

ZBIGNIEW BRZOZOWSKI^{*)}, NORBERT PIETRUSZKA^{*)},
IGOR GALAEV^{**)}, BO MATTIASSON^{**)}

Akrylamidowe pochodne skrobi w układach dwufazowych służących do oczyszczania białek

CZ. I. SYNTEZA, WŁAŚCIWOŚCI I DIAGRAMY FAZOWE

ACRYLAMIDE DERIVATIVES OF STARCH IN TWO-PHASE SYSTEMS USED TO PURIFY PROTEINS. Part I. SYNTHESIS, PROPERTIES AND PHASE DIAGRAMS

Summary — Binary polymer mixtures, forming two-phase aqueous systems, were studied. One component (P) was either polyoxyethylene glycol (PEG 10 000) or vinylimidazole/vinylcaprolactam copolymer (VI/VCL); the other component (Q) was an acrylamide starch derivative (APS) or a commercial dextran (Dextran T70) which was used as a standard polymer. The VI/VCL copolymers had varying compositions (Table 2) and the APS had varying acrylamide contents (Table 1). Phase diagrams were determined for a series of P—Q mixtures (Figs. 2—9) and the P and Q content ranges were established at which two-phase systems were formed. With aqueous 0.5% NaCl added, the composition ranges were found to have narrowed. The growth of hydrophilic VI/VCL copolymers caused by increased content of VI was found to render a two-phase system difficult or even impossible to form (Figs. 8, 9). The APS were found to present efficient substitutes for expensive dextran and they can be used as two-phase system components to purify proteins.

Key words: acrylamide starch derivatives, vinylimidazole/vinylcaprolactam copolymers, purification of proteins, dextran substitutes.

Wodne układy dwufazowe były szeroko stosowane zarówno w biochemicznych badaniach naukowych dotyczących rozdziału i oczyszczania makrocząstek, komórek oraz fragmentów komórek [1—3] jak i w różnych gałęziach biotechnologii, m.in. do oczyszczania enzymów [4, 5], interferonu [6], oczyszczania koligacyjnego [7—9], w zastosowaniach analitycznych [10] i w biokonwersji ekstrakcyjnej [11, 12].

Wodne układy dwufazowe otrzymuje się w wyniku łączenia dwóch wodnych roztworów polimerów, różniących się budową chemiczną lub w wyniku dodania stężonych, wodnych roztworów soli nieorganicznych do roztworu polimeru. Niewielkie różnice właściwości fizykochemicznych obu faz powodują preferencyjny rozdział białek między nimi.

Na rezultat mieszania dwóch substancji wpływają dwa czynniki: zysk w entropii występujący podczas

mieszania cząsteczek oraz oddziaływania między cząsteczkami.

Układy typu polimer-polimer, zwłaszcza zawierające frakcjonowany dekstran i glikol polioksyetylenowy (PEF), doskonale nadają się do rozdziału substancji w skali laboratoryjnej [1—3].

Do wyodrębniania enzymów w dużej skali używa się niedrogich układów PEG-sól [4]. Wybór ten został podyktowany czynnikami ekonomicznymi — duży koszt frakcjonowanego dekstranu, produkowanego przez bakterie [13]. Jednakże właściwości układów PEG-sól silnie ograniczają ich zastosowanie w biotechnologii głównie z powodu dużego stężenia soli. Układy polimer-polimer są na ogół dużo bardziej przydatne i pozwalają na prowadzenie procesów wobec małego stężenia soli.

Dotychczas do ekstrakcji enzymów i biokonwersji zamiast frakcjonowanego dekstranu używano polidispersyjnego dekstranu, którego wadą jako polimeru tworzącego fazę jest duża lepkość dolnej fazy układu [14].

Opracowaliśmy nową metodę otrzymywania rozpuszczalnych w wodzie akryloamidowych pochodnych

^{*)} Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, Zakład Chemii Fizycznej Polimerów i Tworzyw Specjalnych, ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa.

^{**)} Lund University, Center of Chemistry and Chemical Engineering, Department of Biotechnology, P.O. Box 124, Lund, S-221 00, Sweden.

skrobi (APS) [15—18], przeznaczonych do czyszczenia białek za pomocą układów dwufazowych. Zastosowanie APS pozwoliłoby na wyeliminowanie dekstranu z tych układów.

Cele pracy stanowiącej przedmiot niniejszego artykułu to:

— dostosowanie warunków reakcji otrzymywania nowych akryloamidowych pochodnych skrobi tak, aby uzyskać roztwory 20—30-proc. o małej lepkości, które mogłyby być zastosowane do tworzenia układów dwufazowych;

— podjęcie prób użycia APS wraz z PEG oraz polimerami termoczułymi (wytrącającymi się z roztworów wodnych w podwyższonej temperaturze) do otrzymywania wodnych układów dwufazowych;

— opracowanie diagramów fazowych wybranych układów.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały:

— "Dextran T70" — dekstran frakcjonowany (m.cz. 70 000) — Pharmacia (Uppsala, Szwecja),

— *N*-winylokaprolaktam (VCL) cz. i 1-winyloimidazol (VI) cz. — Aldrich-Chemie (Steinheim, Niemcy),

— Azo-*bis*-isobutyronitryl (AIBN) cz. — Polysciences, Inc. (Eppelheim, Niemcy),

— Glikol polioksyetylenowy PEG 10 000 cz. — Merck (Schuchardt, Niemcy),

— Wodorotlenek sodu cz., izopropanol cz., eter dietylowy cz., kwas solny 37-proc. cz., siarczan miedzi — woda (1/5) cz. — Merck (Darmstadt, Niemcy),

— Akryloamid cz. — Bio-Rad Laboratories (Richmond, USA),

— Metanol cz. — KeboLab (Spånga, Szwecja),

— Skrobia ziemniaczana — Reppe AB (Växjö, Szwecja).

