -lactoglobulina con resina avente densità di ligandi di 51 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 6 ore a 1100 rpm e 25 °C.
LAC55	Analisi β -lactoglobulina con resina avente densità di ligandi di 55 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 6 ore a 1100 rpm e 25 °C.
ALBer	Quantificazione degli errori sperimentali per l'albumina con resina avente densità di ligandi di 55 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 6 ore a 1100 rpm e 25 °C.
BSAer	Quantificazione degli errori sperimentali per la BSA con resina avente densità di ligandi di 55 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 6 ore a 1100 rpm e 25 °C.
CHier	Quantificazione degli errori sperimentali per l' α -chimotripsina con resina avente densità di ligandi di 55 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 3 ore a 1100 rpm e 25 °C.
LACer	Quantificazione degli errori sperimentali per la β -lactoglobulina con resina avente densità di ligandi di 55 $\mu\text{mol/ml}$. Agitazione di 6 ore a 1100 rpm e 25 °C.

2.6. Programmazione degli esperimenti

I codici presentati in Tabella 4 permettono di identificare univocamente ciascuna prova; tali codici sono rappresentati da una sigla alfanumerica costituita da cinque caratteri. Per quanto riguarda le prove sperimentali volte alla determinazione delle isoterme di adsorbimento, i codici sono formati da tre lettere e due numeri; le tre lettere identificano la proteina studiata mentre i due numeri identificano il lotto di resina impiegato nella prova. Questi ultimi due numeri sono sostituiti dal suffisso 'er' nel caso in cui il codice si riferisca alle prove volte alla stima degli errori compiuti in fase sperimentale.

3. Presentazione dei risultati

3.1. Risultati delle prove sperimentali

Si riportano nella seguente sezione i risultati ricavati in seguito all'elaborazione dei dati ottenuti dalle prove sperimentali. Come già anticipato più volte, sono state ricavate le isoterme di adsorbimento delle proteine in analisi a quattro differenti concentrazioni di sale nel sistema ed in presenza di due differenti lotti di resina.

In Figura 16 sono rappresentate le isoterme di adsorbimento per le proteine studiate nel caso dell'impiego del lotto di resina avente densità di ligandi pari a 51 $\mu\text{mol/ml}$. In Figura 17 invece sono riportati i punti sperimentali ottenuti dall'impiego del lotto di resina con densità di ligandi pari a 55 $\mu\text{mol/ml}$. Tutti i grafici presenti nelle seguenti figure sono associati ad uno dei codici identificativi presentati in Tabella 4; tali codici permettono di identificare in modo univoco la prova sperimentale dalla quale sono stati ricavati i dati.

Le barre di errore rappresentate nelle seguenti figure sono state valutate attraverso i coefficienti di variazione ricavati dall'elaborazione dei dati ottenuti dalle prove sperimentali descritte in precedenza (sezione 2.5.); più precisamente, i coefficienti di variazione impiegati sono riferiti alla deviazione mediana assoluta. Gli errori sono stati valutati diversamente per le ascisse e per le ordinate.

I valori di concentrazione di proteina libera (asse x) sono ottenuti da misure spettrofotometriche e quindi sono soggetti ad un certo errore dipendente dallo strumento impiegato e dalla preparazione dei campioni analizzati. A tale incertezza si somma poi l'errore legato alla retta di taratura impiegata per la conversione dell'assorbanza di una soluzione nella rispettiva concentrazione; l'entità di tale errore sarà quindi legata alla bontà della retta di taratura impiegata. Quest'ultimo contributo è stato stimato in modo conservativo considerando il massimo scostamento in valore assoluto osservato tra la concentrazione effettiva del campione analizzato e la concentrazione fornita dalla retta di taratura corrispondente al valore assorbanza proprio del campione in analisi.

I valori di concentrazione adsorbita (asse y), invece, sono calcolati tramite il bilancio di massa descritto dall'Equazione (7); sono infatti noti i valori dei carichi e del surnatante, i quali sono stati misurati in fase sperimentale. Dato che la procedura high-throughput adottata risulta essere piuttosto articolata, risulta difficile valutare il contributo di ogni incertezza che la condiziona. Per questo motivo, sono state svolte diverse prove di valutazione sperimentale dell'incertezza sulla concentrazione adsorbita; tali prove sono state descritte nella sezione 2.5. del capitolo precedente. Le barre di errore lungo l'asse y sono state quindi valutate andando ad applicare il coefficiente di variazione ottenuto dalle prove di riproducibilità ai valori di concentrazione di proteina adsorbita calcolati con il bilancio di massa. Per eseguire una stima conservativa si sono considerati i coefficienti di variazione valutati in presenza di adsorbimento (ovvero per una concentrazione 1 M di solfato di

3. Presentazione dei risultati

ammonio), condizione che mostra una maggiore variabilità rispetto alla condizione priva di adsorbimento.

Nell'Appendice B sono riportati i risultati delle prove sperimentali dove le barre di errore sono state valutate attraverso la semidispersione.

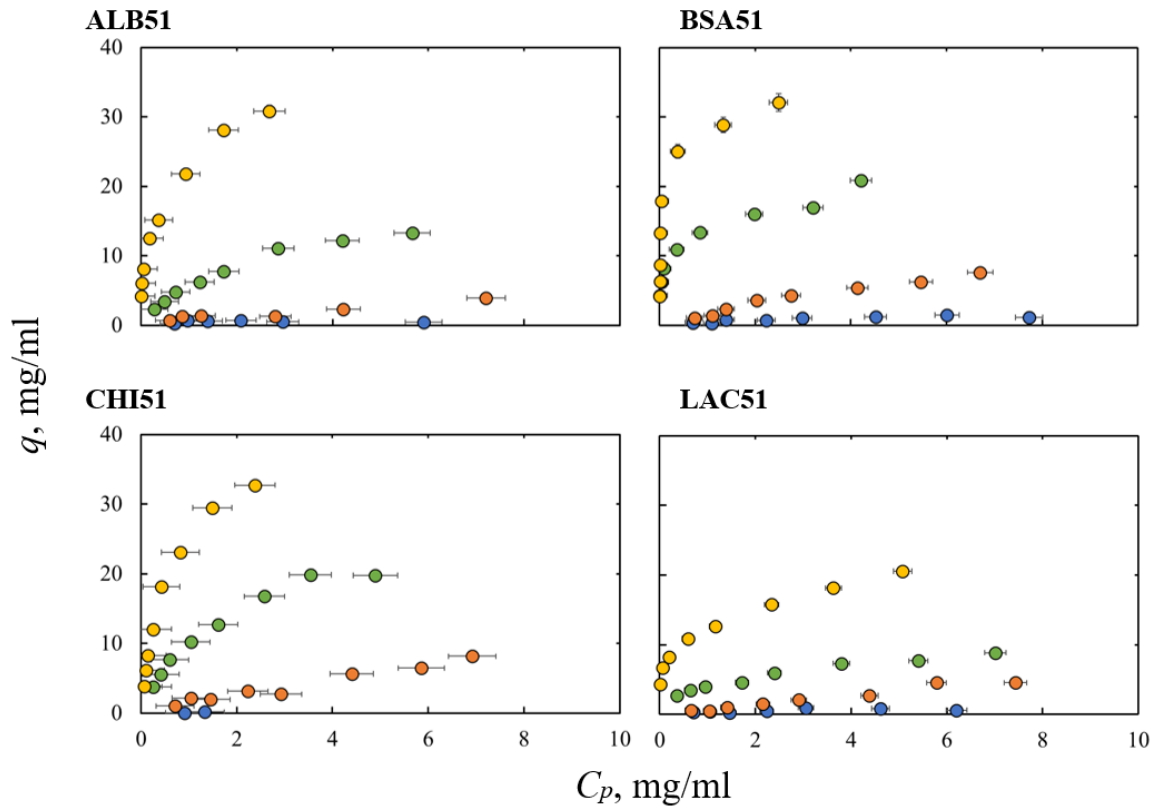


Figura 16. Isotherme di adsorbimento per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

3.1. Risultati delle prove sperimentali

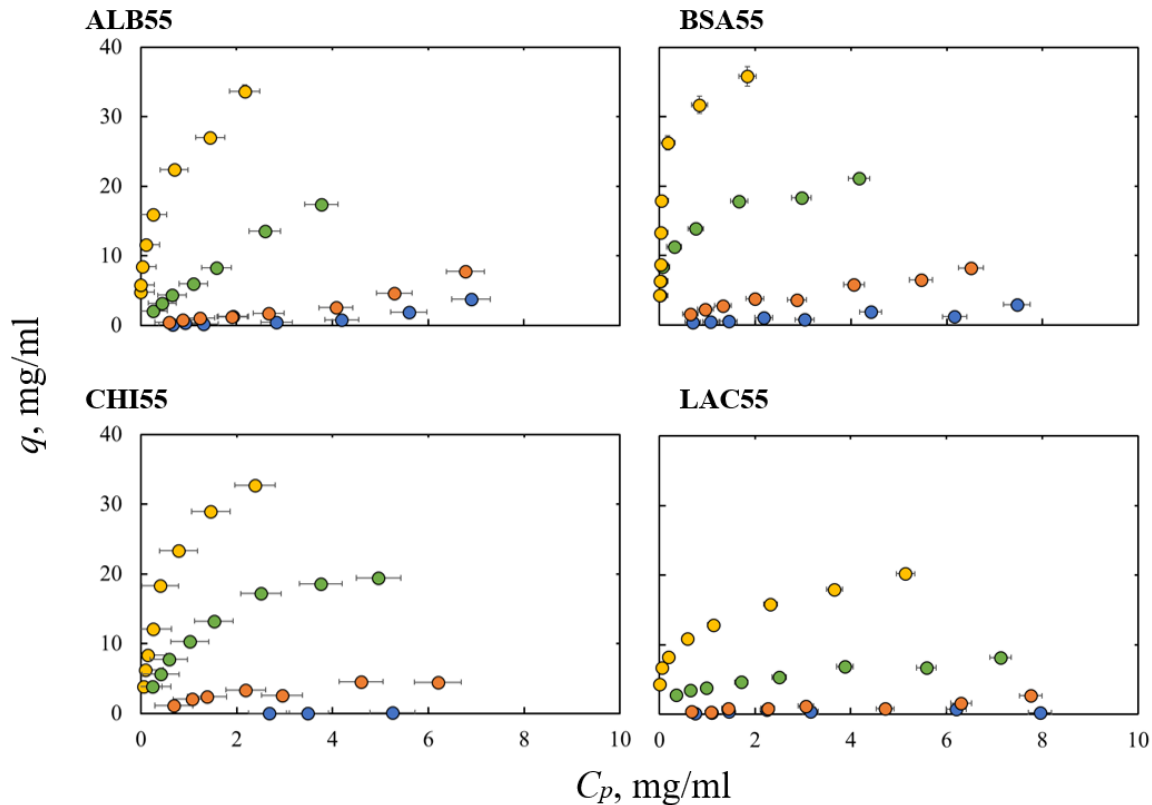


Figura 17. Isotherme di adsorbimento per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

Analizzando le precedenti figure si notano degli andamenti comuni per quanto riguarda le quattro proteine studiate. In particolare, si osserva che per basse concentrazioni saline (pari a 0 M e 0,5 M di solfato di ammonio) i punti che descrivono le isoterme di adsorbimento mostrano un andamento rettilineo. Invece, per concentrazioni saline superiori (pari a 1 M e 1,4 M di solfato di ammonio), si osserva un iniziale tratto lineare, a basse concentrazioni proteiche, ed una successiva tendenza ad un asintoto, a concentrazioni di proteina superiori. Si osserva inoltre che, a parità di proteina, l'asintoto a cui tendono tali punti è situato ad ordinate maggiori con il crescere della concentrazione di sale in soluzione; questo risultato è dovuto all'effetto del sale in soluzione, il quale agisce come modulatore delle interazioni tra la proteina e la fase stazionaria [13, 15, 26].

Si osserva che i *plateau* a cui le isoterme tendono (per quanto riguarda una concentrazione salina di 1 M e 1,4 M) siano comparabili per quanto riguarda l'albumina, la BSA e l' α -chimotripsina; la β -lactoglobulina ha invece delle isoterme i cui *plateau* si dispongono ad ordinate inferiori. Il valore assunto dal *plateau* delle isoterme fornisce la quantità massima di proteina con cui la resina interagisce per unità di volume di resina nelle condizioni operative adottate. Bisogna comunque considerare che la β -lactoglobulina ha la massa molecolare più bassa tra le proteine analizzate, il che giustifica il relativo *plateau* situato ad ordinate inferiori.

3. Presentazione dei risultati

È infine possibile notare che per l' α -chymotripsina vi sia una carenza di dati per quanto riguarda le analisi svolte ad una concentrazione 0 M di solfato di ammonio. Si segnala infatti che a bassa concentrazione salina avviene un adsorbimento trascurabile di proteina alla fase stazionaria e l'incertezza legata alla procedura sperimentale, su una scala così ridotta, diventa determinante. Inoltre, la correlazione adottata nel calcolo del volume di ritenzione impiegata nell'elaborazione dei dati introduce necessariamente un errore in quanto consiste in una stima approssimativa di tale volume. Più precisamente, al termine degli esperimenti, ciò che si analizza è la concentrazione di proteina presente all'interno della fase mobile, ovvero quel quantitativo di proteina che non si è legato alla fase stazionaria. Per differenza tra la concentrazione inizialmente presente nel pozzetto della piastra e la concentrazione rimasta in fase liquida si ricava quindi la quantità di proteina che si è legata alla fase solida. A causa del fenomeno di ritenzione, come precedentemente illustrato, si corregge il valore di concentrazione di proteina inizialmente presente nel pozzetto tramite l'Equazione (15). Questa valutazione, a causa dell'incertezza legata alla correlazione stessa, può portare ad una sottostima di tale valore di concentrazione tale da rendere negativa la differenza tra la concentrazione inizialmente presente nel pozzetto e la concentrazione valutata nella fase liquida al termine della procedura; i dati risultano così inutilizzabili in quanto privi di significato fisico.

3.2. *Fitting* dei dati sperimentali

Si illustrano nella seguente sezione le diverse strategie di *fitting* adottate per la descrizione dei dati sperimentali. Per ciascuna proteina analizzata si è eseguito il *fitting* dei relativi punti attraverso quattro diverse strategie.

Inizialmente si è eseguito singolarmente il *fitting* di ciascuna isoterma. Per eseguire questa tipologia di analisi si è impiegato il modello di Langmuir, il quale è descritto dall'Equazione (1), riscritto in funzione di due parametri generici a e b come mostrato nell'Equazione (23).

$$q = \frac{aC_p}{1 + bC_p} \quad (23)$$

L'Equazione (24) illustra la relazione esistente tra i parametri q_{max} e K del modello di Langmuir e i parametri a e b adottati in fase di *fitting*; il parametro a risulta essere adimensionale mentre il parametro b ha le unità di misura dell'inverso di una concentrazione^[12].

$$\begin{cases} q_{max} = \frac{a}{b} \\ K = \frac{1}{b} \end{cases} \quad (24)$$

Alternativamente si è effettuato un *fitting* singolo delle diverse curve, in modo analogo a quanto appena descritto, andando però ad imporre a priori il valore del parametro a valutando la tangente dell'isoterma nell'origine del sistema di riferimento. Il parametro a nella funzione di Langmuir descritta dall'Equazione (23) identifica infatti la pendenza della curva nell'origine; il parametro b è

3.2. *Fitting* dei dati sperimentali

invece correlato all'ordinata dell'asintoto a cui tende l'isoterma. Attraverso la precedente strategia di *fitting*, la determinazione del parametro b della funzione influiva sulla determinazione del parametro a e difficilmente quest'ultimo corrispondeva esattamente con la pendenza delle curve in analisi in corrispondenza dell'origine. Questa seconda valutazione ha permesso di osservare come questo aspetto andasse ad inficiare sul *fitting* dei dati sperimentali. Per eseguire la stima del parametro a si sono considerati i punti sperimentali dell'isoterma appartenenti alla regione lineare della curva e si è valutata la retta interpolante tali dati e passante per l'origine. Noto quindi il valore del parametro a , il parametro b è stato determinato imponendo il *fitting* dei punti sperimentali tramite il modello di Langmuir descritto dall'Equazione (23) con i valori di a precedentemente valutati.

