



Politechnika Wroclawska

# **Termoczule polimery usieciowane – synteza i wybrane właściwości**

Praca doktorska

mgr inż. Agnieszka Hamerska-Dudra

promotor: dr hab. inż. Andrzej W. Trochimczuk

WROCLAW 2007

---

## SPIS TREŚCI

Streszczenie .....	5
Wykaz skrótów .....	7
1. PRZEGLĄD LITERATURY .....	9
1.1 Polimery usieciowane .....	9
1.1.1 Zastosowanie polimerów usieciowanych – polimery specjalne .....	14
1.2 Termoczułe polimery .....	19
1.2.1 Zastosowanie termoczulych polimerów .....	26
1.2.2 Termoczułe jonity .....	29
1.3 Immobilizacja enzymów .....	36
1.3.1 Adsorpcja .....	38
1.3.2 Immobilizacja kowalencyjna .....	43
1.3.3 Immobilizacja enzymów na termoczulych polimerach .....	53
2. CEL PRACY .....	59
3. MATERIAŁY I METODY .....	60
3.1 Materiały użyte podczas syntezy polimerów i badania ich właściwości .....	60
3.2 Polimeryzacja suspensyjna .....	64
3.2.1 Synteza jonitów .....	64
3.2.2 Struktury użytych środków sieciujących .....	65
3.2.3 Synteza nośników do immobilizacji enzymów .....	65
3.2.4 Modyfikacja etylenodiaminą .....	67
3.3 Charakterystyka otrzymanych polimerów .....	68
3.3.1 Oznaczanie azotu – metoda Kjeldahla .....	68
3.3.2 Oznaczanie fosforu .....	68
3.3.3 Grupy epoksydowe .....	69
3.3.4 Chłonność .....	69
3.3.5 Objętość właściwa polimeru i zawartość polimeru w żelu .....	70
3.3.6 Pojemność kwasowa .....	70
3.3.7 Oznaczanie grup aminowych .....	70
3.3.8 Jakościowe oznaczanie grup aminowych .....	71
3.3.9 Wyznaczenie temperatury objętościowej przemiany fazowej (VPTT) .....	72
3.3.10 Miareczkowanie pH-metryczne .....	72
3.4 Sorpcja metali na jonitach .....	73
3.4.1 Sorpcja europu .....	73
3.4.2 Sorpcja miedzi .....	73
3.4.3 Sorpcja potasu .....	73
3.4.4 Obliczanie parametrów sorpcji jonów .....	74
3.4.5 Wpływ rodzaju środka sieciującego na sorpcję .....	74
3.4.6 Wpływ ilości środka sieciującego na sorpcję .....	75
3.4.7 Kinetyka sorpcji europu i miedzi .....	75
3.4.8 Rozdział lantanowców .....	75
3.5 Charakterystyka preparatów enzymatycznych .....	77
3.5.1 Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry'ego .....	77
3.5.2 Aktywność inwertazy natywnej .....	78
3.5.3 Oznaczanie stężenia glukozy .....	78
3.5.4 Aktywność glukoamylazy natywnej .....	79
3.5.5 Aktywność trypsyny natywnej .....	79
3.5.6 Aktywność nośników z immobilizowaną inwertazą .....	80
3.5.7 Aktywność nośników z immobilizowaną glukoamylazą .....	81