Metodyka pracy

Synteza akryloamidowych pochodnych skrobi (APS)

W kolbie trójzcyjnej pojemności 250 cm³ z mieszałem, chłodnicą zwrotną i termometrem mieszano 20 g skrobi i 180 g wody. Mieszaninę ogrzewano do temp. 85°C, w której następowało jej spęcznienie i zżelowanie. Następnie, intensywnie mieszając, wkraplało wodny 40-proc. roztwór NaOH (3,75 g NaOH w 5,6 g wody). Temperaturę mieszaniny reakcyjnej podwyższano do 90°C i utrzymywano ją jeszcze przez 4 h. Po upływie tego czasu zawartość kolby chłodzono do temp. 48°C i wprowadzano do niej 50-proc. wodny roztwór akryloamidu (3,75 g akryloamidu w 3,75 g wody — próbka A lub 15 g akryloamidu w 15 g wody — próbka B). Całość utrzymywano w temp. 48°C przez 2 h, po czym produkt zobojętniano za pomocą 10—15-proc. HCl (do pH 7) i wytrącano w 4000 cm³ metanolu. Wytrącony i wysuszony polimer ponownie

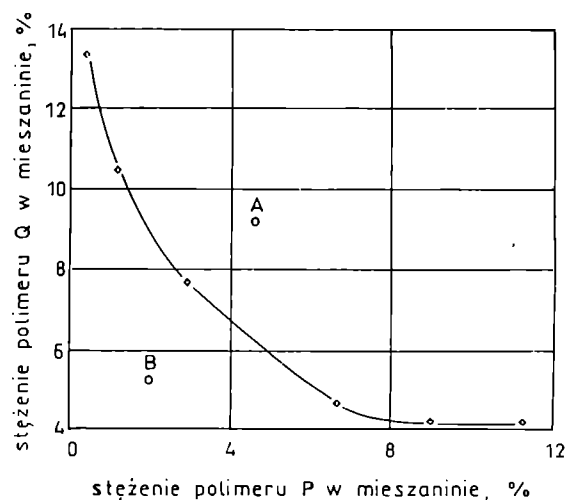
rozpuszczano w 180 g wody, dodawano 3 g NaCl i jeszcze raz wytrącano w 4000 cm³ metanolu. Tak oczyszczony produkt suszono w temp. 80°C, otrzymując 15—17 g APS.

Synteza kopolimerów winyloimidazolu (VI) z winylokaprolaktamem (VCL)

W kolbie pojemności 250 cm³ odważano 20 g mieszaniny winyloimidazolu i winylokaprolaktamu o określonym stosunku molowym monomerów (por. tabela 2) i rozpuszczano ją w 75 cm³ izopropanolu. Przez mieszaninę reakcyjną przepuszczano w ciągu 30 min azot, po czym dodawano 3,75 cm³ 1-proc. roztworu AIBN w izopropanolu. Kolbę z mieszaniną reakcyjną szczelnie zamykano i ogrzewano całą noc w temp. 70°C. Powstały kopolimer VI/VCL wytrącono w 2000 cm³ eteru dietylowego, rozpuszczano w 75 cm³ izopropanolu i ponownie wytrącano w 2000 cm³ eteru. Produkt suszono na powietrzu otrzymując 12—17 g kopolimeru.

Sporządzanie diagramów fazowych

W próbkach pojemności 10 cm³ odważono w różnych proporcjach i mieszano 20—40-proc. roztwory wodne polimerów tworzących układy dwufazowe. Mętne, białe mieszaniny rozcieńczano wodą lub 0,5-proc. wodnym roztworem NaCl do sklarowania. Wówczas notowano ilość użytego rozcieńczalnika i obliczano skład tak utworzonej mieszaniny. Przeprowadzając serię takich badań wybranego układu znajdowano punkty reprezentujące obszar jednofazowy (miesz-



Rys. 1. Przykład diagramu fazowego układu dwóch polimerów (P, Q)

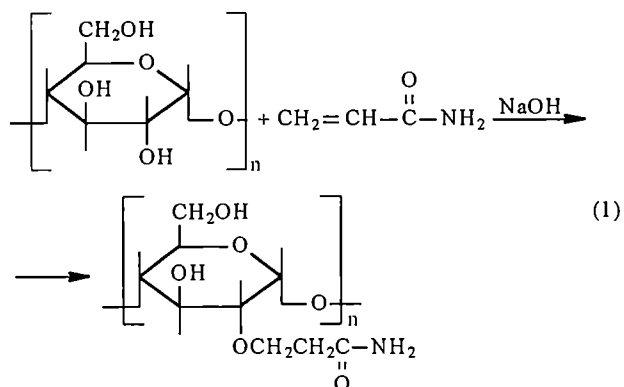
Fig. 1. An illustrative phase diagram of two polymers (P, Q)

nina homogeniczna — punkt B na rys. 1) lub dwufazowy (mieszanina heterogeniczna — punkt A na rys. 1), po czym wyznaczano krzywą określającą granicę między obszarem jedno- i dwufazowym. Wszystkie pomiary wykonywano w temp. 25°C.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Otrzymywanie akryloamidowych pochodnych skrobi

Reakcja syntezy APS przebiega według równania (1):



Należy podkreślić, że część grup amidowych w polimerze ulega hydrolizie do grup karboksylowych.

Aby otrzymać 20–30-proc. roztwory polimeru o małej lepkości i dobrej rozpuszczalności w wodzie wykonano wiele doświadczeń, w których zmieniano: stosunek reagentów, ilość katalizatora (NaOH) oraz czas i temperaturę reakcji.