Infine, si sono analizzate delle strategie di *fitting* che coinvolgessero l'intero fascio di curve, ovvero l'insieme delle quattro curve parametrizzate dalla concentrazione di sale nel sistema. Per svolgere questo tipo di *fitting* è stato necessario andare ad imporre alcuni vincoli sui parametri a e b della funzione di Langmuir. Attraverso il *fitting* dell'intero fascio di curve tali parametri non possono più variare liberamente come nel caso del *fitting* eseguito sulle singole curve; essi risultano essere delle funzioni della concentrazione di sale. Si sono studiate due strategie di *fitting*: la prima prevede una dipendenza di tipo esponenziale dei parametri a e b dalla concentrazione di sale C_s (Equazioni 25-26); la seconda prevede una dipendenza che segue una legge di potenza tra a e b e C_s (Equazioni 27-28).

$$q = \frac{q_{max} \exp(-kC_s) C_p}{K + \exp(-kC_s) C_p} = \frac{aC_p}{1 + bC_p} \quad (25)$$

$$\begin{cases} a = \frac{q_{max}}{K} \exp(-kC_s) \\ b = \frac{1}{K} \exp(-kC_s) \end{cases} \quad (26)$$

$$q = \frac{\Lambda K' C_s^\alpha C_p}{1 + K' C_s^\alpha C_p} = \frac{aC_p}{1 + bC_p} \quad (27)$$

$$\begin{cases} a = \Lambda K' C_s^\alpha \\ b = K' C_s^\alpha \end{cases} \quad (28)$$

In Figura 18 ed in Figura 19 sono riportati i risultati del *fitting* svolto singolarmente su ciascuna isoterma per quanto riguarda i dati presentati precedentemente. I valori dei parametri della funzione di Langmuir descritta dall'equazione (23) sono riportati nelle Tabelle 5, 6, 7 ed 8.

3. Presentazione dei risultati

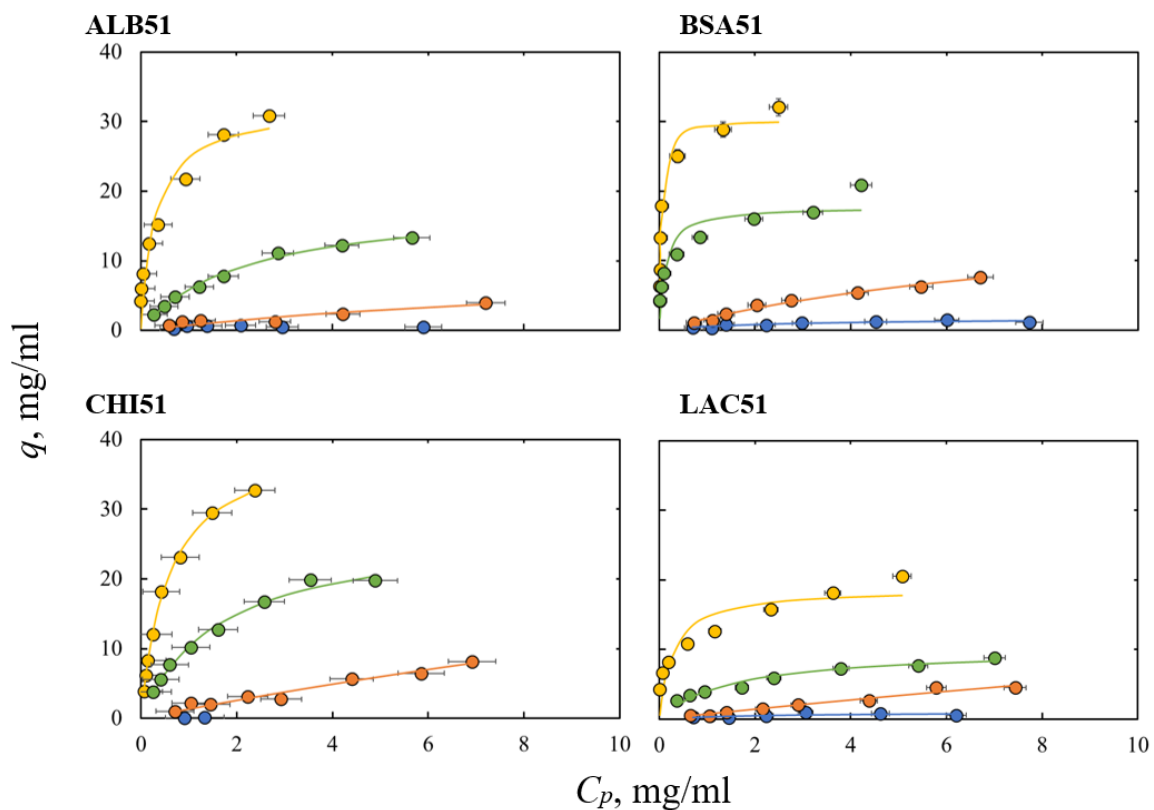


Figura 18. *Fitting* singolo di ciascuna isoterma di adsorbimento per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

3.2. Fitting dei dati sperimentali

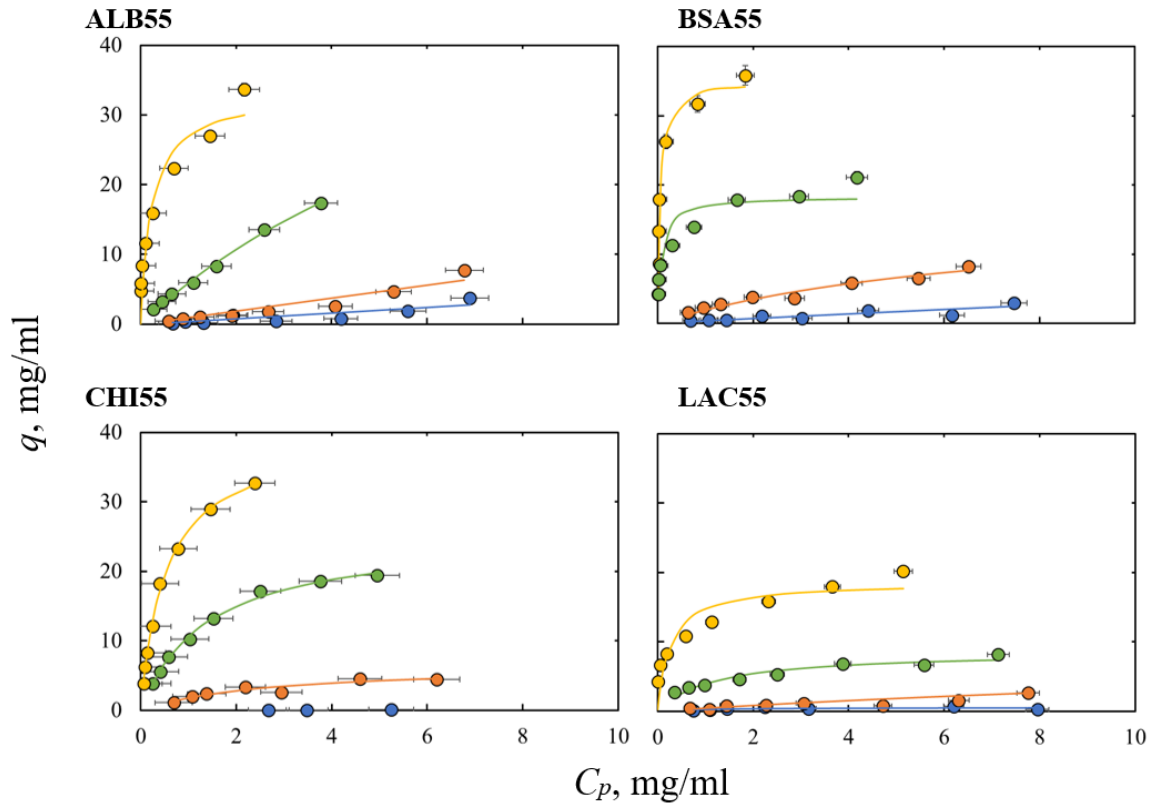


Figura 19. *Fitting* singolo di ciascuna isoterma di adsorbimento per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

Si osserva come il *fitting* sia generalmente buono: le curve che si ottengono descrivono in modo piuttosto fedele i dati sperimentali a disposizione. L'eventuale discrepanza presente tra i dati sperimentali e la curva ottenuta attraverso il *fitting* di tali dati è imputabile a due differenti aspetti: l'incertezza di tipo sperimentale legata ai dati a disposizione; l'adozione del modello di Langmuir per la descrizione delle isoterme.

Il modello di Langmuir, in quanto modello, ha l'obiettivo di semplificare il sistema reale studiato con il fine di poterlo descrivere ed analizzare in modo più semplice. Come tutti i modelli, anche il modello di Langmuir è il frutto di una serie di semplificazioni ed assunzioni; la sua descrizione dei dati sperimentali sarà quindi fedele a tali dati soltanto qualora le relative assunzioni siano soddisfatte dal sistema studiato. Il modello di Langmuir è uno dei più diffusi per la descrizione delle isoterme di adsorbimento in quanto risulta essere estremamente semplice e permette quindi una facile descrizione dei sistemi analizzati [16].

3. Presentazione dei risultati

Tabella 5. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* delle singole isoterme; dati relativi all'albumina

	Albumina							
C_s, M	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$				$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$			
	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml
0	-	-	-	-	0,398	$9,39 \cdot 10^{-13}$	$4,24 \cdot 10^{11}$	$1,06 \cdot 10^{12}$
0,5	0,823	0,0825	9,97	12,2	0,929	$3,00 \cdot 10^{-14}$	$3,10 \cdot 10^{13}$	$3,33 \cdot 10^{13}$
1	8,41	0,450	18,7	2,22	6,49	0,107	60,6	9,34
1,4	106	3,31	32,2	0,302	146	4,39	33,1	0,228

Tabella 6. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* delle singole isoterme; dati relativi alla BSA

	BSA							
C_s, M	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$				$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$			
	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml
0	0,716	0,401	1,79	2,49	0,349	0,00718	48,6	139
0,5	1,91	0,107	17,8	9,36	2,22	0,136	16,3	7,36
1	143	8,11	17,7	0,123	223	12,2	18,3	0,0821
1,4	749	24,6	30,4	0,0406	701	20,0	35,1	0,0501

Tabella 7. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* delle singole isoterme; dati relativi all' α -chimotripsina

	α-chimotripsina							
C_s, M	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$				$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$			
	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml
0	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	1,35	0,0268	50,4	37,3	2,49	0,384	6,48	2,61
1	16,5	0,601	27,4	1,66	18,3	0,718	25,4	1,39
1,4	70,3	1,73	40,7	0,579	75,0	1,89	39,7	0,529

3.2. Fitting dei dati sperimentali

Tabella 8. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* delle singole isoterme; dati relativi alla β -lactoglobulina

C_s, M	β -lactoglobulina							
	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$				$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$			
	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml
0	0,530	0,528	1,00	1,90	0,561	0,923	0,607	1,08
0,5	0,735	0,0181	40,6	55,2	0,448	0,0404	11,1	24,8
1	6,76	0,672	10,1	1,49	7,32	0,845	8,66	1,18
1,4	67,8	3,62	18,7	0,276	70,2	3,78	18,6	0,265

In Figura 20 ed in Figura 21 sono rappresentati i *fitting* svolti singolarmente su ciascuna isoterma dove il parametro a della funzione di Langmuir è stato determinato a priori come pendenza delle isoterme in corrispondenza dell'origine degli assi. In questo caso quindi il *fitting* delle curve è stato svolto soltanto in funzione del parametro b .

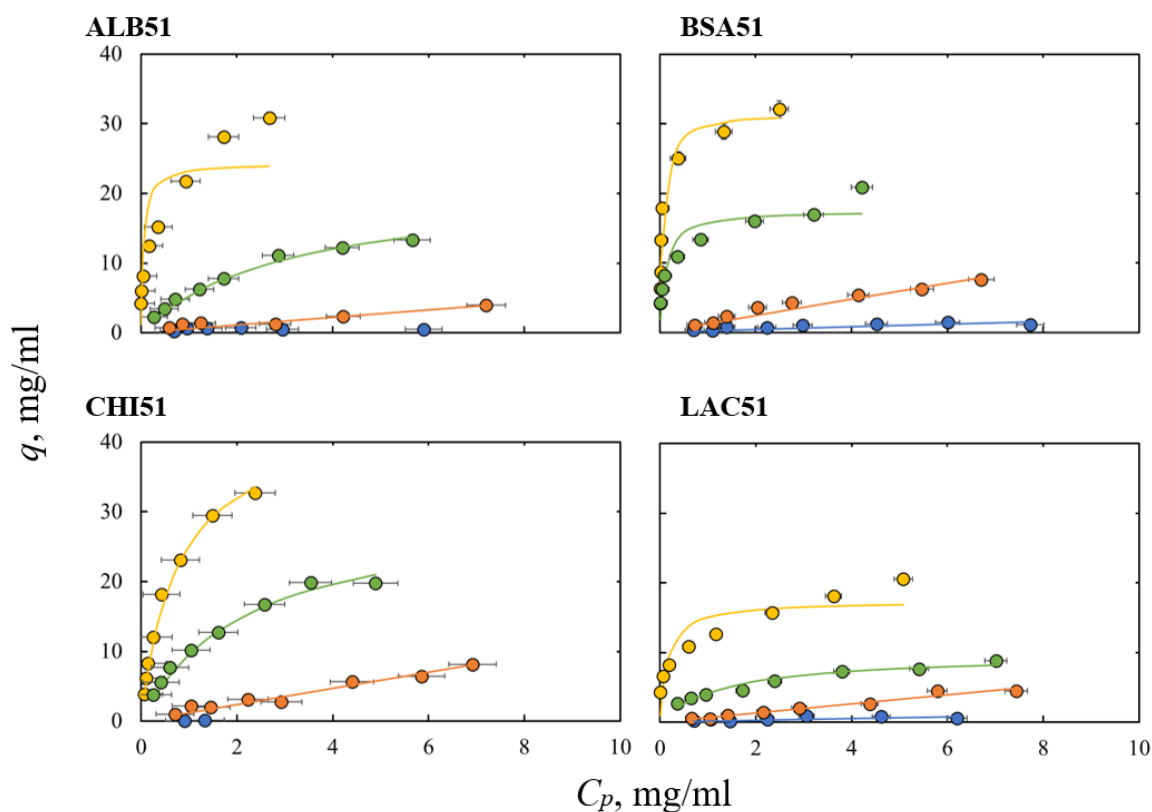


Figura 20. *Fitting* singolo delle isoterme di adsorbimento previa stima del parametro a per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