---

3.5.8 Aktywność nośników z immobilizowaną trypsyną.....	81
3.5.9 Aktywność nośników z immobilizowaną lakkazą .....	82
3.5.10 Stabilność preparatów enzymatycznych .....	82
3.6 Immobilizacja inwertazy .....	83
3.6.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH <sub>2</sub> i TG8-NH <sub>2</sub> .....	83
3.6.2 „Ssanie” na nośniku T8 .....	84
3.6.3 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach z grupami aminowymi: TAEMA, TG8-NH <sub>2</sub> i TH8-NH <sub>2</sub> .....	84
3.6.4 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami hydroksylowymi: TH8.....	85
3.6.5 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami karboksylowymi: TMA .....	86
3.6.6 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami epoksydowymi: TG8.....	86
3.7 Immobilizacja glukoamylazy .....	87
3.7.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH <sub>2</sub> i TG8-NH <sub>2</sub> .....	87
3.7.2 „Ssanie” na nośniku THN .....	87
3.7.3 „Ssanie” na nośniku T8 .....	88
3.7.4 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami epoksydowymi – dobór warunków reakcji.....	89
3.7.5 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach z grupami aminowymi: TAEMA, TG8-NH <sub>2</sub> i TH8-NH <sub>2</sub> .....	89
3.7.6 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami hydroksylowymi: TH8.....	90
3.7.7 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami karboksylowymi: TMA .....	90
3.7.8 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami epoksydowymi: TG8.....	90
3.8 Immobilizacja trypsyny.....	92
3.8.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH <sub>2</sub> i TG8-NH <sub>2</sub> .....	92
3.8.2 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach z grupami aminowymi: TAEMA, TG8-NH <sub>2</sub> i TH8-NH <sub>2</sub> .....	92
3.8.3 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami hydroksylowymi: TH8.....	93
3.8.4 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami karboksylowymi: TMA .....	94
3.8.5 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami epoksydowymi: TG8.....	94
3.9 Immobilizacja lakkazy .....	96
3.9.1 „Ssanie” na nośnikach TH8 i T8 .....	96
4. OMÓWIENIE WYNIKÓW .....	97
4.1 Charakterystyka jonitów.....	97
4.1.1 Wpływ rodzaju środka sieciującego na zmiany objętości jonitów.....	100
4.1.2 Wpływ ilości środka sieciującego na zmiany objętości jonitów .....	103
4.2 Charakterystyka nośników do immobilizacji enzymów .....	108
4.2.1 Zmiany objętości nośników w funkcji temperatury .....	114
4.3 Sorpcja na termoczulych jonitach .....	116
4.4 Kinetyka sorpcji jonów europu i miedzi .....	131
4.5 Rozdział lantanowców .....	134
4.6 Immobilizacja inwertazy .....	138

---

4.6.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH <sub>2</sub> i TG8-NH <sub>2</sub> .....	138
4.6.2 „Ssanie” na nośniku T8 .....	142
4.6.3 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach: TAEMA, TH8-NH <sub>2</sub> , TG8-NH <sub>2</sub> , TH8, TMA i TG8 .....	143
4.7 Immobilizacja glukoamylazy .....	146
4.7.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH <sub>2</sub> i TG8-NH <sub>2</sub> .....	146
4.7.2 „Ssanie” na nośniku THN .....	150
4.7.3 „Ssanie” na nośniku T8 .....	153
4.7.4 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku TG8 - dobór warunków reakcji .....	154
4.7.5 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach TAEMA, TH8-NH <sub>2</sub> , TG8-NH <sub>2</sub> , TH8, TMA i TG8 .....	156
4.8 Immobilizacja trypsyny .....	158
4.8.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH <sub>2</sub> i TG8-NH <sub>2</sub> .....	158
4.8.2 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach: TAEMA, TH8-NH <sub>2</sub> , TG8-NH <sub>2</sub> , TH8, TMA i TG8 .....	161
4.9 Immobilizacja lakkazy .....	165
4.9.1 „Ssanie” na TH8 i T8 .....	165
5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....	167
6. LITERATURA .....	171

**Streszczenie**

Termoczułe usieciowane polimery zawierające grupy funkcyjne otrzymano podczas polimeryzacji suspensyjnej N-izopropylakryloamidu (NIPAAm - monomeru odpowiedzialnego za wrażliwość na temperaturę) i monomerów funkcjonalnych. Zsyntetyzowano serię jonitów – kopolimerów NIPAAm i 2-metakryloilooksyetylofosforanu (MEP) usieciowanych dimetakrylanem glikolu etylenowego (EGDMA), dimetakrylanem glikolu trietylenowego (TEGDMA) i trimetakrylanem 2-etylo-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiolu (TMPMA) ze średnią wydajnością 83% oraz serię nośników do immobilizacji enzymów ze średnią wydajnością 80%. Nośniki to kopolimery NIPAAm i metakrylanu 2-hydroksyetylu (HEMA), metakrylanu glicydyłu (GMA), metakrylanu 2-aminoetylu (AEMA) lub kwasu metakrylowego (MA), usieciowane w większości przypadków EGDMA.