Polimer o pożądanym właściwościach można otrzymać prowadząc reakcję dwuetapowo. Najpierw należy przeprowadzić degradację skrobi (czas reakcji 4 h, temp. 90°C, ilość reagentów 3,75 g NaOH, 20 g skrobi i 180 g wody). W takich warunkach następuje znaczne zmniejszenie ciężaru cząsteczkowego skrobi i utworzenie produktu dobrze rozpuszczalnego w wodzie, który następnie modyfikuje się za pomocą akryloamidu (temp. 45–50°C, czas 2 h). W ten sposób po zubożeniu mieszaniny reakcyjnej i oczyszczeniu jej za pomocą metanolu otrzymuje się pożądaną produkt.

Reakcja degradacji prowadzona w temp. 85°C nawet przez 8 h w obecności 3,75 g NaOH daje produkt zupełnie bezużyteczny (trudno rozpuszczalny w wodzie i tworzący roztwory o bardzo dużej lepkości). Zastosowanie mniejszej niż 3,75 g na 20 g skrobi ilości NaOH (temp. 90°C, czas reakcji 4 h) również jest niekorzystne. Prawdopodobnie w tych warunkach nie następuje jeszcze takie zmniejszenie ciężaru cząsteczkowego polimeru jak ma to miejsce w prawidłowej procedurze.

Użycie innych wytrącalników niż metanol (np. etanolu lub acetonu) nie pozwala na otrzymanie odpowiednio czystego polimeru, gdyż produkt jest wówczas zbitym w jeden kawałek, trudnym do oczyszczenia osadem. Jak widać synteza APS o pożądanym właściwościach wymaga bardzo ścisłego przestrzegania warunków tej reakcji.

Otrzymaliśmy dwa rodzaje APS różniące się stopniem podstawienia akryloamidem grup OH skrobi (tabela 1).

T a b e l a 1. Składy mieszanin substratów w syntezie APS
T a b l e 1. Composition of reactants mixtures in the synthesis of APS

Symbol próbki	Ilość, g			
	skrobia	woda	akryloamid	wodorotlenek sodu
S/AA = 80/15	20	180	3,75	3,75
S/AA = 80/60	20	180	15	3,75

Zawartość azotu w próbce A wynosi 0,76%, zaś w próbce B — 2,63% (analiza elementarna).

Z otrzymanych polimerów sporządzono 20–30-proc. roztwory podstawowe stosowane następnie do otrzymywania układów dwufazowych.

Otrzymywanie kopolimerów winyloimidazol/winylokaprolaktam

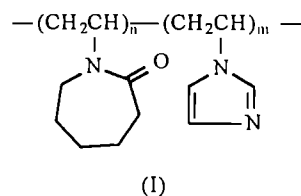
Termoczułe kopolimery VI/VCL wraz z APS zastosowaliśmy do otrzymywania układów dwufazowych. Dużą zaletą tych kopolimerów jest fakt, że wytrącają się one z wodnych roztworów w podwyższonej temperaturze, przez co możliwa jest ich recykulacja. Obecność winyloimidazolu umożliwia wprowadzenie do takich kopolimerów kationów miedzi. Dzięki takim kompleksowym połączeniom można selektywnie rozdzielać białka zawierające fragment histydynowy, np. inhibitor α -amylazy, z ich mieszaniny. Inhibitor α -amylazy ma ogromne znaczenie w medycynie, bo blokuje reakcję hydrolizy skrobi (z udziałem enzymu — amylazy) do glukozy. Użycie takiego inhibitora przez osoby chore na cukrzycę pozwala na kontrolę poziomu cukru we krwi i nie dopuszcza do jego nadmiernego wzrostu.

Uzyskaliśmy cztery próbki kopolimeru VI/VCL różniące się stosunkiem molowym monomerów (tabela 2).

T a b e l a 2. Składy mieszanin wyjściowych oraz kopolimerów VI/VCL

T a b l e 2. Compositions of the initial mixtures and of VI/VCL copolymers

Symbol próbki	Ilość winyloimidazolu		Ilość winylokaprolaktamu	
	g	% mol	g	% mol
VI/VCL = 5/95	0,71	5	19,95	95
VI/VCL = 10/90	1,42	10	18,9	90
VI/VCL = 25/75	3,56	25	15,75	75
VI/VCL = 50/50	7,12	50	10,5	50



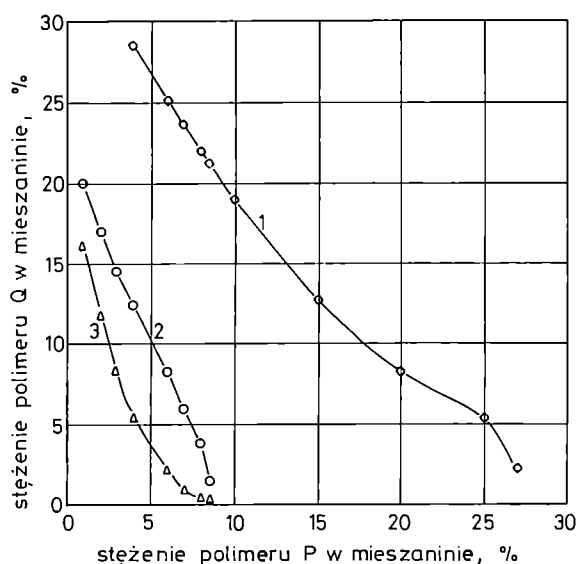
Fragment makrocząsteczki kopolimeru VI/VCL przedstawia wzór (I).

Otrzymywane w wyniku kopolimeryzacji roztwory kopolimerów w izopropanolu oczyszczano wytrącaniem w eterze dietylowym i suszono.

Z kopolimerów sporządzono 20–30-proc. roztwory podstawowe używane następnie do otrzymywania układów dwufazowych.

Układy dwufazowe zawierające APS i PEG

Z roztworów podstawowych APS i PEG sporządzano serie mieszanin o różnych wzajemnych stosunkach masowych. Następnie, postępując w sposób opisany wcześniej, sporządzano diagram fazowy układu tych dwóch polimerów.