3. Presentazione dei risultati

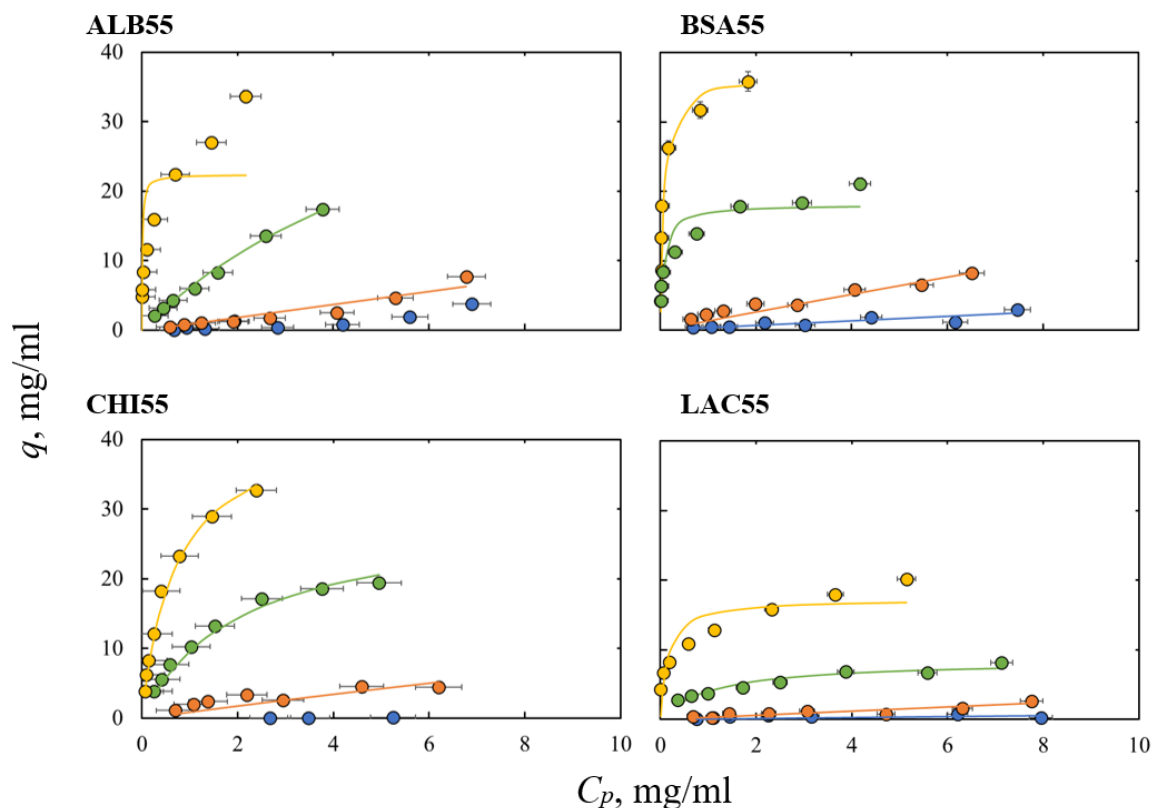


Figura 21. *Fitting* singolo delle isoterme di adsorbimento previa stima del parametro a per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

Osservando le precedenti immagini si nota che il *fitting* risulta essere buono anche in questo caso. Un'eccezione è rappresentata dall'isoterma di adsorbimento dell'albumina a 1,4 M di solfato di ammonio. Si osserva infatti che il *fitting* proposto non descriva in modo corretto l'andamento dei punti sperimentali: il *plateau* raggiunto dalla curva ricavata tramite il *fitting* dei dati si discosta notevolmente dal *plateau* suggerito da questi ultimi. Se nella strategia di *fitting* adottata precedentemente vi erano due parametri sui quali era possibile agire per minimizzare lo scostamento tra i punti sperimentali e la rispettiva curva, ovvero a e b ; ora il parametro a è determinato a priori attraverso la pendenza dell'isoterma nell'origine. Per questo motivo, durante l'operazione di *fitting* si può soltanto agire sul parametro b per minimizzare lo scostamento tra i dati sperimentali e la predizione fornita dal modello di Langmuir; ne consegue necessariamente un peggioramento del *fitting*. Nel caso dell'albumina citata inizialmente, l'ottenimento di un *fitting* inadeguato è dovuto alla presenza di un tratto lineare dell'isoterma estremamente pendente e al fatto che tale pendenza si smorza piuttosto velocemente muovendosi verso l'asintoto della curva. Si osserva infatti che anche la BSA ha un tratto lineare particolarmente pendente, tuttavia, l'isoterma associata alla BSA è caratterizzata da una curvatura più accentuata, la quale permette l'ottenimento di un *fitting* più fedele ai dati sperimentali a disposizione.

Si osserva infine che non è stato eseguito il *fitting* per le curve relative ad una concentrazione 0 M di solfato di ammonio per l'albumina e per l' α -chiotripsina: nel primo caso ciò è legato alla presenza di dati sperimentali particolarmente sparsi; nel secondo caso ad una carenza di dati a disposizione.

3.2. Fitting dei dati sperimentali

I valori numerici dei parametri della funzione di Langmuir descritta dall'Equazione (23) sono riportati nelle Tabelle 9, 10, 11 e 12.

Tabella 9. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* delle singole isoterme previa determinazione del parametro a ; dati relativi all'albumina

		Albumina							
		$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$				$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$			
C_s, M		a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml
0		-	-	-	-	-	-	-	-
0,5		0,561	0,00404	139	247	0,929	$1,86 \cdot 10^{-9}$	$5,01 \cdot 10^8$	$5,39 \cdot 10^8$
1		6,95	0,326	21,3	3,06	6,91	0,135	51,3	7,42
1,4		474	19,4	24,4	0,0515	$1,87 \cdot 10^3$	83,3	22,4	0,0120

Tabella 10. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* delle singole isoterme previa determinazione del parametro a ; dati relativi alla BSA

		BSA							
		$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$				$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$			
C_s, M		a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml
0		0,221	0,0162	13,6	61,7	0,335	0,000392	854	$2,55 \cdot 10^3$
0,5		1,23	0,00638	194	157	1,32	0,00611	216	164
1		154	8,74	17,6	0,144	250	13,8	18,1	0,0723
1,4		447	14,1	31,8	0,0711	472	12,8	36,9	0,0782

Tabella 11. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* delle singole isoterme previa determinazione del parametro a ; dati relativi all' α -chimotripsina

		α-chimotripsina							
		$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$				$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$			
C_s, M		a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml
0		-	-	-	-	-	-	-	-
0,5		1,18	0,00170	692	587	0,914	0,0158	57,7	63,1
1		13,9	0,459	30,4	2,18	14,2	0,488	29,1	2,05
1,4		57,9	1,30	44,5	0,768	61,4	1,42	43,3	0,706

3. Presentazione dei risultati

Tabella 12. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* delle singole isoterme previa determinazione del parametro a ; dati relativi alla β -lactoglobulina

C_s, M	β -lactoglobulina							
	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$				$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$			
	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml
0	0,156	0,0242	6,47	41,4	0,0855	0,0284	3,01	35,2
0,5	0,665	0,00159	420	631	0,297	$1,36 \cdot 10^{-6}$	$2,18 \cdot 10^5$	$7,33 \cdot 10^5$
1	7,49	0,774	9,68	1,29	7,77	0,916	8,489	1,09
1,4	110	6,33	17,4	0,158	116	6,69	17,3	0,149

In Figura 22 ed in Figura 23 sono rappresentati i *fitting* svolti sull'intero fascio di curve impiegando il modello descritto dall'Equazione (25); il modello impiegato prevede una dipendenza di tipo esponenziale tra i parametri a e b del modello stesso e la concentrazione di sale nel sistema, come descritto dall'Equazione (26). I valori numerici dei parametri costituenti il modello analizzato sono riportati nelle Tabelle 13, 14, 15 e 16.

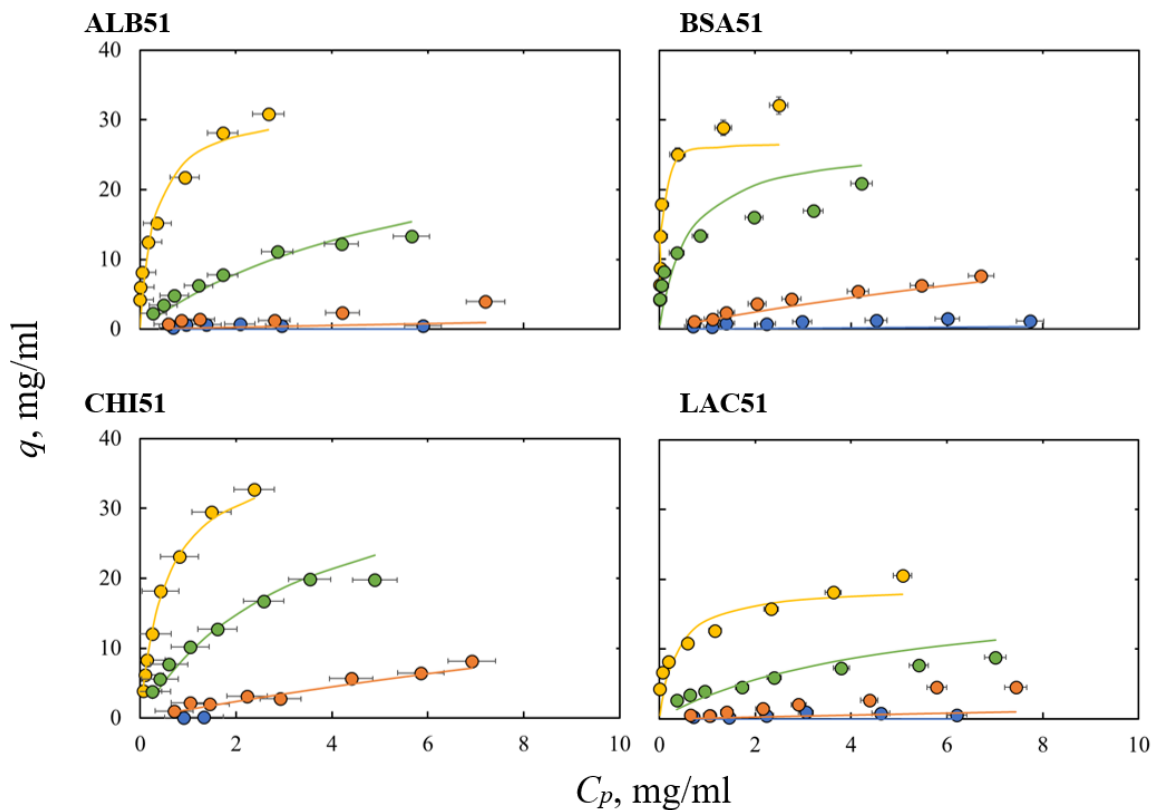


Figura 22. *Fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (25) per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

3.2. Fitting dei dati sperimentali

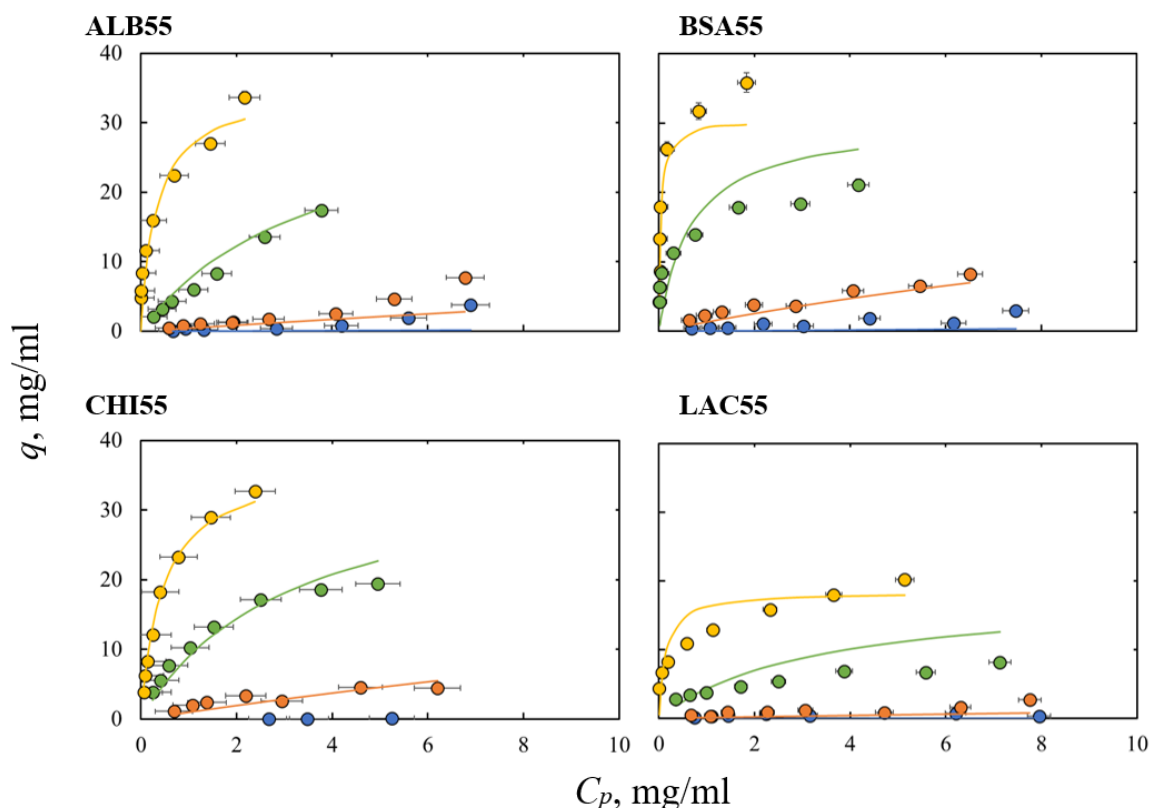


Figura 23. *Fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (25) per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

Andare ad imporre un vincolo sui due parametri costituenti la funzione di Langmuir, in questo caso una relazione di tipo esponenziale tra i parametri a e b e la concentrazione del sale, corrisponde necessariamente ad una descrizione peggiore dei dati sperimentali rispetto al *fitting* singolo svolto su ciascuna curva. Nel *fitting* singolo, infatti, i parametri a e b del modello potevano variare senza dover soddisfare alcuna relazione con la concentrazione salina del sistema; nel *fitting* del fascio di curve invece tali parametri devono sottostare a precise relazioni che li legano a tale concentrazione. Ovviamente, il *fitting* dell'intero fascio risulta essere tanto migliore e prossimo al *fitting* delle singole curve tanto più le condizioni imposte sui parametri a e b sono soddisfatte. Nell'Appendice C sono riportati i grafici che mostrano gli andamenti a e b in funzione della concentrazione di sale nel sistema; è presente un confronto che mostra lo scostamento tra l'andamento di tipo esponenziale ricavato attraverso il *fitting* del fascio di curve e l'andamento osservato attraverso il *fitting* delle singole curve costituenti il fascio.

Osservando le precedenti figure si nota ad esempio che il *fitting* dell'albumina risulta essere buono per concentrazioni di sale elevate mentre risulta inadeguato per le isoterme riferite ad una bassa concentrazione salina. L'opposto si verifica con la BSA; essa è caratterizzata da un *fitting* buono per basse concentrazioni di solfato di ammonio mentre tale *fitting* peggiora per concentrazioni di sale superiori. Infine, si osserva che l' α -chimotripsina mostra il miglior riscontro tra i dati sperimentali e le previsioni del modello impiegato.

3. Presentazione dei risultati

Nell'Appendice D sono riportati i grafici relativi ad una strategia di *fitting* alternativa: si è determinato il parametro a del modello attraverso la determinazione della tangente alle isoterme nell'origine del sistema di riferimento; si è osservata la variazione del parametro a rispetto alla concentrazione di sale nel sistema e si è eseguito un *fitting* di tali dati secondo la legge esponenziale descritta dall'Equazione (26); si è eseguito infine il *fitting* del fascio di isoterme imponendo a priori i valori di a precedentemente determinati e si è ricavato in questo modo il parametro b .

Tabella 13. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (25); dati relativi all'albumina

		Albumina									
		$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
C_s, M		a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}
0		0,00319	0,000100	31,9	$1,00 \cdot 10^4$	-7,41	0,0211	0,000600	35,1	$1,67 \cdot 10^3$	-6,11
0,5		0,130	0,00407				0,447	0,0127			
1		5,29	0,166				9,48	0,270			
1,4		103	3,22				109	3,11			

Tabella 14. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (25); dati relativi alla BSA

		BSA									
		$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
C_s, M		a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}
0		0,0402	0,00150	26,8	667	-7,03	0,0426	0,00140	30,4	714	-6,98
0,5		1,35	0,0503				1,40	0,0460			
1		45,3	1,69				46,0	1,51			
1,4		752	28,0				750	24,7			

Tabella 15. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (25); dati relativi all' α -chimotripsina

		α-chimotripsina									
		$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
C_s, M		a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}
0		0,134	0,00350	38,4	286	-4,50	0,0929	0,00250	37,2	400	-4,85
0,5		1,27	0,0332				1,05	0,0282			
1		12,1	0,315				11,8	0,318			
1,4		73,0	1,90				82,2	2,21			

3.2. Fitting dei dati sperimentali

Tabella 16. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (25); dati relativi alla β -lactoglobulina

		β -lactoglobulina								
C_s, M	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}
0	0,00573	0,000300	19,1	$3,33 \cdot 10^3$	-6,54	0,00184	0,000100	18,4	$1,00 \cdot 10^4$	-8,02
0,5	0,150	0,00788				0,101	0,00551			
1	3,95	0,207				5,57	0,303			
1,4	54,0	2,83				138	7,48			

In Figura 24 ed in Figura 25 sono rappresentati i *fitting* svolti sull'intero fascio di curve impiegando il modello descritto dall'Equazione (27); il modello in questione prevede una dipendenza che segue una legge di potenza tra i parametri a e b del modello stesso e la concentrazione di sale nel sistema, come descritto dall'Equazione (28). I valori numerici dei parametri costituenti il modello analizzato sono riportati nelle Tabelle 17, 18, 19 e 20; nelle seguenti tabelle l'unità di misura di K' è tale da verificare la coerenza dimensionale dell'espressione (tale unità di misura è funzione del parametro α , il quale rappresenta l'esponente della concentrazione di sale nella relazione che lega tale concentrazione ai parametri a e b del modello).