Usieciowane termoczułe polimery reagują skokową zmianą objętości na zmiany temperatury otoczenia. Maksymalną zmianę objętości obserwuje się w temperaturze objętościowej przemiany fazowej (VPTT). Zakres temperatury VPTT dla jonitów wynosił 42-46°C, a dla nośników do immobilizacji 31-46°C.

Na jonitach sorbowano następujące jony metali: Eu(III), Cu(II) i K(I). Zbadano wpływ temperatury oraz pH roztworu na sorpcję wyżej wymienionych pierwiastków, a także wpływ struktury użytego środka sieciującego. Stwierdzono, że na sorpcję trójwartościowego europu istotny wpływ ma struktura jonitu. W temperaturze powyżej VPTT, gdy jonit był skurczony, zaobserwowano zwiększenie sorpcji europu, szczególnie dla jonitu usieciowanego EGDMA. Wartości logarytmu współczynnika podziału oznaczone podczas sorpcji z roztworu o pH 3 w temperaturach 5, 23 i 47°C wynosiły odpowiednio: 3,68, 4,14 i 5,03. Odległość pomiędzy sąsiednimi grupami fosforanowymi w skurczonym polimerze jest mniejsza w porównaniu z odległością w temperaturze poniżej VPTT, w której jonit jest rozkurczony. W przypadku jonitu usieciowanego TMPMA nie zaobserwowano zwiększenia sorpcji europu powyżej VPTT. Wartości logarytmu współczynnika podziału oznaczone podczas sorpcji z roztworu o pH 3 w temperaturach 5, 23 i 47°C wynosiły odpowiednio: 3,73, 3,80 i 3,58. TMPMA usztywnia strukturę jonitu, przez co jest on mniej wrażliwy na zmiany temperatury i powyżej VPTT nie zmniejsza gwałtownie

swojej objętości. Uzyskane wartości sorpcji z roztworów o pH 2 były nieco mniejsze w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla roztworów o pH 3 i 4. Grupy fosforanowe jonitów w pH 2 nie są zdysocjowane i europ jest koordynowany przez fosforylowy atom tlenu. W pH 3 część grup fosforanowych jest zdysocjowana i oprócz koordynacji metalu mamy do czynienia z wymianą jonową. Dla jonów miedzi i potasu nie zaobserwowano zwiększenia sorpcji powyżej VPTT. Ponadto wartości sorpcji z roztworów o pH 2 były niewielkie dla miedzi, a potas praktycznie nie był sorbowany. Rodzaj użytego środka sieciującego nie miał wpływu na sorpcję miedzi. Na podstawie wyników uzyskanych dla potasu, stwierdzono, że jonity z grupami fosforanowymi mają niewielkie powinowactwo do tego metalu.

Na termoczulych nośnikach immobilizowano: glukoamylazę, inwertazę, trypsynę i lakkazę. Enzymy były unieruchamiane metodą „ssania”, opracowaną w ramach pracy doktorskiej i wykorzystującą gwałtowne zmiany objętości nośników w temperaturze VPTT lub kowalencyjnie. Enzym immobilizowany metodą „ssania” był zamknięty wewnątrz sieci polimerowej. Część preparatów sieciowano dodatkowo za pomocą aldehydu glutarowego. W przypadku nośników posiadających grupy aminowe podczas sieciowania aldehyd glutarowy mógł reagować z grupami aminowymi dwóch cząsteczek enzymu lub grupą aminową enzymu i grupą aminową nośnika lub dwiema grupami aminowymi nośnika. W wyniku tych reakcji otrzymano układy przenikających się sieci. Aktywność otrzymanych preparatów zależała między innymi od stężenia aldehydu glutarowego i z reguły była większa dla większych stężeń czynnika sieciującego. Najlepsze wyniki uzyskano dla immobilizowanej trypsyny. Aktywność niektórych preparatów wynosiła ponad 5,50 [U/cm<sup>3</sup>]. Polimery termoczule z grupami aminowymi, hydroksylowymi, karboksylowymi i epoksydowymi po aktywacji wykorzystano do kowalencyjnej immobilizacji glukoamylazy, inwertazy i trypsyny. W przypadku trypsyny uzyskane preparaty charakteryzowały się dużą aktywnością, której wartość dla najlepszego preparatu wynosiła 37,91 [U/cm<sup>3</sup>]. Aktywność preparatów z immobilizowaną inwertazą była bardzo mała i nie przekroczyła wartości 1,0 [U/cm<sup>3</sup>], natomiast nośniki z immobilizowaną glukoamylazą były praktycznie nieaktywne.