Rys. 2. Diagram fazowy układu: polimer P (PEG 10 000), polimer Q (APS lub "Dextran T70"); polimer Q: 1 — S/AA = 80/60; 2 — S/AA = 80/60 + 0,5-proc. NaCl; 3 — "Dextran T70"

Fig. 2. The phase diagrams of the systems: polymer P (PEG 10 000), polymer Q (APS or Dextran T70); polymer Q: 1 — S/AA = 80/60; 2 — S/AA = 80/60 + aq. 0.5% NaCl; 3 — Dextran T70

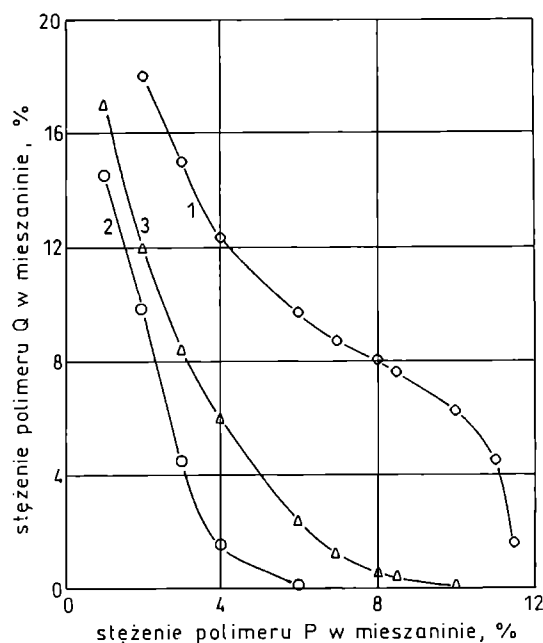
Rysunek 2 przedstawia diagramy fazowe układu: polimer P (PEG 10 000)—polimer Q (APS lub "Dextran T70"). Na tym, jak i na następnych diagramach fazowych dla porównania zostały również zamieszczone dane dotyczące dekstranu typu "Dextran T70".

W przypadku układu z udziałem S/AA = 80/60 jako polimeru Q (krzywa 1, rys. 2), układy dwufazowe otrzymuje się stosując dość duże stężenia obu polimerów w mieszaninie (średnio wynoszą one co najmniej 15%). Są to układy o dość znacznej lepkości, niekorzystnie wydłużającej czas rozdziału faz.

Zmniejszenie stężeń polimerów koniecznych do uzyskania układów dwufazowych można osiągnąć w wy-

niku dodania NaCl. Już 0,5-proc. zawartość NaCl w mieszaninie polimerów (krzywa 2, rys. 2) pozwala na zmniejszenie stężenia do ok. 8%. Takie układy mają małą lepkość i w krótkim czasie doskonale rozdzielają się. W przypadku "Dekstranu T70" stężenia polimerów konieczne do osiągnięcia układów dwufazowych są jeszcze mniejsze — wynoszą ok. 5%. Nie umniejsza to jednak znaczenia układu z polimerem Q — S/AA = 80/60 + 0,5-proc. NaCl, gdyż stężenie 8% jest również zadowalające.

Rysunek 3 przedstawia diagramy fazowe układu: polimer P (PEG 10 000)—polimer Q (APS lub "Dextran T70") dotyczące innego rodzaju APS.



Rys. 3. Diagram fazowy układu: polimer P (PEG 10 000), polimer Q (APS lub "Dextran T70"); polimer Q: 1 — S/AA = 80/15; 2 — S/AA = 80/15 + 0,5-proc. NaCl; 3 — "Dextran T70"

Fig. 3. The phase diagram of the system: polymer P (PEG 10 000), polymer Q (APS or Dextran T70); polymer Q: 1 — S/AA = 80/15; 2 — 80/15 + aq. 0.5% NaCl; 3 — Dextran T70

Użycie polimeru S/AA = 80/15 jako polimeru Q pozwala na otrzymanie układów dwufazowych już w zakresie stężeń polimerów ok. 9% (rys. 3, krzywa 1), a więc znacznie mniejszym niż w przypadku polimeru S/AA = 80/60. Dodatek 0,5-proc. NaCl do takiego układu powoduje dalsze zmniejszenie koniecznych do powstania układu dwufazowego stężeń polimerów do ok. 4% (rys. 3, krzywa 2), a więc mniejszych niż stężenie wzorcowego "Dekstranu T70" (rys. 3, krzywa 3).

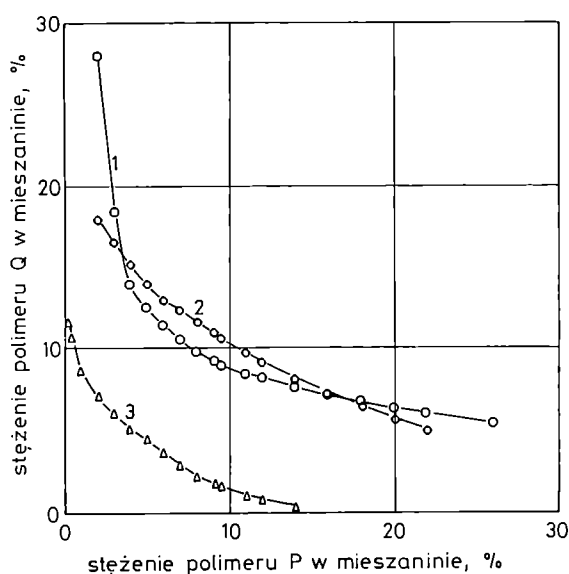
Zatem, pochodne skrobi S/AA = 80/60 (z dodatkiem NaCl) oraz S/AA = 80/15 doskonale nadają się do otrzymywania układów dwufazowych z PEG 10 000. Obecność NaCl w niewielkim stężeniu w poszczegól-

nych fazach po rozdzieleniu układu nie sprawia problemu, bo można go łatwo usunąć metodą dializy.