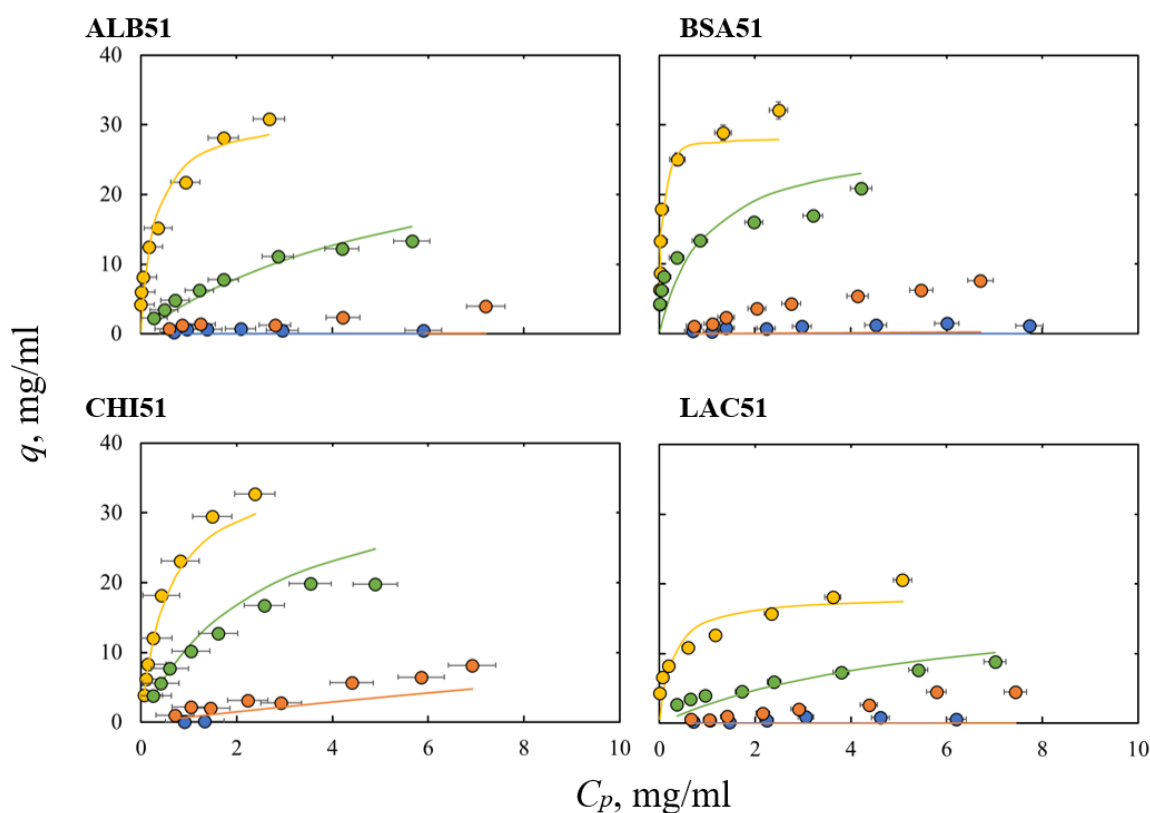


Figura 24. *Fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (27) per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

3. Presentazione dei risultati

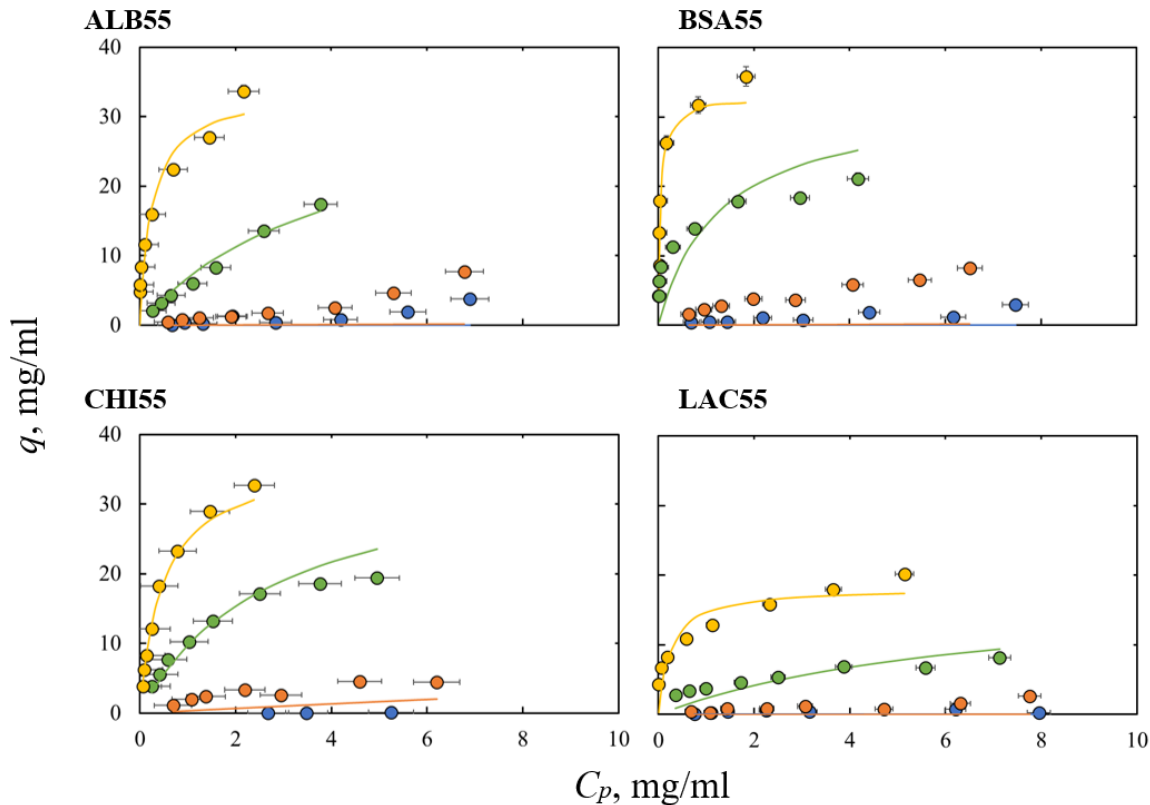


Figura 25. *Fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (27) per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

Osservando le precedenti immagini si nota come quest'ultima strategia di *fitting* proposta non sia particolarmente valida nel descrivere le isoterme di adsorbimento per le diverse proteine analizzate. Questo aspetto suggerisce che i parametri a e b del modello, per quanto riguarda le proteine analizzate, non mostrino una crescita secondo una legge di potenza con la concentrazione di sale nel sistema. In particolare, è possibile osservare che per tutte le proteine oggetto di studio il *fitting* delle curve relative ad una bassa concentrazione di solfato di ammonio (0 M e 0,5 M) risulta essere totalmente inadeguato nella descrizione dei punti sperimentali; il *fitting* migliora per le isoterme relative ad una concentrazione di sale maggiore (1 M e 1,4 M).

Un limite di quest'ultimo modello riguarda infatti la descrizione dei dati relativi ad una concentrazione nulla di sale. Osservando l'Equazione (28), la quale descrive la dipendenza dei parametri a e b del modello con la concentrazione di sale nel sistema, si nota che per una concentrazione nulla di sale i rispettivi parametri del modello siano nulli; la relativa isoterma di adsorbimento sarà quindi nulla per qualsiasi valore di concentrazione di proteina in fase liquida. Il modello presuppone quindi che per concentrazioni di sale nulle non si verifichi l'adsorbimento di proteina alla resina; nei sistemi analizzati tuttavia l'adsorbimento, anche se in lieve entità, è presente.

3.2. Fitting dei dati sperimentali

Tabella 17. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (27); dati relativi all'albumina

Albumina										
C_s, M	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
	a	$b,$ ml/mg	K'	$\Lambda,$ mg/ml	α	a	$b,$ ml/mg	K'	$\Lambda,$ mg/ml	α
0	0	0	0,167	31,6	9,04	0	0	0,249	33,8	8,23
0,5	0,0100	0,000320				0,0280	0,000830			
1	5,28	0,167				8,42	0,249			
1,4	110	3,49				134	3,97			

Tabella 18. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (27); dati relativi alla BSA

BSA										
C_s, M	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
	a	$b,$ ml/mg	K'	$\Lambda,$ mg/ml	α	a	$b,$ ml/mg	K'	$\Lambda,$ mg/ml	α
0	0	0	1,04	28,3	9,70	0	0	0,795	32,8	9,94
0,5	0,0353	0,00125				0,0266	0,000810			
1	29,4	1,04				26,1	0,795			
1,4	771	27,2				739	22,5			

Tabella 19. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (27); dati relativi all' α -chymotripsina

α -chymotripsina										
C_s, M	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
	a	$b,$ ml/mg	K'	$\Lambda,$ mg/ml	α	a	$b,$ ml/mg	K'	$\Lambda,$ mg/ml	α
0	0	0	0,422	36,9	4,31	0	0	0,361	36,8	5,23
0,5	0,787	0,0213				0,355	0,0100			
1	15,6	0,422				13,3	0,361			
1,4	66,4	1,80				77,1	2,10			

3. Presentazione dei risultati

Tabella 20. Parametri della funzione di Langmuir ricavati attraverso il *fitting* del fascio di curve secondo il modello descritto dall'Equazione (27); dati relativi alla β -lactoglobulina

		β -lactoglobulina								
C_s, M	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
	a	$b,$ ml/mg	K'	$\Lambda,$ mg/ml	α	a	$b,$ ml/mg	K'	$\Lambda,$ mg/ml	α
0	0	0	0,174	18,4	9,19	0	0	0,148	18,2	9,85
0,5	0,00550	0,000300				0,00293	0,000160			
1	3,21	0,174				2,71	0,148			
1,4	70,6	3,83				74,5	4,09			

Si può quindi concludere che tra le quattro strategie di *fitting* adottate, il *fitting* svolto singolarmente su ciascuna curva sia il migliore nella descrizione dei punti sperimentali. Questo risultato era prevedibile in quanto tale strategia di *fitting* non impone alcuna condizione tra i parametri a e b del modello e la concentrazione di sale presente nel sistema; i parametri sono quindi liberi di variare senza alcun vincolo, se non quello di rispettare l'equazione stessa del modello. Infine, si è osservato che generalmente i *fitting* svolti sull'intero fascio di curve mostrino alcuni limiti nella rappresentazione dei dati sperimentali; questo risultato suggerisce quindi che, per le proteine analizzate, i parametri a e b del modello non seguano né una legge di tipo esponenziale, né una legge di tipo potenza con la concentrazione di sale nel sistema. È noto, infatti, che le leggi di tipo esponenziale e potenza siano valide in un intervallo di concentrazioni di sale piuttosto ridotto ^[12]; nelle prove svolte in questo studio, tuttavia, la concentrazione salina varia in un intervallo relativamente ampio. Un'eccezione potrebbe essere rappresentata dall' α -chimotripsina la quale mostra, in prima approssimazione, un *fitting* del fascio di curve piuttosto fedele ai dati sperimentali qualora si imponga una relazione di tipo esponenziale tra i parametri del modello e la concentrazione di sale nel sistema. Bisogna comunque considerare che, tra le quattro proteine analizzate, l' α -chimotripsina soddisfa maggiormente il vincolo dettato dal modello esponenziale, ovvero una variazione contenuta della concentrazione di sale nel sistema; tale proteina, infatti, a causa della mancanza di dati, non dispone del *fitting* svolto sull'isoterma relativa ad una concentrazione nulla di solfato di ammonio.

3.3. Variabilità dei lotti di resina: confronto dei risultati

Si riporta nella seguente sezione un confronto tra le isoterme di adsorbimento ricavate per le proteine studiate in funzione del lotto di resina impiegato. In Figura 26 sono riportate le isoterme di adsorbimento relative ad una concentrazione 1,4 M di solfato di ammonio per le proteine analizzate. Dall'osservazione dei diversi grafici si nota che, andando a variare il lotto di resina impiegato nel processo, variano le isoterme di adsorbimento dell'albumina e della BSA. Per quanto riguarda invece l' α -chimotripsina e la β -lactoglobulina, queste non risultano essere influenzate in modo considerevole dal lotto di resina utilizzato in fase sperimentale.

3.3. Variabilità dei lotti di resina: confronto dei risultati

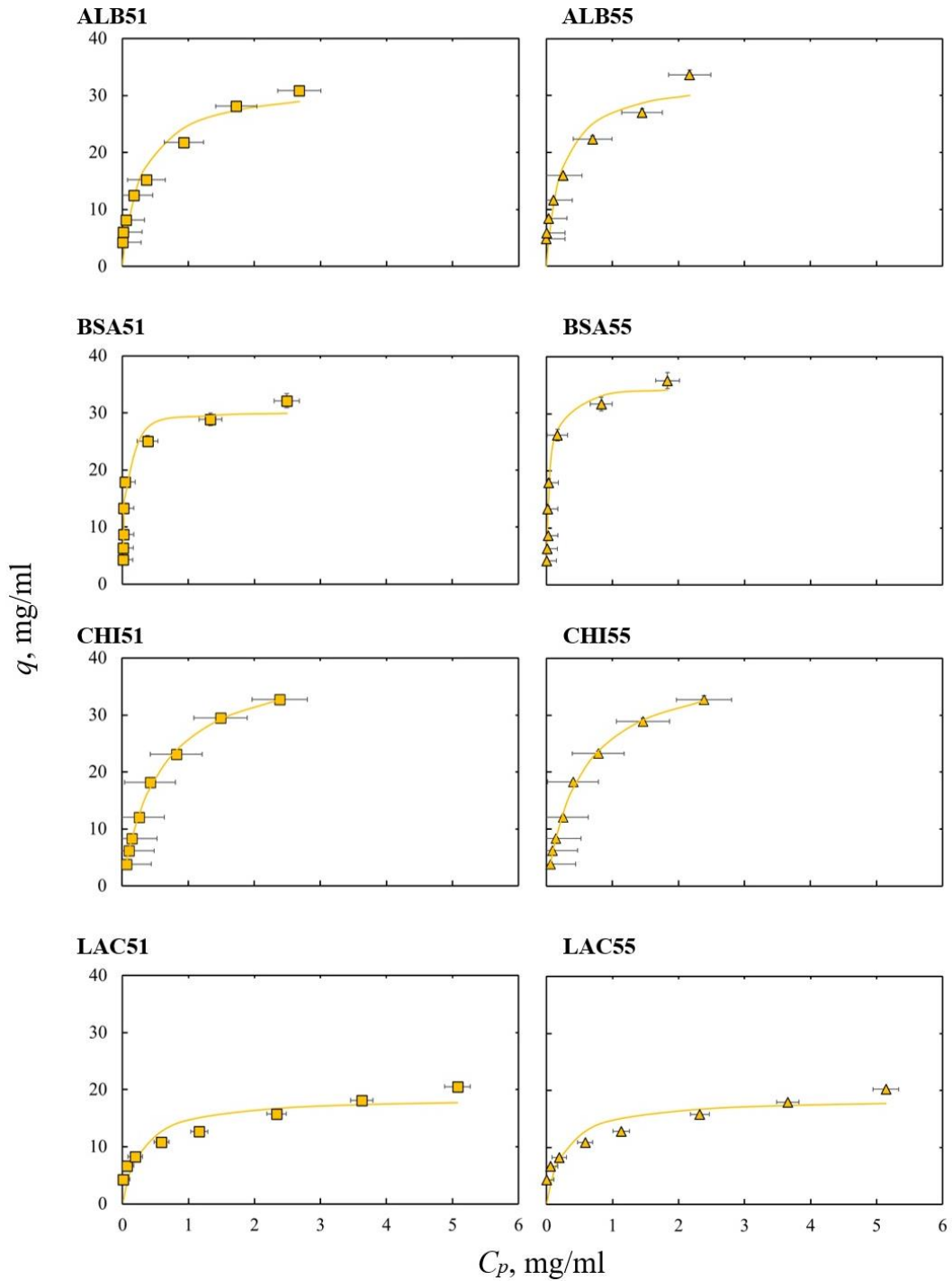


Figura 26. Confronto tra le isoterme di adsorbimento delle proteine oggetto di studio in relazione al lotto di resina impiegato nel processo. La curva presente in ciascun grafico è riferita ad una concentrazione 1,4 M di solfato di ammonio ed è stata ricavata attraverso il *fitting* dei dati rappresentati.