**Wykaz skrótów***Związki chemiczne*

AEMA	Metakrylan 2-aminoetylu
BAPNA	Chlorowodorek p-nitroanilidu N $\alpha$ -benzoilo-DL-argininy
DVB	Diwinylobenzen
EGDMA	Dimetakrylan glikolu etylenowego
GMA	Metakrylan glicydylu
HEMA	Metakrylan 2-hydroksyetylu
MA	Kwas metakrylowy
MBA	N,N'-metylenobisakryloamid
MEP	2-metakryloilo(oksyetylo) fosforan
NIPAAm	N-izopropylakryloamid
TEGDMA	Dimetakrylan glikolu trietylenowego
TMPMA	Trimetakrylan 2-etylo-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiolu

*Nazwy otrzymanych polimerów*

TP8	NIPAAm/MEP/EGDMA (5,9% molowych)
TP12	NIPAAm/MEP/EGDMA (8,0% molowych)
TPT*	NIPAAm/MEP/TEGDMA (4,0% molowych)
TPT	NIPAAm/MEP/TEGDMA (5,9% molowych)
TP3F	NIPAAm/MEP/TMPMA (5,9% molowych)
TH8	NIPAAm/HEMA/EGDMA
THN	NIPAAm/HEMA/TEGDMA
TG8	NIPAAm/GMA/EGDMA
T8	NIPAAm/EGDMA
TMA	NIPAAm/MA/EGDMA
TAEMA	NIPAAm/AEMA/EGDMA
TH8-NH <sub>2</sub>	TH8 – zmodyfikowany etylenodiaminą
TG8-NH <sub>2</sub>	TG8 – zmodyfikowany etylenodiaminą

## Skróty

LCST	Dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności
VPTT	Temperatura objętościowej przemiany fazowej
W	Chłonność wody [g/g]
Z <sub>N</sub>	Zawartość azotu [mmol/g suchego polimeru]
Z <sub>P</sub>	Zawartość fosforu [mmol/ g suchego polimeru]
Z <sub>GF</sub>	Zawartość grup funkcyjnych [mmol/ g suchego polimeru]
Z	Pojemność kwasowa [mmol/ g suchego polimeru]
S <sub>A</sub>	Wartość sorpcji jonu na polimerze [mmol/ g suchego polimeru]
K <sub>A</sub>	Współczynnik podziału jonu pomiędzy polimer a roztwór
log K	Logarytm współczynnika podziału
S	Współczynnik selektywności wobec pary jonów
log S	Logarytm współczynnika selektywności
V <sub>max</sub>	Maksymalna zmiana objętości polimeru w temperaturze powyżej VPTT [cm <sup>3</sup> /g suchego polimeru]
Aktywność	Aktywność enzymu natywnego [U] Aktywność enzymu immobilizowanego na jednostkę objętości nośnika [U/cm <sup>3</sup> ]
Aktywność specyficzna	Aktywność enzymu natywnego na jednostkę masy białka [U/mg] Aktywność enzymu immobilizowanego na jednostkę masy związanego białka [U/mg]
Wydajność immobilizacji (białko)	Stosunek stężenia białka związanego do stężenia białka wyjściowego [%]
Wydajność immobilizacji (aktywność)	Stosunek aktywności immobilizowanego białka do aktywności oczekiwanej dla danego nośnika [%]
Stabilność	Stosunek aktywności preparatu po immobilizacji do aktywności preparatu po miesiącu przechowywania [%]