Układy dwufazowe zawierające APS i kopolimery VI/VCL

Postępując podobnie jak w przypadku układów APS—PEG 10 000 sporządziliśmy szereg diagramów fazowych układów APS—kopolimer VI/VCL. Rysunek 4 przedstawia takie diagramy fazowe z udziałem S/AA = 80/60 i S/AA = 80/15 oraz kopolimeru VI/VCL = 5/95, a rysunek 5 — takie same układy z dodatkiem 0,5-proc. NaCl.

W przypadku polimerów S/AA = 80/60 i S/AA = 80/15 w omawianym układzie, stężenia konieczne do otrzymania układów dwufazowych wynoszą 9—10% (rys. 4, krzywe 1 i 2), a więc dwukrotnie więcej niż w odniesieniu do "Dextranu T70" (krzywa 3).



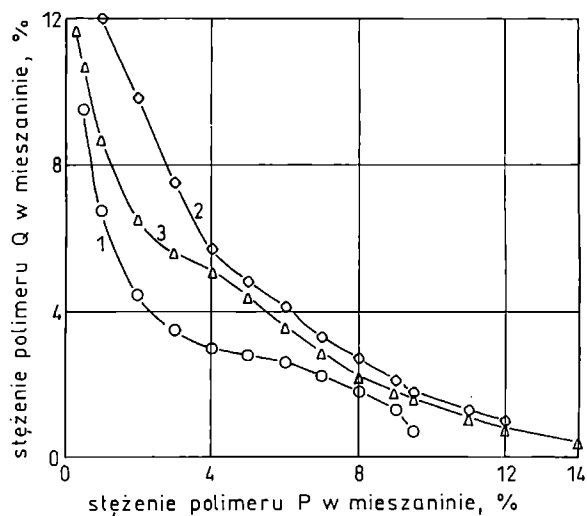
Rys. 4. Diagram fazowy układu: polimer P (VI/VCL = 5/95), polimer Q (APS lub "Dextran T70"); polimer Q: 1 — S/AA = 80/60; 2 — S/AA = 80/15; 3 — "Dextran T70"
Fig. 4. The phase diagram of the system: polymer P (VI/VCL = 5/95), polymer Q (APS or Dextran T70); polymer Q: 1 — S/AA = 80/60; 2 — S/AA = 80/15; 3 — Dextran T70

Dodatek 0,5-proc. NaCl (rys. 5) pozwala na zmniejszenie stężenia pochodnych skrobi S/AA = 80/60 i S/AA = 80/15 do ok. 4—5% (krzywe 1 i 2), porównywalnego ze stężeniem "Dextranu T70" (krzywa 3).

Takie układy mają małą lepkość i doskonale, po niezbyt długim czasie (2—6 h), rozdzielają się na dwie fazy.

Nieco lepszym polimerem z grupy APS okazała się pochodna S/AA = 80/60, gdyż aby uzyskać układy dwufazowe wystarczą mniejsze jej stężenia niż pochodnej S/AA = 80/15.

Aby sprawdzić, w jaki sposób na układy dwufazowe

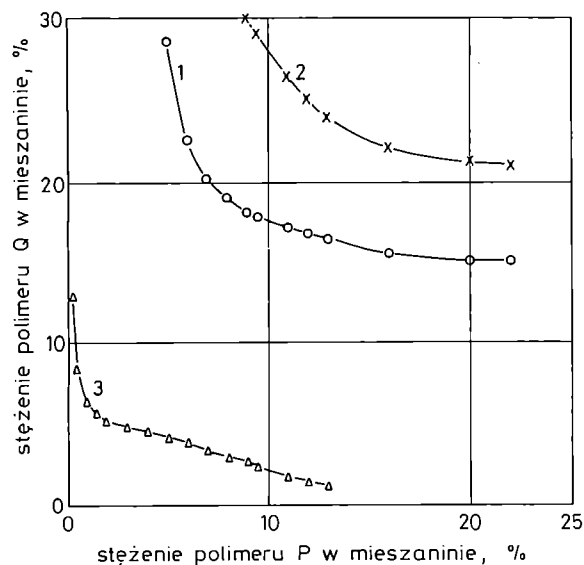


Rys. 5. Diagram fazowy układu: polimer P (VI/VCL = 5/95), polimer Q (APS + NaCl lub "Dextran T70"); polimer Q: 1 — S/AA = 80/60 + 0,5-proc. NaCl; 2 — S/AA = 80/15 + 0,5-proc. NaCl; 3 — "Dextran T70"

Fig. 5. The phase diagram of the system: polymer P (VI/VCL = 5/95), polymer Q (APS + NaCl or Dextran T70). Polymer Q: 1 — S/AA = 80/60 + aq. 0.5% NaCl; 2 — S/AA = 80/15 + aq. 0.5% NaCl; 3 — Dextran T70

z APS wpłynie zwiększona zawartość VI w kopolimerze, zamiast kopolimeru VI/VCL = 5/95 użyliśmy VI/VCL = 25/75.