Per osservare meglio quanto appena anticipato si può osservare la Figura 27. Tale figura confronta nello stesso grafico le isoterme di adsorbimento ricavate per i due diversi lotti di resina testati; per ciascuna proteina sono riportate le isoterme di adsorbimento relative ad una concentrazione 1 M e 1,4 M di solfato di ammonio. Osservando la figura si nota che per l'albumina e la BSA l'impiego di un lotto di resina con una maggiore densità di ligandi comporta l'ottenimento di isoterme di adsorbimento con un tratto lineare a maggiore pendenza ed un asintoto situato ad ordinate superiori.

3. Presentazione dei risultati

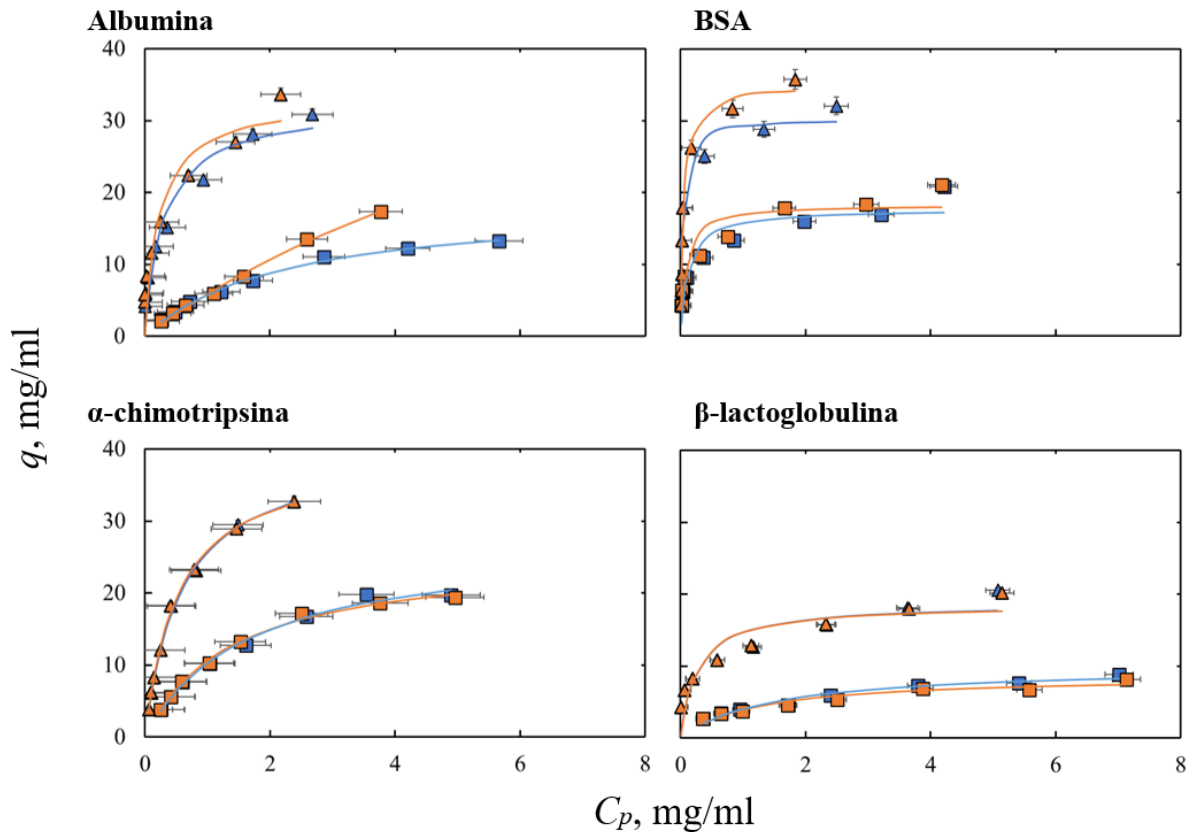


Figura 27. Confronto tra le isoterme di adsorbimento per le proteine oggetto di studio. Per ciascuna proteina sono riportate le isoterme di adsorbimento relative ad una concentrazione di solfato di ammonio 1 M (dati indicati attraverso un quadratino) e ad una concentrazione di 1,4 M (dati indicati attraverso un triangolino). I dati in blu sono riferiti all'impiego del lotto di resina avente una densità di ligandi di 51 μ mol/ml, i dati in arancione si riferiscono invece al lotto di resina con una densità di ligandi di 55 μ mol/ml. Le curve rappresentate sono state determinate effettuando il singolo *fitting* di ciascuna curva.

Per valutare come la densità di ligandi della resina influisca sull'adsorbimento è utile anche andare ad osservare il comportamento del coefficiente di ripartizione K_d rispetto alla variazione della densità dei ligandi della resina. Il coefficiente di ripartizione descrive in che modo la proteina si ripartisce tra la fase liquida e quella solida. Tale coefficiente può essere stimato attraverso la valutazione della pendenza delle isoterme in corrispondenza dell'origine degli assi [16, 27]. Andando quindi a diagrammare il logaritmo del coefficiente di ripartizione in funzione del logaritmo della densità di ligandi delle resine è possibile osservare la relazione presente tra la pendenza del tratto lineare delle isoterme e la densità di ligandi delle resine studiate.

Come si può osservare in Figura 28, per l'albumina e la BSA si riscontra che ad un incremento del logaritmo della densità di ligandi corrisponde un lieve incremento del logaritmo del coefficiente di ripartizione, ovvero della pendenza delle isoterme nel loro tratto lineare. Per l' α -chimotripsina e la β -lactoglobulina non si osserva invece alcuna dipendenza tra questi due parametri; ciò suggerisce che una variazione della densità dei ligandi non ha alcun effetto sul coefficiente di ripartizione, e quindi sulla pendenza del tratto lineare dell'isoterma, come già osservato in Figura 27.

Bisogna comunque considerare che quest'ultima analisi è particolarmente approssimativa in quanto coinvolge la determinazione della pendenza delle isoterme di cui sono noti soltanto una serie di punti sperimentali. Inoltre, i dati relativi ad una concentrazione 0 M di solfato di ammonio non sono da

3.3. Variabilità dei lotti di resina: confronto dei risultati

considerarsi rilevanti per questo tipo di valutazione in quanto sono caratterizzati da una notevole dispersione; il *fitting* di tali dati risulta quindi inaffidabile.

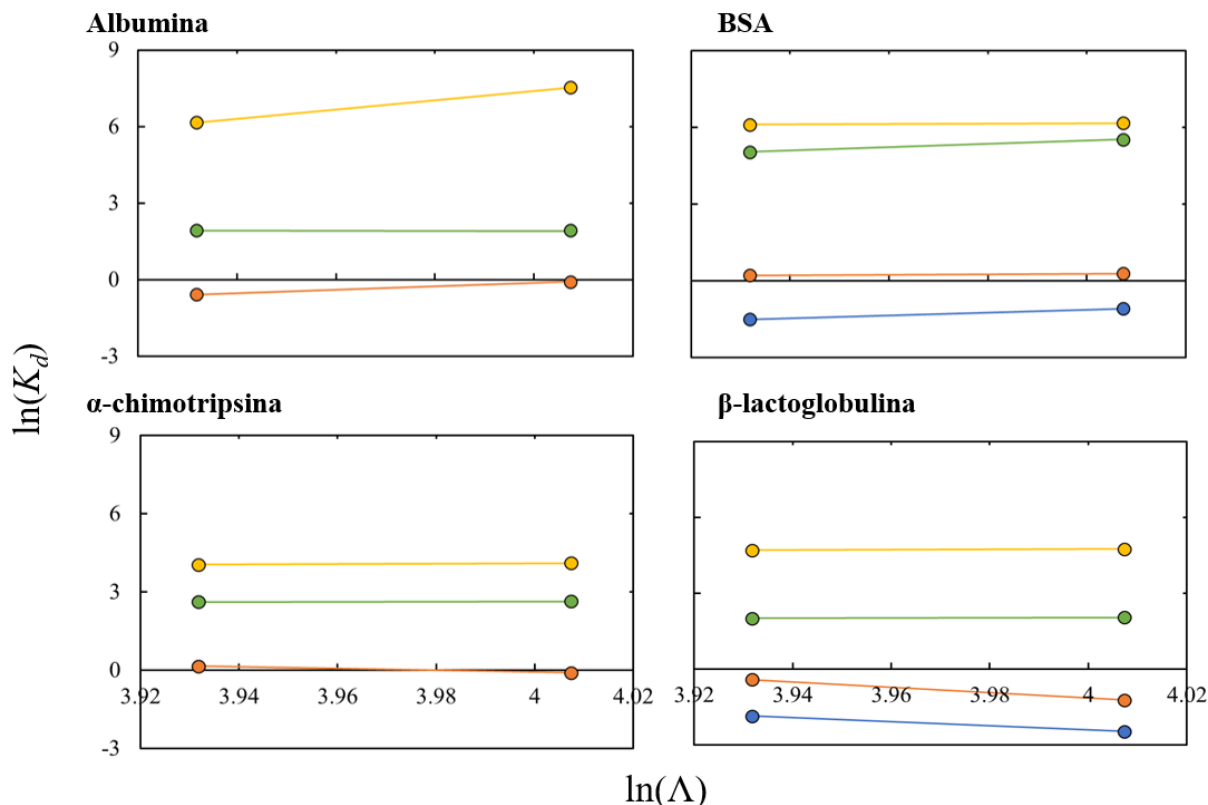


Figura 28. Variazione del logaritmo del coefficiente di ripartizione in funzione del logaritmo della densità di ligandi delle resine per le quattro proteine studiate. La densità di ligandi è espressa in $\mu\text{mol/ml}$. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

Nella sezione 3.2. relativa al *fitting* dei punti sperimentali si era osservato che, tra tutte le proteine analizzate, l' α -chimotripsina fosse descritta piuttosto bene dal *fitting* di tipo esponenziale. Come verifica di questa osservazione si è rappresentato in Figura 29 il logaritmo del coefficiente di ripartizione in funzione della concentrazione di sale nel sistema. Risulta infatti che, qualora i parametri a e b della funzione di Langmuir descritta dall'Equazione (23) seguano un andamento di tipo esponenziale con la concentrazione di sale nel sistema; allora il logaritmo del coefficiente di ripartizione varia linearmente con la concentrazione di sale nel sistema ^[16]. Il coefficiente di ripartizione è stato stimato, come detto precedentemente, attraverso la pendenza delle isoterme nell'origine del sistema di riferimento. Dall'osservazione dei grafici presentati in Figura 29 si osserva che, tra le quattro proteine studiate, il grafico relativo all' α -chimotripsina sia caratterizzato dai punti maggiormente allineati tra loro. Questo risultato ci conferma che, per tale proteina, i relativi parametri a e b del *fitting* singolo delle diverse isoterme seguano, in prima approssimazione, la relazione esponenziale descritta dall'Equazione (26).

3. Presentazione dei risultati

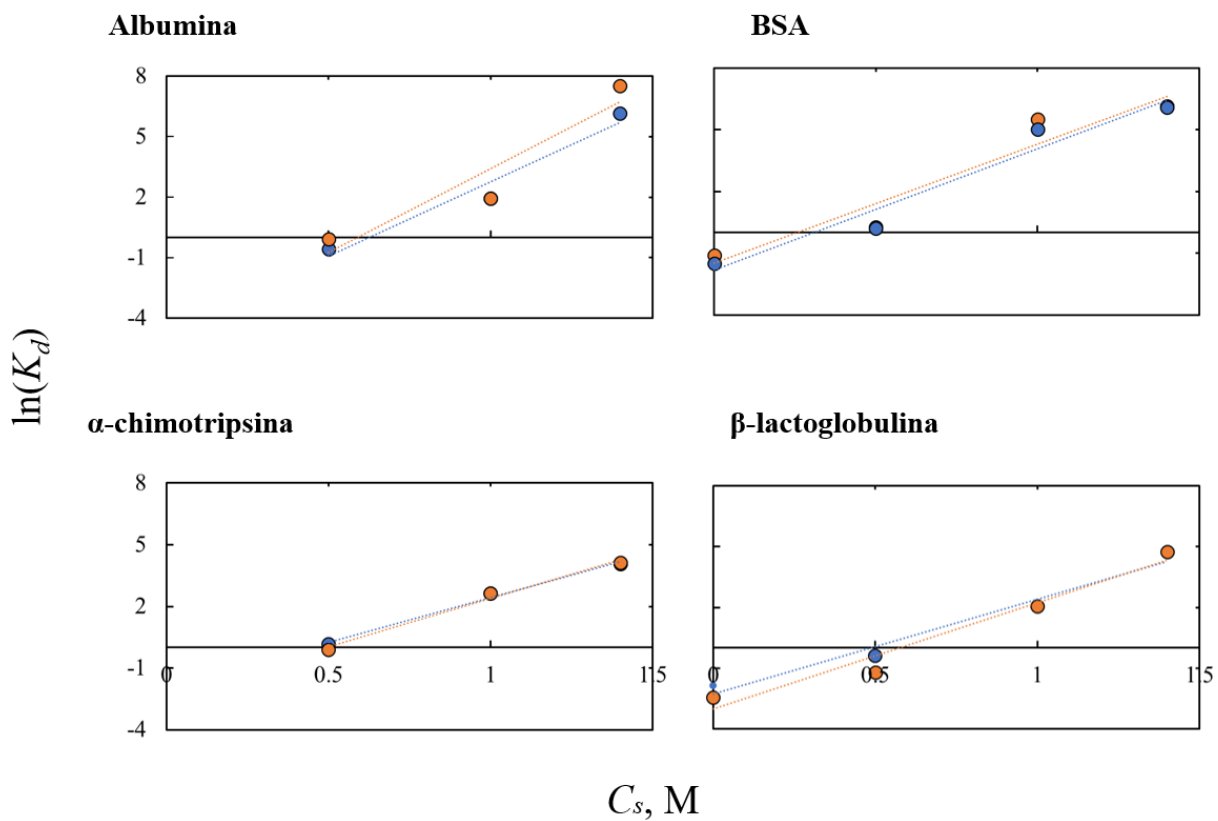


Figura 29. Variazione del logaritmo del coefficiente di ripartizione in funzione della concentrazione di sale nel sistema per le quattro proteine studiate. I dati in blu sono riferiti all'impiego del lotto di resina avente una densità di ligandi di 51 $\mu\text{mol/ml}$, i dati in arancione si riferiscono invece al lotto di resina con una densità di ligandi di 55 $\mu\text{mol/ml}$.

4. Conclusioni

Il seguente lavoro di Tesi aveva come obiettivo la raccolta di dati riguardanti il comportamento di alcune proteine campione quando sottoposte al processo di adsorbimento nell'ambito della cromatografia ad interazione idrofobica. Tale raccolta dati ha permesso di osservare il comportamento delle proteine studiate attraverso l'analisi delle rispettive isoterme di adsorbimento. Si è osservato ad esempio che, a parità di resina impiegata nel processo, albumina, BSA e α -chimotripsina hanno delle isoterme di adsorbimento con dei *plateau* situati ad ordinate confrontabili; β -lactoglobulina invece ha delle isoterme con dei *plateau* situati ad ordinate inferiori. Questo risultato, tuttavia, va confrontato con la massa molecolare delle proteine analizzate: infatti, nonostante la β -lactoglobulina sia la proteina caratterizzata dalle isoterme con i *plateau* più bassi tra tutte le proteine studiate, essa è anche la proteina con la minor massa molecolare tra le proteine analizzate.

Successivamente si sono descritti i dati sperimentali sfruttando diversi modelli e si è potuto osservare come tali modelli fossero in grado di descrivere il comportamento delle proteine analizzate. Si è osservato quindi quanto fosse fedele la previsione del modello adottato rispetto ai punti sperimentali a disposizione. Come già anticipato, si è notato come il *fitting* svolto singolarmente su ciascuna curva comporti una descrizione più accurata dei dati sperimentali; i modelli di *fitting* che coinvolgono l'intero fascio di curve risultano invece generalmente meno accurati. Quest'ultimo risultato è tuttavia dovuto ad alcune limitazioni legate a tali modelli; essi offrono infatti una buona descrizione dei dati sperimentali soltanto per variazioni ridotte della concentrazione di sale nel sistema. Si è osservato infine che l' α -chimotripsina pare rappresentare un'eccezione in quanto risulta essere ben descritta dal modello che prevede una dipendenza esponenziale tra i parametri del modello stesso e la concentrazione di sale nel sistema.

Il secondo obiettivo del lavoro riguardava l'analisi di un'eventuale influenza legata all'impiego di diversi lotti di resina all'interno del processo cromatografico sul processo stesso. Dall'osservazione dei risultati ottenuti, per quanto riguarda l'albumina e la BSA, è confermato che l'impiego di resine con una maggiore densità di ligandi determinano l'ottenimento di isoterme con un tratto lineare più pendente ed un *plateau* posizionato ad ordinate maggiori. Questo risultato si traduce in una maggiore capacità di interazione del sistema cromatografico con tali proteine (a parità di condizioni). Si è inoltre osservato che la variabilità del lotto di resina non ha avuto alcuna influenza sull' α -chimotripsina e sulla β -lactoglobulina; non si osserva infatti alcuna variazione significativa dal confronto delle relative isoterme di adsorbimento. Questo diverso comportamento delle proteine studiate potrebbe essere legato ad esempio alla loro differente massa molecolare ^[14]; l' α -chimotripsina e la β -lactoglobulina hanno infatti una massa molecolare molto inferiore rispetto all'albumina e alla BSA. Un secondo aspetto chiave che potrebbe aver influito sui risultati ottenuti riguarda l'eventuale differente distribuzione dei gruppi idrofobici lungo la superficie delle proteine studiate: la presenza

4. Conclusioni

di tali gruppi è infatti fondamentale per permettere l'instaurarsi del legame tra la proteina e la fase stazionaria.

In ogni caso, nonostante le differenze osservate siano piuttosto contenute, bisogna considerare che la variabilità dei due lotti di resina a disposizione era minima. Dall'analisi dei risultati ottenuti è quindi possibile affermare che la variabilità della densità di ligandi delle resine ha effettivamente un'influenza sul processo cromatografico e tale effetto potrebbe essere maggiore nel caso in cui i lotti analizzati siano caratterizzati da una variabilità più accentuata oppure in condizioni di *overloading*.

Lista simboli

a	parametro del modello di Langmuir descritto dall'Equazione (23)
b	parametro del modello di Langmuir descritto dall'Equazione (23), ml/mg
Abs	assorbanza
c	concentrazione, M
C _{campione}	concentrazione iniziale della soluzione proteica, mg/ml
C _{libera}	concentrazione libera di proteina, mg/ml
c ₀	concentrazione iniziale della soluzione proteica corretta con il volume ritenuto, mg/ml
C _p	concentrazione di proteina in fase liquida all'equilibrio termodinamico, mg/ml
C _s	concentrazione di sale, M
k	parametro del modello descritto dall'Equazione (2)
K	costante di equilibrio, mg/ml
K _d	coefficiente di ripartizione
K _p	costante di equilibrio del processo di adsorbimento
K _s	costante di equilibrio del processo di disidratazione delle proteine
K'	costante di equilibrio definita come prodotto tra K _p e K _s
l	cammino ottico, m
m	coefficiente angolare
m _{campione}	massa di proteina introdotta nel pozzetto della piastra, mg
m _{legata}	massa di proteina legata alla fase stazionaria, mg
m _{libera}	massa di proteina presente in fase liquida, mg
MAD	deviazione mediana assoluta
n	numero di ligandi con cui interagisce una proteina
q	concentrazione di proteina legata alla fase solida all'equilibrio termodinamico, mg/ml

q_{\max}	concentrazione di saturazione della fase stazionaria, mg/ml
Q_1	primo quartile
Q_3	terzo quartile
V_{campione}	volume della soluzione proteica introdotta nel pozzetto della piastra, μl
V_{liquido}	volume della fase liquida, μl
V_{mezzo}	volume della fase solida, μl
V_{ritenuto}	volume di liquido legato al fenomeno di ritenzione, μl
x_i	valore i-esimo del set di dati
x_{\max}	valore massimo del set di dati
x_{\min}	valore minimo del set di dati
X	set di dati considerato
\bar{x}	valore medio del set di dati
\bar{x}'	valore medio del set di dati depurato dagli <i>outlier</i> valutati tramite il teorema di Tukey
α	parametro del modello descritto dall'Equazione (5)
β	pendenza della retta operativa
β'	numero di molecole d'acqua che stabilizzano i siti di legame
γ	coefficiente di attività delle proteine in fase liquida, M^{-1}
Δx	semidispersione
ε	coefficiente di assorbimento molare, m^2/mol
Λ	densità di ligandi della fase stazionaria, $\mu\text{mol}/\text{ml}$
Λ_{tot}	capacità totale della fase stazionaria, mg/ml
ν	coefficiente stechiometrico del processo di adsorbimento
σ	fattore sterico
σ^*	coefficiente di variazione
σ'	deviazione standard depurata dagli <i>outlier</i> valutati tramite il teorema di Tukey

Bibliografia

- [1] G. Wang, T. Hahn, J. Hubbuch, *Water on hydrophobic surfaces: Mechanistic modeling of hydrophobic interaction chromatography*, "Journal of Chromatography A", 1465 (2016) 71-78.
- [2] K. M. Lacki, *High throughput process development in biomanufacturing*, "Current Opinion in Chemical Engineering", 6 (2014) 25-32.
- [3] B. S. Warren, P. Kusk, R. G. Wolford, G. L. Hager, *Purification and Stabilization of Transcriptionally Active Glucocorticoid Receptor*, Journal of Biological Chemistry, 271 (1996) 11434-11440.
- [4] T. P. Hopp, K. R. Woods, *Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences*, "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", 78 (1981) 3824-3828.
- [5] H. Schmidt-Traub, *Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- [6] S. Vogg, T. Muller-Spath, M. Morbidelli, *Current status and future challenges in continuous biochromatography*, Current Opinion in Chemical Engineering, 22 (2018) 138-144.
- [7] M. C. Flickinger, S. W. Drew, *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, John Wiley, New York, 1999.
- [8] J. A. Asenjo, B. A. Andrews, *Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomics*, "Journal of Molecular Recognition", 17 (2004) 236.
- [9] F. Gritti, G. Guiochon, *Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency*, "Journal of Chromatography A", 1221 (2012) 2-40.
- [10] J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography*, "Chemical Engineering Science", 5 (1956) 271-289.
- [11] M. C. Bonaccorsi di Patti, R. Contestabile, M. L. Di Salvo, *Metodologie biochimiche. Espressione, purificazione e caratterizzazione delle proteine*, Zanichelli, Milano, 2019.
- [12] F. D. Antia, C. Horvath, *Gradient elution in non-linear preparative liquid chromatography*, "Journal of Chromatography", 484 (1989) 1-27.
- [13] M. E. Lienqueo, A. Mahn, J. C. Salgado, J. A. Asenjo, *Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography*, "Journal of Chromatography B", 849 (2007) 53-68.

- [14] B. C. S. To, A. M. Lenhoff, *Hydrophobic interaction chromatography of proteins I. The effects of protein and adsorbent properties on retention and recovery*, "Journal of Chromatography A", 1141 (2007) 191-205.
- [15] J. Porath, *Salt-promoted adsorption: Recent developments*, "Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications", 376 (1986) 331-341.
- [16] J. Chen, Y. Sun, *Modeling of the salt effects on hydrophobic adsorption equilibrium of protein*, "Journal of Chromatography A", 992 (2003) 29-40.
- [17] I. Langmuir, *The constitution and fundamental properties of solids and liquids*, "Journal of the American Chemical Society", 38 (1916) 2221-2295.
- [18] GE Healthcare, *High-throughput process development with PreDictor Plates Principles and Methods*, Handbooks 28-9403-58 AA, 2009.
- [19] C. A. Brooks, S. M. Cramer, *Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients*, "AIChE Journal", 38 (1992) 1969-1978.
- [20] J. M. Mollerup, T. B. Hansen, S. Kidal, A. Staby, *Quality by design-Thermodynamic modelling of chromatographic separation of proteins*, "Journal of Chromatography A", 1177 (2008) 200-206.
- [21] F. Dondi, G. Guiochon, *Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques*, Springer, Paesi Bassi, 1992.
- [22] S. Hjerten, K. Yao, K. Eriksson, B. Johansson, *Gradient and isocratic high-performance hydrophobic interaction chromatography of proteins on agarose columns*, "Journal of Chromatography A", 359 (1986) 99-109.
- [23] F. Xia, D. Nagrath, S. M. Cramer, *Effect of pH changes on water release values in hydrophobic interaction chromatographic systems*, "Journal of Chromatography A", 1079 (2005) 229-235.
- [24] GE Healthcare, *Adsorption equilibrium isotherm studies using a high-throughput method*, Application note 28-9403-62 AA, 2009.
- [25] J. W. Tukey, *Comparing Individual Means in the Analysis of Variance*, "Biometrics", 5 (1949) 99-114.
- [26] J. Chen, S. M. Cramer, *Protein adsorption isotherm behavior in hydrophobic interaction chromatography*, "Journal of Chromatography A", 1165 (2007) 67-77.
- [27] S. Zhang, Y. Sun, *Steric mass-action model for dye-ligand affinity adsorption of protein*, "Journal of Chromatography A", 957 (2002) 89-97.

Appendice A

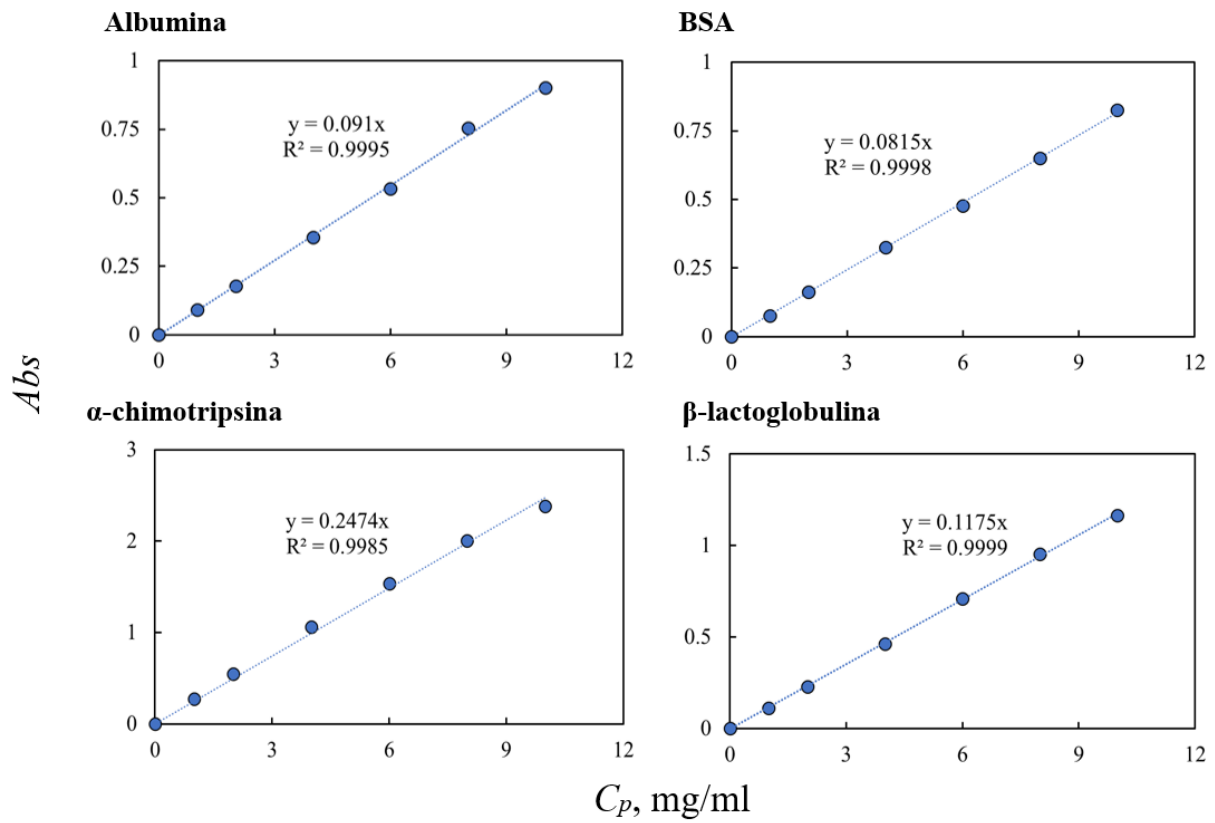


Figura A1. Rette di taratura delle proteine oggetto di studio; i punti blu identificano i punti sperimentali costituenti la retta; per ciascuna retta è riportata la relativa equazione ed il coefficiente di determinazione.

Appendice B

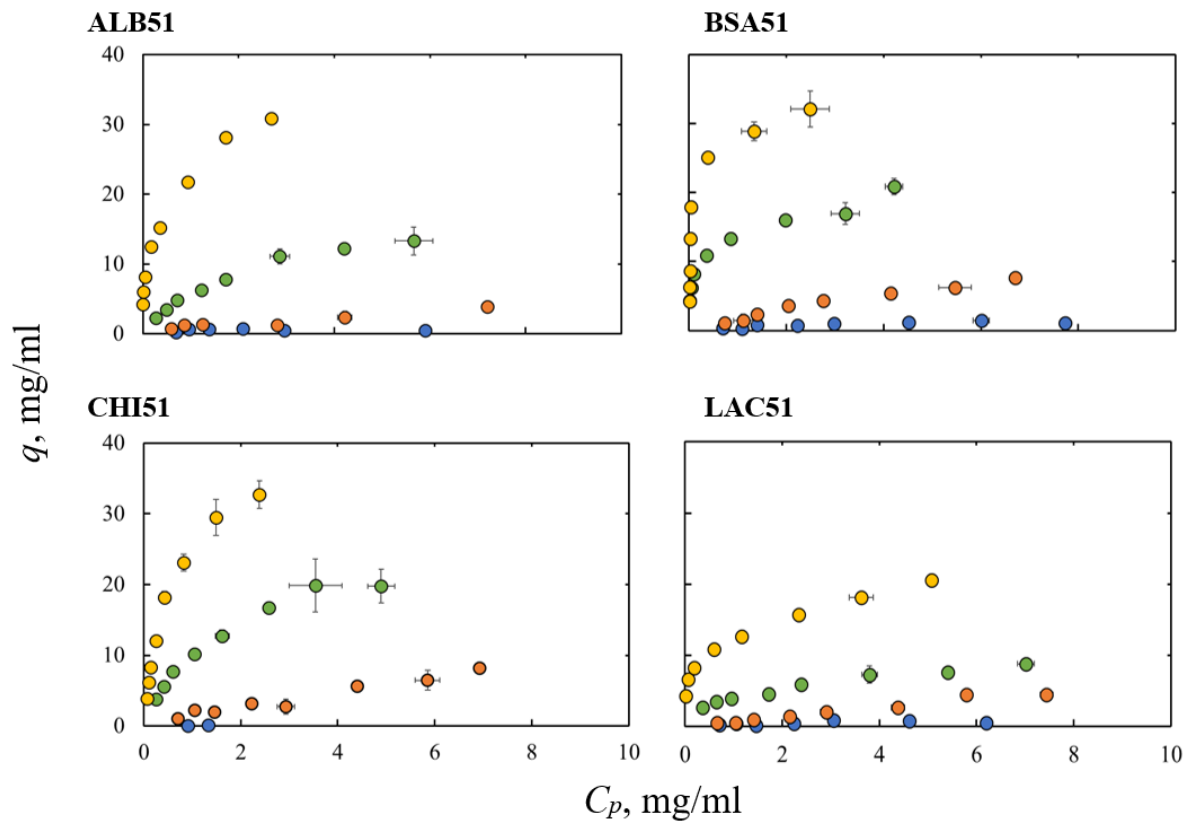


Figura B1. Isotherme di adsorbimento per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M. Le barre di errore rappresentate sono riferite alla semidispersione dei dati sperimentali.