Zwiększenie zawartości VI w kopolimerze z VCL z 5

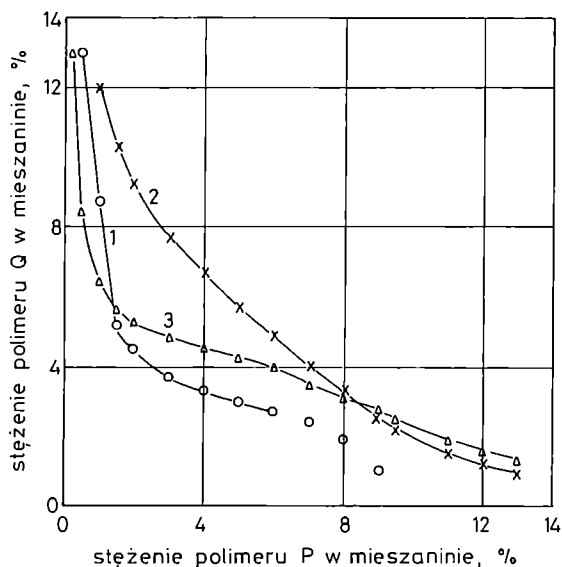


Rys. 6. Diagram fazowy układu: polimer P (VI/VCL = 25/75), polimer Q (APS lub "Dextran T70"); polimer Q: 1 — S/AA = 80/60; 2 — S/AA = 80/15; 3 — "Dextran T70" (2 — krzywa hipotetyczna)

Fig. 6. The phase diagram of the system: polymer P (VI/VCL = 25/75), polymer Q (APS or Dextran T70), polymer Q: 1 — S/AA = 80/60; 2 — S/AA = 80/15; 3 — Dextran T70 (2 — hypothetical curve)

do 25% mol. powoduje znaczne zwiększenie stężeń potrzebnych do utworzenia układów dwufazowych z APS (rys. 6). W przypadku polimeru S/AA = 80/60 takie stężenie wynosi co najmniej 16%, a w przypadku polimeru S/AA = 80/15 nie udało się wyznaczyć diagramu fazowego, gdyż potrzebne do tego celu stężenia składników okazały się zbyt duże. W zakresie stężeń do 20% składników w całej mieszaninie nie uzyskaliśmy układu dwufazowego. Do otrzymania wymaganej kompozycji zawierającej >20% każdego z polimerów należałoby natomiast użyć ich roztworów o stężeniach >40%, a więc o bardzo dużej lepkości, co przekreśla ewentualną użyteczność powstających mieszanin. Zrezygnowaliśmy więc z prób dalszego zwiększania stężenia, a odpowiednia krzywa 2 na rys. 6 jest krzywą hipotetyczną.

Opisane wyniki można łatwo wyjaśnić tym, że zwiększenie zawartości VI w kopolimerze VI/VCL powoduje zwiększenie hydrofilowości, a więc rozpuszczalności w wodzie tego kopolimeru.



Rys. 7. Diagram fazowy układu: polimer P (VI/VCL = 25/75), polimer Q (APS + NaCl lub "Dextran T70"); polimer Q: 1 — S/AA = 80/60 + 0,5-proc. NaCl; 2 — S/AA = 80/15 + 0,5-proc. NaCl; 3 — "Dextran T70"

Fig. 7. The phase diagram of the system: polymer P (VI/VCL = 25/75), polymer Q (APS + NaCl or Dextran T70); polymer Q: 1 — S/AA = 80/60 + aq. 0.5% NaCl; 2 — S/AA = 80/15 + aq. 0.5% NaCl; 3 — Dextran T70

Rysunek 7 przedstawia te same układy polimerowe (P = VI/VCL = 25/75, Q = S/AA = 80/60 lub S/AA = 80/15) ale wzbogacone dodatkiem 0,5-proc. NaCl.

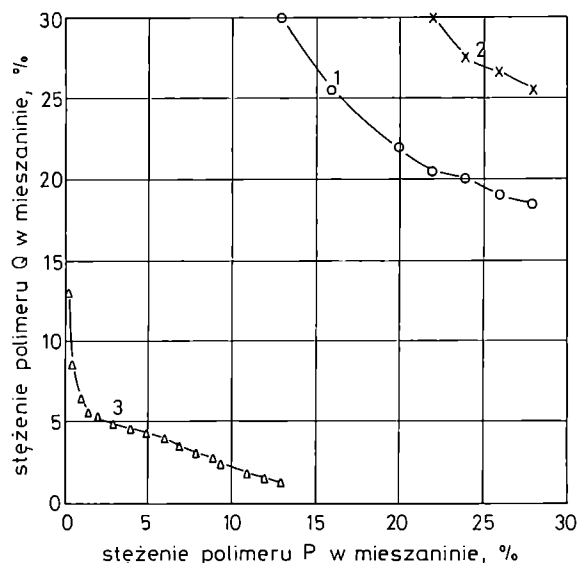
Podobnie jak w przypadku układu złożonego z APS i kopolimeru VI/VCL = 5/95, dodatek NaCl zmniejsza stężenia polimerów APS oraz kopolimeru VI/VCL = 25/75 potrzebne do otrzymania układów dwufazowych; stężenia APS wynoszą przy tym ok. 4–6% (rys.

7, krzywe 1 i 2), a więc są porównywalne ze stężeniem "Dextranu T70" (krzywa 3).

Układy tego typu mają małą lepkość i dość szybko (1–6 h) rozdzielają się na dwie fazy.

Aby otrzymać układy dwufazowe wystarczą tu mniejsze stężenia S/AA = 80/60 niż S/AA = 80/15; zatem pochodna skrobi z większą zawartością akryloamidów jest lepsza.

W dalszej pracy używano kopolimeru VI/VCL = 50/50. Zwiększenie zawartości hydrofilowego VI w kopolimerze VI/VCL do 50% mol. powoduje, że w przypadku APS typu S/AA = 80/15 w ogóle nie otrzymuje się układów dwufazowych, nawet w obecności 0,5-proc. NaCl (rys. 8 i 9). Pochodna S/AA = 80/60