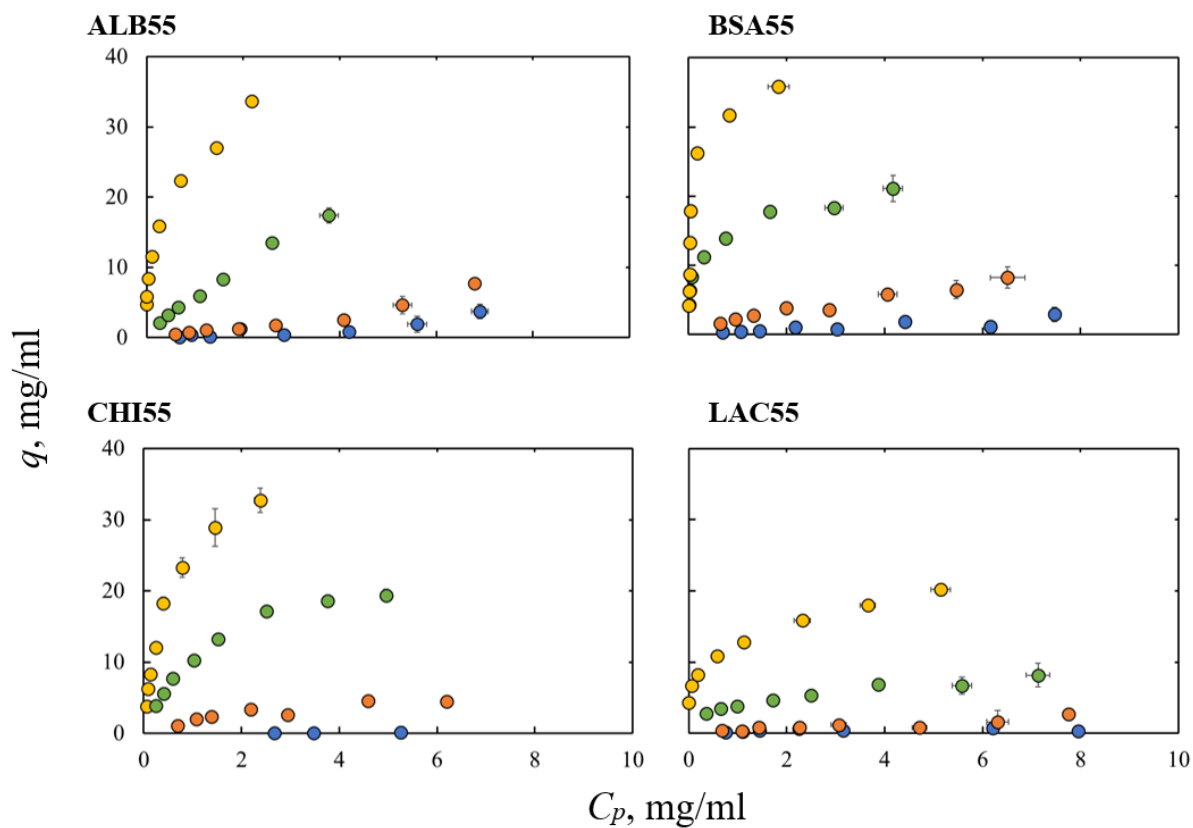


Figura B2. Isotherme di adsorbimento per le proteine oggetto di studio. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M. Le barre di errore rappresentate sono riferite alla semidispersione dei dati sperimentali.

Appendice C

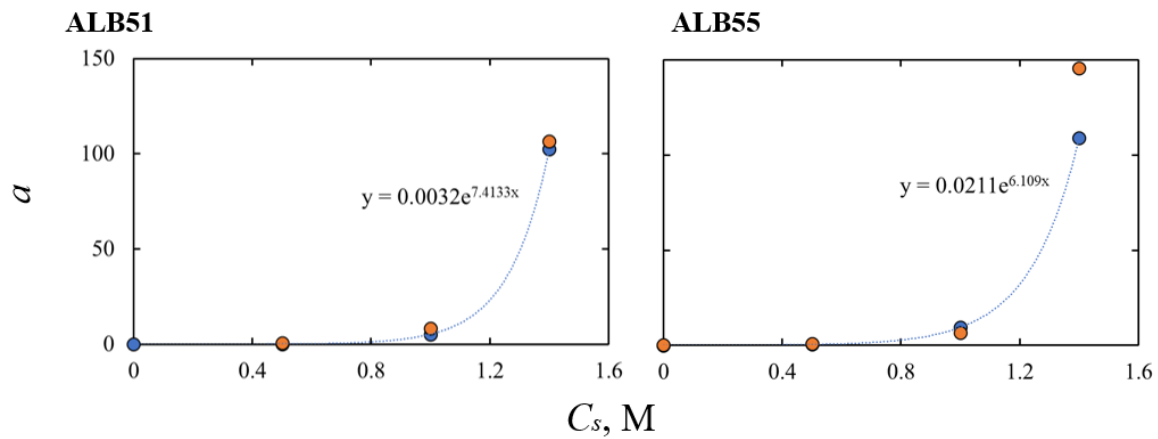


Figura C1. Variazione del parametro a del modello di Langmuir descritto dall'Equazione (23) in funzione della concentrazione di sale nel sistema; confronto tra i valori ricavati mediante un *fitting* singolo di ciascuna curva (punti arancioni) e i valori ricavati effettuando un *fitting* del fascio di curve tramite il modello descritto dall'Equazione (25) (punti blu). È riportata inoltre la relazione esponenziale che lega il parametro a alla concentrazione di sale per questa seconda strategia di *fitting*. Dati riferiti all'albumina.

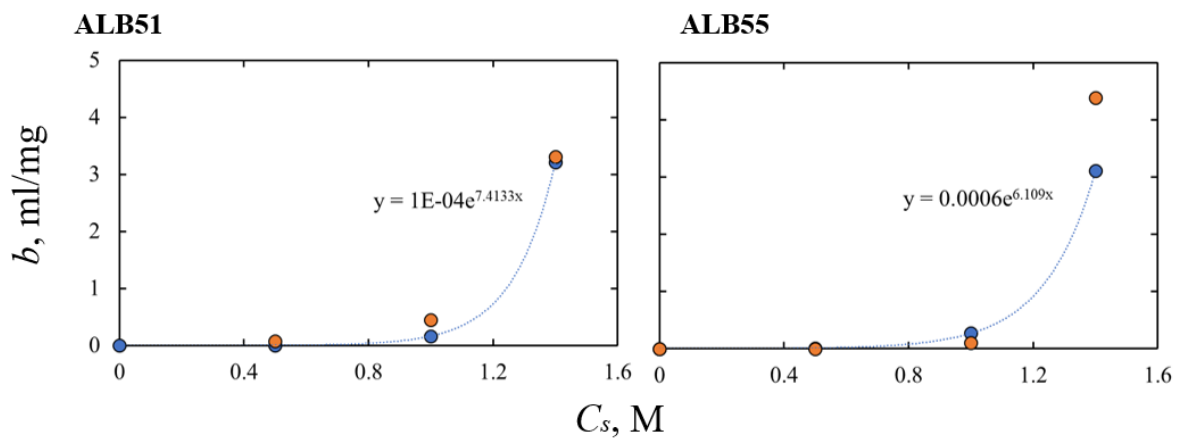


Figura C2. Variazione del parametro b del modello di Langmuir descritto dall'Equazione (23) in funzione della concentrazione di sale nel sistema; confronto tra i valori ricavati mediante un *fitting* singolo di ciascuna curva (punti arancioni) e i valori ricavati effettuando un *fitting* del fascio di curve tramite il modello descritto dall'Equazione (25) (punti blu). È riportata inoltre la relazione esponenziale che lega il parametro b alla concentrazione di sale per questa seconda strategia di *fitting*. Dati riferiti all'albumina.

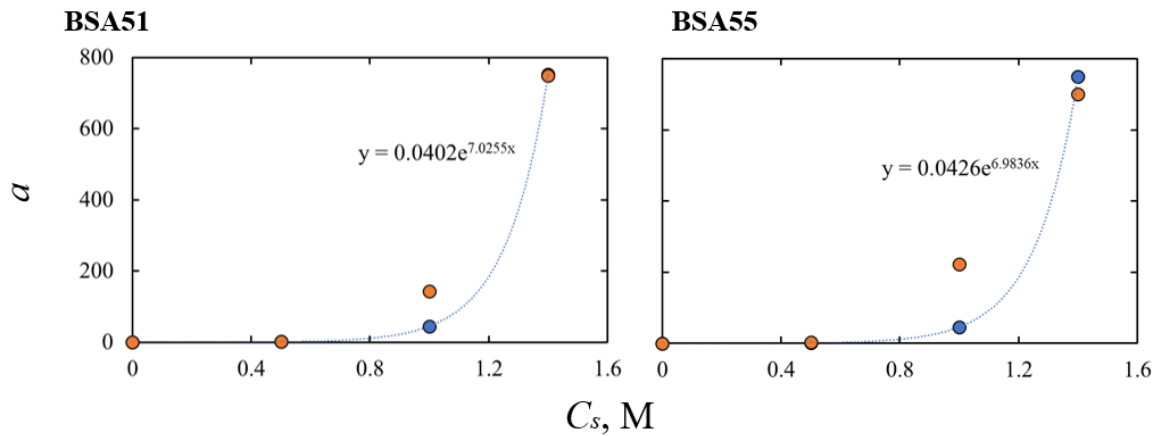


Figura C3. Variazione del parametro a del modello di Langmuir descritto dall'Equazione (23) in funzione della concentrazione di sale nel sistema; confronto tra i valori ricavati mediante un *fitting* singolo di ciascuna curva (punti arancioni) e i valori ricavati effettuando un *fitting* del fascio di curve tramite il modello descritto dall'Equazione (25) (punti blu). È riportata inoltre la relazione esponenziale che lega il parametro a alla concentrazione di sale per questa seconda strategia di *fitting*. Dati riferiti alla BSA.

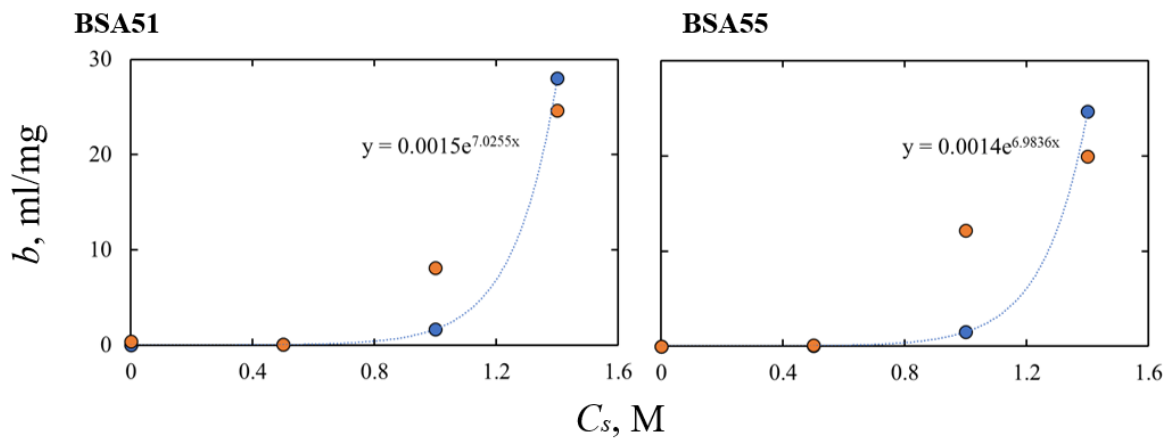


Figura C4. Variazione del parametro b del modello di Langmuir descritto dall'Equazione (23) in funzione della concentrazione di sale nel sistema; confronto tra i valori ricavati mediante un *fitting* singolo di ciascuna curva (punti arancioni) e i valori ricavati effettuando un *fitting* del fascio di curve tramite il modello descritto dall'Equazione (25) (punti blu). È riportata inoltre la relazione esponenziale che lega il parametro b alla concentrazione di sale per questa seconda strategia di *fitting*. Dati riferiti alla BSA.

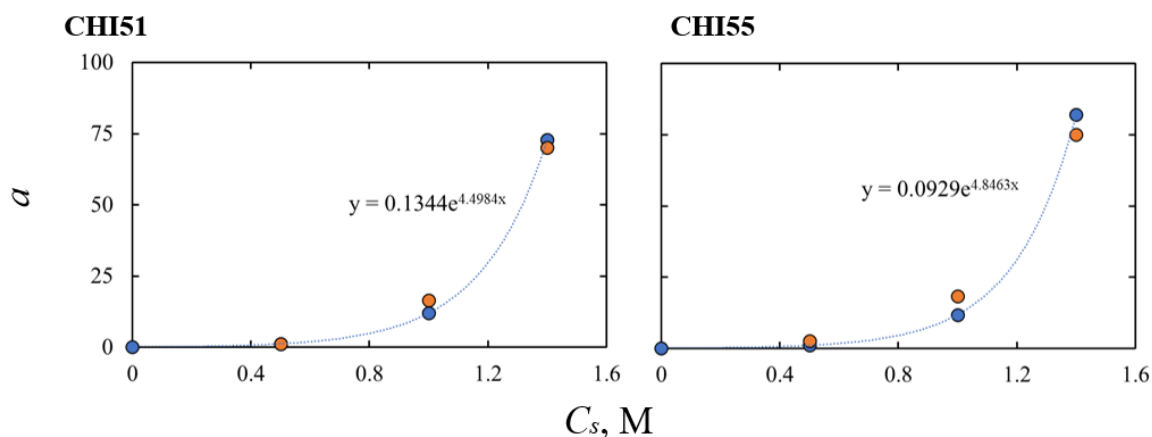


Figura C5. Variazione del parametro a del modello di Langmuir descritto dall'Equazione (23) in funzione della concentrazione di sale nel sistema; confronto tra i valori ricavati mediante un *fitting* singolo di ciascuna curva (punti arancioni) e i valori ricavati effettuando un *fitting* del fascio di curve tramite il modello descritto dall'Equazione (25) (punti blu). È riportata inoltre la relazione esponenziale che lega il parametro a alla concentrazione di sale per questa seconda strategia di *fitting*. Dati riferiti all' α -chimotripsina.

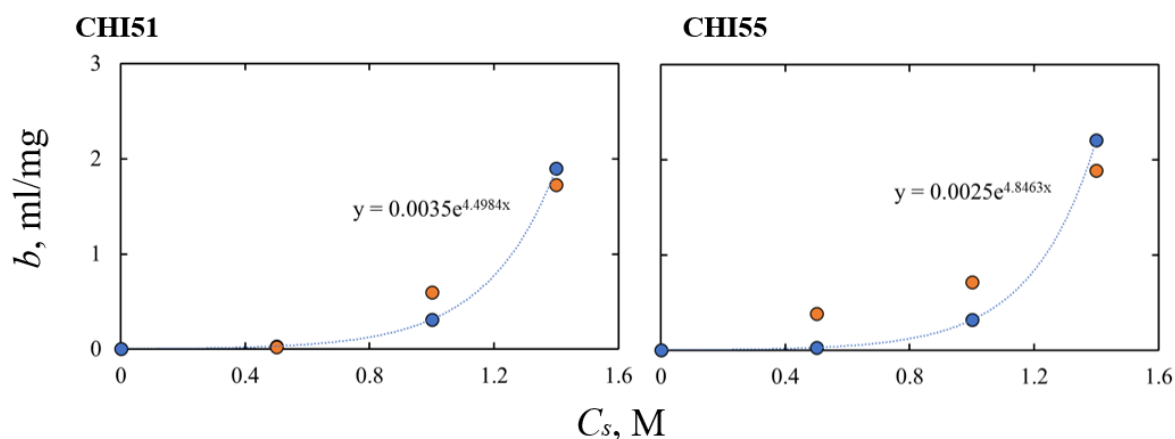


Figura C6. Variazione del parametro b del modello di Langmuir descritto dall'Equazione (23) in funzione della concentrazione di sale nel sistema; confronto tra i valori ricavati mediante un *fitting* singolo di ciascuna curva (punti arancioni) e i valori ricavati effettuando un *fitting* del fascio di curve tramite il modello descritto dall'Equazione (25) (punti blu). È riportata inoltre la relazione esponenziale che lega il parametro b alla concentrazione di sale per questa seconda strategia di *fitting*. Dati riferiti all' α -chimotripsina.

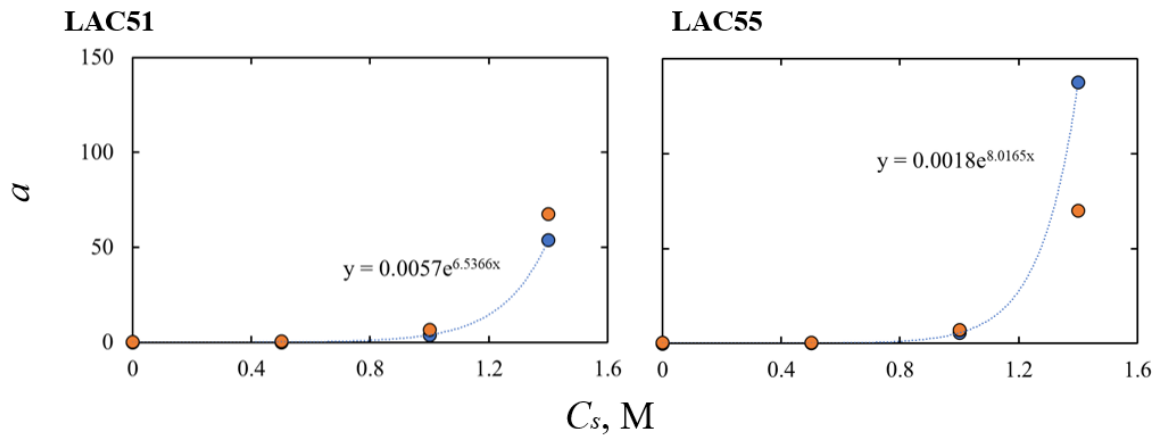


Figura C7. Variazione del parametro a del modello di Langmuir descritto dall'Equazione (23) in funzione della concentrazione di sale nel sistema; confronto tra i valori ricavati mediante un *fitting* singolo di ciascuna curva (punti arancioni) e i valori ricavati effettuando un *fitting* del fascio di curve tramite il modello descritto dall'Equazione (25) (punti blu). È riportata inoltre la relazione esponenziale che lega il parametro a alla concentrazione di sale per questa seconda strategia di *fitting*. Dati riferiti alla β -lactoglobulina.

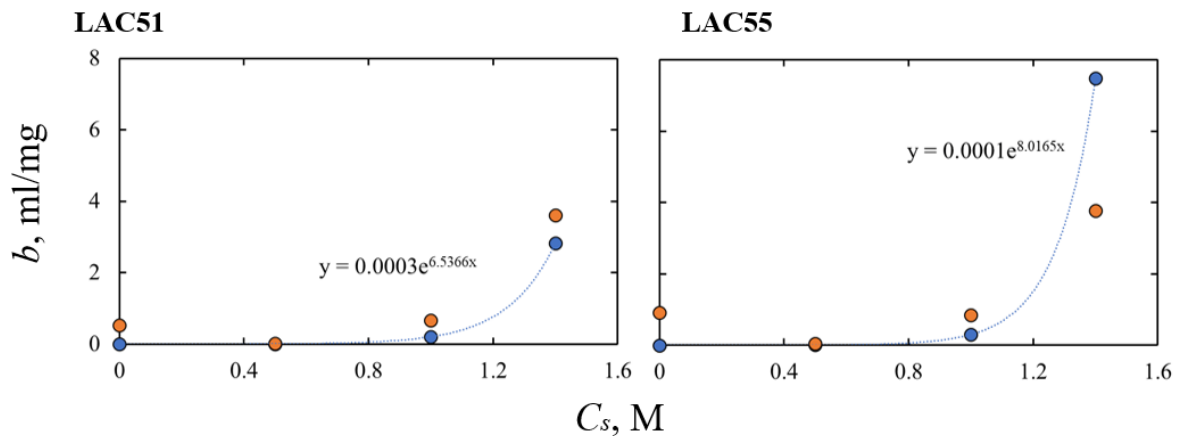


Figura C8. Variazione del parametro b del modello di Langmuir descritto dall'Equazione (23) in funzione della concentrazione di sale nel sistema; confronto tra i valori ricavati mediante un *fitting* singolo di ciascuna curva (punti arancioni) e i valori ricavati effettuando un *fitting* del fascio di curve tramite il modello descritto dall'Equazione (25) (punti blu). È riportata inoltre la relazione esponenziale che lega il parametro b alla concentrazione di sale per questa seconda strategia di *fitting*. Dati riferiti alla β -lactoglobulina.

Appendice D

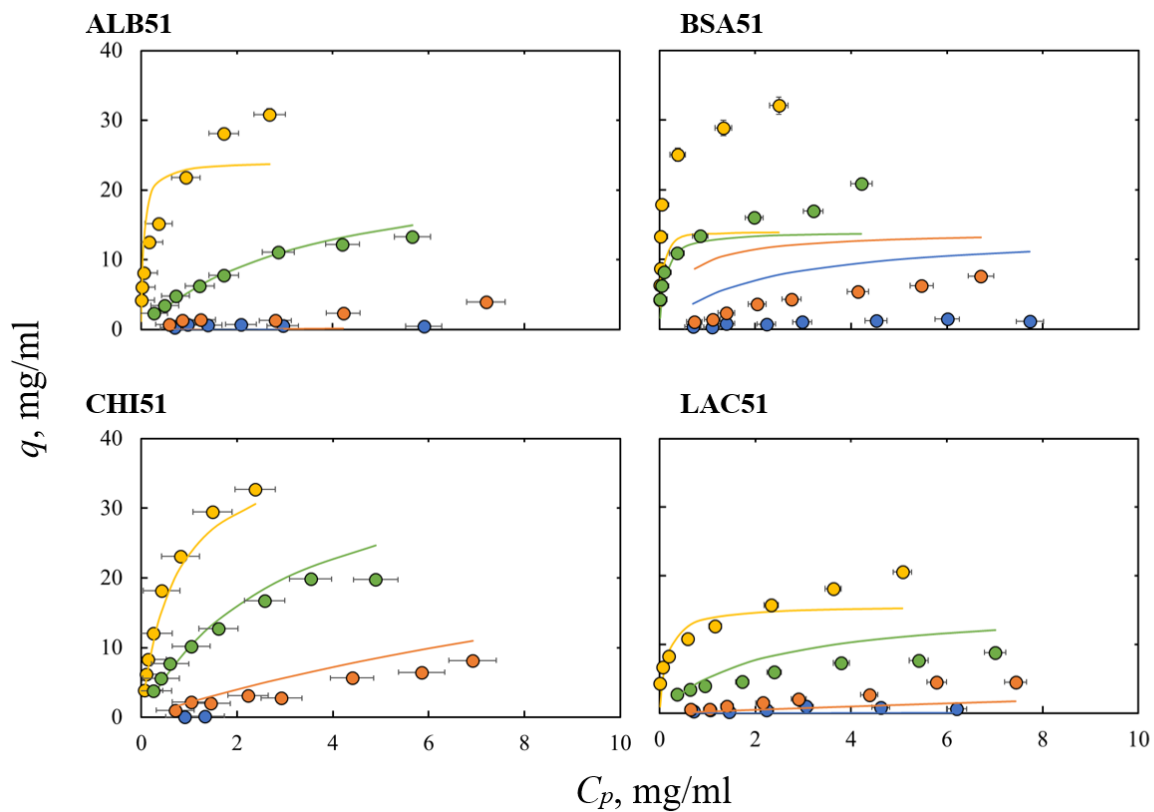


Figura D1. Isotherme di adsorbimento per le proteine oggetto di studio. Il *fitting* è stato svolto determinando a priori il parametro a come pendenza delle isoterme nell'origine del sistema di riferimento (e descrivendo la sua variazione con la concentrazione di sale nel sistema mediante una relazione esponenziale); il parametro b è stato successivamente determinato attraverso il *fitting* del fascio di curve dove il parametro a risultava noto a priori. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

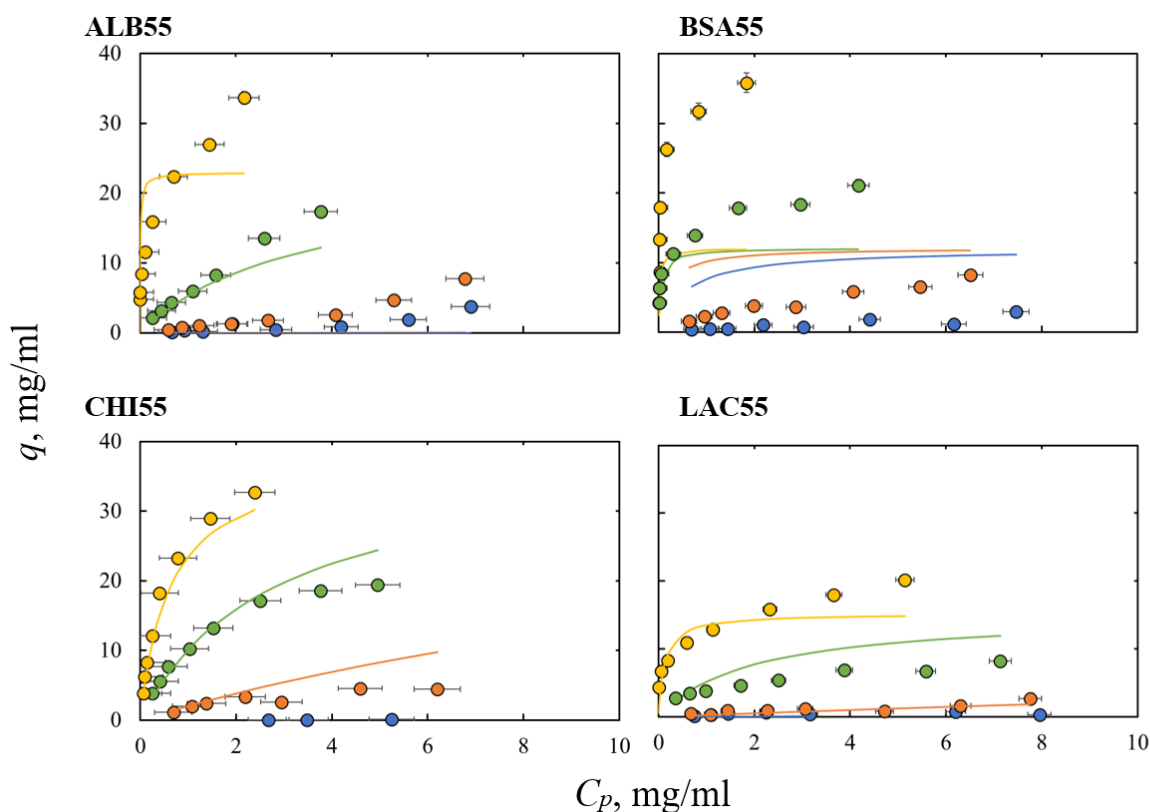


Figura D2. Isotherme di adsorbimento per le proteine oggetto di studio. Il *fitting* è stato svolto determinando a priori il parametro a come pendenza delle isoterme nell'origine del sistema di riferimento (e descrivendo la sua variazione con la concentrazione di sale nel sistema mediante una relazione esponenziale); il parametro b è stato successivamente determinato attraverso il *fitting* del fascio di curve dove il parametro a risultava noto a priori. Ciascun grafico presenta al suo interno quattro diversi set di dati in riferimento alla concentrazione di solfato di ammonio presente in soluzione: in blu i dati relativi ad una concentrazione salina nulla; in arancione i dati relativi ad una concentrazione 0,5 M; in verde i dati relativi ad una concentrazione 1 M; in giallo i dati relativi ad una concentrazione 1,4 M.

Dall'osservazione delle Figure D1 e D2 si osservano degli andamenti simili a quelli ricavati nelle Figure 20 e 21. Per quest'ultima strategia di *fitting* fallisce completamente la predizione che il modello fornisce nella descrizione dei dati sperimentali relativi alla BSA.

Tabella D1. Parametri della funzione di Langmuir relativi al *fitting* del fascio di curve illustrato nelle Figure D1 e D2; dati relativi all'albumina

		Albumina									
		$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
C_s, M		a	$b, \text{ml/mg}$	$q_{max}, \text{mg/ml}$	$K, \text{mg/ml}$	k, M^{-1}	a	$b, \text{ml/mg}$	$q_{max}, \text{mg/ml}$	$K, \text{mg/ml}$	k, M^{-1}
0		0,000182	$7,53 \cdot 10^{-6}$	24,1	$1,33 \cdot 10^5$	-10,6	$5,73 \cdot 10^{-6}$	$2,50 \cdot 10^{-7}$	23,0	$4,01 \cdot 10^6$	-14,0
0,5		0,0336	0,00147				0,00628	0,000274			
1		6,95	0,288				6,89	0,300			
1,4		473	19,6				$1,86 \cdot 10^3$	81,2			

Tabella D2. Parametri della funzione di Langmuir relativi al *fitting* del fascio di curve illustrato nelle Figure D1 e D2; dati relativi alla BSA

		BSA								
C_s, M	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}
0	7,073	0,503	14,1	1,99	-2,97	20,78	1,72	12,1	0,581	-2,25
0,5	31,2	2,22				64,0	5,30			
1	137	9,77				197	16,3			
1,4	450	32,0				484	40,1			

Tabella D3. Parametri della funzione di Langmuir relativi al *fitting* del fascio di curve illustrato nelle Figure D1 e D2; dati relativi all' α -chimostripsina

		α-chimostripsina								
C_s, M	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}
0	0,358	0,00910	39,4	110	-3,63	0,327	0,0860	38,0	116	-3,74
0,5	2,20	0,0560				2,12	0,0557			
1	13,6	0,344				13,8	0,362			
1,4	58,0	1,47				61,4	1,61			

Tabella D4. Parametri della funzione di Langmuir relativi al *fitting* del fascio di curve illustrato nelle Figure D1 e D2; dati relativi alla β -lactoglobulina

		β-lactoglobulina								
C_s, M	$\Lambda=51 \mu\text{mol/ml}$					$\Lambda=55 \mu\text{mol/ml}$				
	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}	a	$b,$ ml/mg	$q_{max},$ mg/ml	$K,$ mg/ml	$k,$ M^{-1}
0	0,00911	0,000580	15,7	$1,72 \cdot 10^3$	-6,72	0,00909	0,000600	15,2	$1,67 \cdot 10^3$	-6,75
0,5	0,262	0,0167				0,266	0,0175			
1	7,52	0,479				7,77	0,513			
1,4	110	7,03				116	7,636			