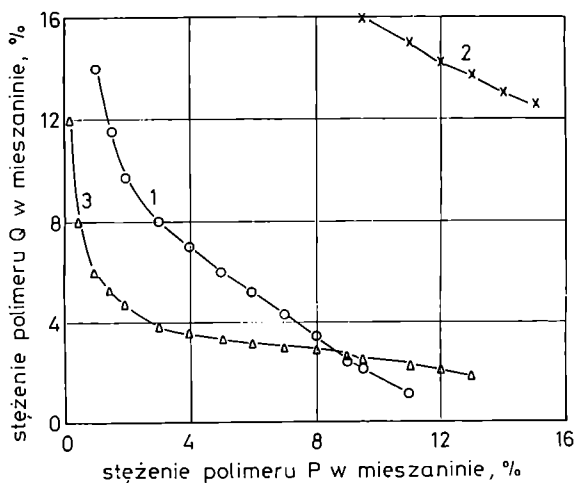
Rys. 8. Diagram fazowy układu: polimer P (VI/VCL = 50/50), polimer Q (APS lub "Dextran T70"); polimer Q: 1 — S/AA = 80/60; 2 — S/AA = 80/15; 3 — "Dextran T70" (1, 2 — krzywe hipotetyczne)

Fig. 8. The phase diagram of the system: polymer P (VI/VCL = 50/50), polymer Q (APS or Dextran T70); polymer Q: 1 — S/AA = 80/60; 2 — S/AA = 80/15; 3 — Dextran T70 (1, 2 — hypothetical curves)

tworzy układy dwufazowe z kopolimerem VI/VCL = 50/50 dopiero w obecności 0,5-proc. NaCl; do utworzenia takich układów potrzebne jest stężenie polimerów co najmniej 5–6% (rys. 9, krzywa 1).

Zatem zwiększenie hydrofilowości kopolimerów VI z VCL poprzez większy udział w nich VI przyczynia się do ograniczenia możliwości powstawania układów dwufazowych z APS. To zjawisko jest niekorzystne, ponieważ im więcej VI w kopolimerze, tym więcej można przyłączyć jonów miedzi (II) (tworzącej kompleksy z VI), a z kolei im więcej związanej miedzi (II), tym większa zdolność oczyszczania białek przez układy dwufazowe.

W drugiej części pracy omówimy: otrzymywanie



Rys. 9. Diagram fazowy układu: polimer P (VI/VCL = 50/50), polimer Q (APS + NaCl lub "Dextran T70"); polimer Q: 1 — S/AA = 80/60 + 0,5-proc. NaCl; 2 — S/AA = 80/15 + 0,5-proc. NaCl; 3 — "Dextran T70" (2 — krzywa hipotetyczna)

Fig. 9. The phase diagram of the system: polymer P (VI/VCL = 50/50), polymer Q (APS + NaCl or Dextran T70); polymer Q: 1 — S/AA = 80/60 + aq. 0.5% NaCl; 2 — S/AA = 80/15 + aq. 0.5% NaCl; 3 — Dextran T70 (2 — hypothetical curve)

kompleksowych połączeń kopolimerów VI/VCL z jonami Cu (II), pomiary temperatury wytrącania się tych kompleksów z roztworów wodnych, tworzenie przez nie wraz z APS układów dwufazowych oraz oczyszczanie inhibitora α -amylazy z mieszaniny białek.

PODSUMOWANIE

— Ustalono, że akryloamidowe pochodne skrobi (APS), mogące znaleźć zastosowanie w biotechnologii, w stężeniu 20–30% tworzą roztwory o małej lepkości, które nadają się do otrzymywania wodnych układów dwufazowych z PEG 10 000 i kopolimerami VI/VCL.

— Pochodna S/AA = 80/60 i PEG 10 000 tworzą układy dwufazowe gdy stężenia obu polimerów w mieszaninie są dość duże (średnio co najmniej 15%), mieszanina S/AA = 80/15 + PEG 10 000 pozwala na otrzymanie układów dwufazowych już w zakresie stężeń polimerów ok. 9%. Są to jednak układy o dość znacznej lepkości, niekorzystnie przedłużającej czas rozdziału faz. Obecność 0,5-proc. NaCl pozwala na zmniejszenie stężeń obu składników koniecznych do uzyskania układów dwufazowych roztworu do ok. 4–8%. Takie układy mają małą lepkość i szybko ulegają dobremu rozdzieleniu.

— W przypadku pochodnych S/AA = 80/60 i S/AA = 80/15 w układzie z kopolimerem VI/VCL (zamiast PEG), stężenia konieczne do otrzymania układów dwufazowych wynoszą 9–10%, są więc dwukrotnie większe niż w przypadku wzorcowego "Dextranu T70". Do-

datek 0,5-proc. NaCl pozwala na zmniejszenie stężeń tych pochodnych do poziomu 4–5%, porównywalnego ze stężeniem wzorcowego "Dextranu T70".

— Zwiększenie zawartości VI w kopolimerze z VCL z 5 do 25% mol. powoduje wzrost stężeń potrzebnych do utworzenia układów dwufazowych z APS. W przypadku APS typu S/AA = 80/60 takie stężenie wynosi co najmniej 16%, a w przypadku APS typu S/AA = 80/15 wogóle nie otrzymano układu dwufazowego, gdyż potrzebne do tego celu stężenia składników okazały się zbyt duże. Dodatek 0,5-proc. NaCl pozwala na zmniejszenie stężeń polimerów S/AA = 80/60 i S/AA = 80/15 w układzie z kopolimerem VI/VCL do poziomu ok. 4–6%, porównywalnego ze stężeniem "Dextranu T70". Takie układy mają małą lepkość i dość szybko (1–6 h) rozdzielają się na dwie fazy.

— Dalsze zwiększenie zawartości VI w kopolimerze z VCL do 50% mol. powoduje, że w przypadku pochodnej S/AA = 80/15 wogóle nie otrzymuje się układów dwufazowych, nawet w obecności 0,5-proc. NaCl. Zjawisko to jest spowodowane dużą hydrofilowością VI. Pochodna S/AA = 80/60 tworzy układy dwufazowe z kopolimerem VI/VCL = 50/50 dopiero w obecności 0,5-proc. NaCl (stężenie polimerów co najmniej 5–6%).

— Przedstawione wyniki wskazują, że akryloamidowe pochodne skrobi mogą z powodzeniem zastąpić kosztowny dekstran w układach dwufazowych stosowanych do oczyszczania białek.

LITERATURA

1. Albertsson P.: "Partition of Cell Particles and Macromolecules", 2. wyd., Almquist & Wiksell, Sztokholm 1971.
2. Albertsson P., Andersson B., Larsson C., Akerlund H.: *Methods Biochem. Anal.* 1981, 28, 115.
3. Walter H., Brooks D., Fisher D.: "Partitioning in Aqueous Two-Phase System: Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology", Academic Press, Orlando 1985.
4. Kula M., Droner K., Hustedt H.: *Adv. Biochem. Bioeng.* 1982, 24, 73.
5. Veide A., Smeds A., Enfors S.: *Biotechnol. Bioeng.* 1983, 25, 1789.
6. Menge U., Kula M.: *Enzyme Microb. Technol.* 1984, 6, 101.
7. Johansson G.: *J. Biotechnol.* 1985, 3, 11.
8. Johansson G.: *Methods Enzymol.* 1984, 104, 356.
9. Cordes A.: "Thesis", Technische Universität Braunschweig, Braunschweig 1985.
10. Ling T., Mattiasson B.: *J. Chromatogr.* 1982, 252, 156.
11. Tjerneld F., Persson I., Albertsson P., Hahn-Hagerdal B.: *Biotechnol. Bioeng.* 1985, 27, 1036.
12. Tjerneld F., Persson I., Albertsson P., Hahn-Hagerdal B.: *Biotechnol. Bioeng.* 1985, 27, 1044.

13. Kroner K., Hustedt H., Kula M.: *Process Biochem.* 1984, 19, 170.
14. Kroner K., Hustedt H., Kula M.: *Biotechnol. Bioeng.* 1982, 24, 1015.
15. Brzozowski Z.: "Starch-acrylamide copolymers", invited lecture at the conference "Advanced Polymers via Molecular Engineering '97", Orlando, Floryda (USA), 24 kwietnia 1997 r.
16. Brzozowski Z., Noniewicz K.: *Polimery* 1993, 38, 8.
17. Brzozowski Z., Noniewicz K.: *Polimery* 1994, 39, 82.
18. Brzozowski Z.: "Modyfikacja polimerów naturalnych i ich ekologiczne zastosowania", XII Konferencja Naukowa "Modyfikacja Polimerów", Kurodowa Zdrój, Materiały RP 18, 1995, str. 58.

Otrzymano 26 I 1999 r.

KALENDARZ IMPREZ

c.d. ze str 607

21—24 maja 2001 r. Montreal, Kanada. "PPS-17 — The Polymer Processing Society: Seventeenth Annual Meeting".

Rejestracja i informacje: Prof. André Fortin, Secretariat PPS-17, Département de Math. Appliqués, Ecole Polytechnique de Montreal, C. P. 6079, succ. "Centre-Ville", Montreal, Quebec, H3C 3A7, Canada; e-mail: pps17@gch.polymtl.ca; internet: <http://gch.polymtl.ca/pps17>.

10—14 czerwca 2001 r. Rimini, Włochy. "7th European Conference and Exhibition on Advanced Materials and Processes — EUROMAT 2001".

Tematyka: polimery, kompozyty polimerowe, materiały odporne na wysokie temperatury, inżynieria powierzchni — modyfikacje i powłoki, procedury badań i właściwości materiałów, modelowanie i projektowanie materiałów i in.

Organizatorzy: Associazione Italiana di Metallurgia + Federation of European Materials Societies (FEMS).

Informacje: AIM — Associazione Italiana di Metallurgia, Piazzale Rodolfo Morandi 2, I-20121 Milano, Italy. Tel.: +39 02-7602-1132, fax: +39 02-7602-0551; e-mail: aim@fast.mi.it; internet: <http://www.fast.mi.it/aim.euromat.htm>.

9—12 lipca 2001 r. Praga, Czechy. 2001 Prague Meetings on Macromolecules — 20th Discussion Conference: "Scattering Methods for the Investigation of Polymers".

Organizator: Instytut Chemii Makromolekularnej Akademii Naukowej Republiki Czeskiej (pod auspicjami Mię-

dzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej IUPAC).

Informacje: P.P.M. Secretariat, Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovského nam. 2, CZ-162 06 Praha 6. Czech Republic. Tel.: (4202) 20 403 332, fax: (4202) 367 981; e-mail: sympo@imc.cas.cz.

2—7 września 2001 r. Jerozolima, Izrael. "The 6th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies — PAT 2001".

Informacje: Conference Secretariat — The 6th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies PAT 2001, c/o International Travel Congresses Ltd., 20, Rotschild Blvd., P.O. Box 29313, 61 292. Tel Aviv, Israel. Tel.: +972-3-795-1444, fax: +972-3-510771; e-mail: congs@international.tc.co.il oraz dla kontaktów merytorycznych: Prof. Avi Domb, The Hebrew University of Jerusalem 91120, Israel. Tel.: +972-2-6758696, fax: +972-2-6757629; e-mail: adomb@cc.huji.ac.

25 października — 1 listopada 2001 r. Duesseldorf, Niemcy. 15th International Trade Fair PLASTICS + RUBBER — K 2001.

Organizator: Messe Duesseldorf GmbH.

Informacje: Messe Duesseldorf GmbH, Postfach 1010-06, D-40001 Duesseldorf; Stockumer Kirchstrasse 61, D-40474 Duesseldorf, Germany. Tel.: +49 (0) 211/4560-01, InfoTel: +49 (0) 211/4560-900, fax: +49 (0) 211/4560-668, InfoFax: +49 (0) 211/4560-86100; e-mail: info@messe-duesseldorf.de; internet: <http://www.messe-duesseldorf.de>.