## 1. PRZEGLĄD LITERATURY

### 1.1 Polimery usieciowane

Polimery – makrocząsteczki zbudowane z jednostek zwanych merami, powstają w reakcji polimeryzacji, polikondensacji lub poliaddycji. W wyniku reakcji monomerów dwufunkcyjnych powstają liniowe polimery, natomiast podczas reakcji trój- i wielofunkcyjnych monomerów powstają polimery przestrzennie usieciowane. Polimery będące przedmiotem pracy to usieciowane polimery winylowo-diwinylowe otrzymywane w reakcji kopolimeryzacji wolnorodnikowej z sieciowaniem. Sieci polimerowe wykazują zwykle duże odchylenia od właściwości sieci idealnych. Odchylenia te mogą być spowodowane niepełnym przereagowaniem grup funkcyjnych, tworzeniem pętli wewnątrzcząsteczkowych i trwałymi splątaniem łańcuchów polimeru. Ponadto rozkład wiązań sieciujących może być niejednorodny ze względu na różną reaktywność grup funkcyjnych komonomerów. Po wyczerpaniu się reaktywniejszego monomeru lub znajdującego się w układzie polimeryzującym w małych ilościach, pozostałe monomery tworzą liniowe łańcuchy. Do najczęściej stosowanych monomerów sieciujących zaliczamy: diwinylobenzen (DVB) i N,N'-metylenobisakryloamid (MBA). Inne monomery sieciujące to na przykład: dimetakrylan glikolu etylenowego (EGDMA), dimetakrylan glikolu trietylenowego (TEGDMA) czy trimetakrylan 2-etylo-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiolu (TMPMA). Wyróżniamy dwa typy usieciowanych kopolimerów: żelowe i porowate. Kopolimery o strukturze żelowej są syntetyzowane z mieszaniny monomerów w nieobecności dodatkowych rozpuszczalników. Ich właściwości są funkcją stężenia monomeru sieciującego w kopolimerze. Kopolimery porowate powstają podczas polimeryzacji monomerów rozcieńczonych różnymi ilościami obojętnych rozpuszczalników. Jeżeli są to termodynamicznie dobre rozpuszczalniki i stopień usieciowania jest mały, nie wywołują one porowatości, ale zwiększają przenikalność ziaren kopolimerów. Takie kopolimery nazwano ekspandowanymi.

Rozpuszczalniki stosowane podczas polimeryzacji można podzielić na cztery grupy. Pierwsza grupa to rozpuszczalniki o dużej zdolności solwatacji

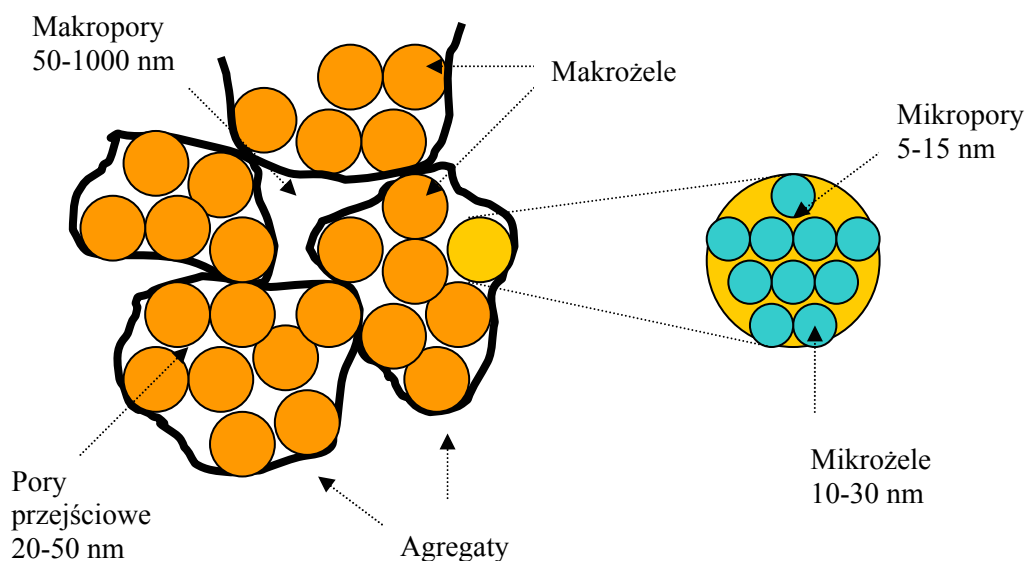
powstającego kopolimeru, do drugiej grupy zalicza się rozpuszczalniki o małej zdolności solwatacyjnej w stosunku do tworzącego się polimeru. Trzecią grupę stanowią polimery liniowe, a czwartą – mieszaniny rozpuszczalników pierwszej i drugiej grupy lub rozpuszczalników i polimeru. Porowatość kopolimerów jest również usystematyzowana i wyróżnia się jej następujące rodzaje:

- porowatość żelu, która istnieje w spęcznionych kopolimerach żelowych i ekspandowanych, wynikająca z istnienia przestrzeni międzyłańcuchowych o średnim promieniu porów poniżej 5 nanometrów,

- mikroporowatość, która obejmuje pory między mikrożelami o wymiarach 5-15 nanometrów i pory przejściowe o promieniu 20-50 nanometrów,

- makroporowatość, która wynika z obecności porów pomiędzy makrożelami i aglomeratami o wymiarach powyżej 50 nanometrów [1].

Opisane rodzaje porowatości przedstawiono schematycznie na rysunku 1.



Rysunek 1 Schemat struktury porowatej kopolimerów [1]

Podsumowanie prac na temat syntezy makroporowatych polimerów winylowo-diwinylowych zamieszczono w [2].

Polimery usieciowane są nierozpuszczalne i mają zwiększoną odporność chemiczną i termiczną w porównaniu z odpowiednimi polimerami liniowymi.

Polimeryzacja suspensyjna [1,3,4] przebiega w kroplach monomeru zdyspergowanego w nie mieszającej się z nim cieczy. W wyniku polimeryzacji krople monomeru stają się stałymi cząstkami polimeru, zwanymi granulkami lub perełkami. Aby zdyspergowany monomer i powstająca dyspersja polimeru były stabilne, niezbędne jest energiczne mieszanie układu reakcyjnego oraz stosowanie stabilizatorów utrudniających łączenie się kropeł i powstających z nich cząstek.

Faza rozpraszająca to najczęściej woda, a stabilizatorami są rozpuszczalne w niej polimery, np. poli(alkohol winylowy), skrobia, żelatyna, pochodne celulozy, sole poli(kwasu akrylowego) i poli(kwasu metakrylowego). Stabilizatory tworzą cienkie błonki wokół kropeł i reagujących cząstek. Stabilizatory zawierające fragmenty hydrofilowe i hydrofobowe (np. niektóre gatunki poli(alkoholu winylowego), zawierające bloki nie zhydrolizowanego poli(octanu winylu) lub blokowe kopolimery tlenku etylenu i tlenku propylenu) są najbardziej korzystne, ponieważ mogą szybko i trwale wiązać się z cząstkami organicznymi. Stabilizatory stanowią na ogół nie więcej niż 1% masy mieszaniny reakcyjnej. Dla zmniejszenia rozpuszczalności monomerów hydrofilowych w wodzie, do fazy wodnej dodawane są sole nieorganiczne (np.: chlorek wapnia, chlorek sodu).

Średnica kropeł: po rozpoczęciu procesu syntezy średnice kropeł znacznie się zmieniają i dopiero po upływie pewnego czasu ich średni wymiar ustala się. Im bardziej intensywne mieszanie, tym bardziej rozdrobniona i jednolita staje się powstająca dyspersja. Na wymiary kropeł istotny wpływ mają:

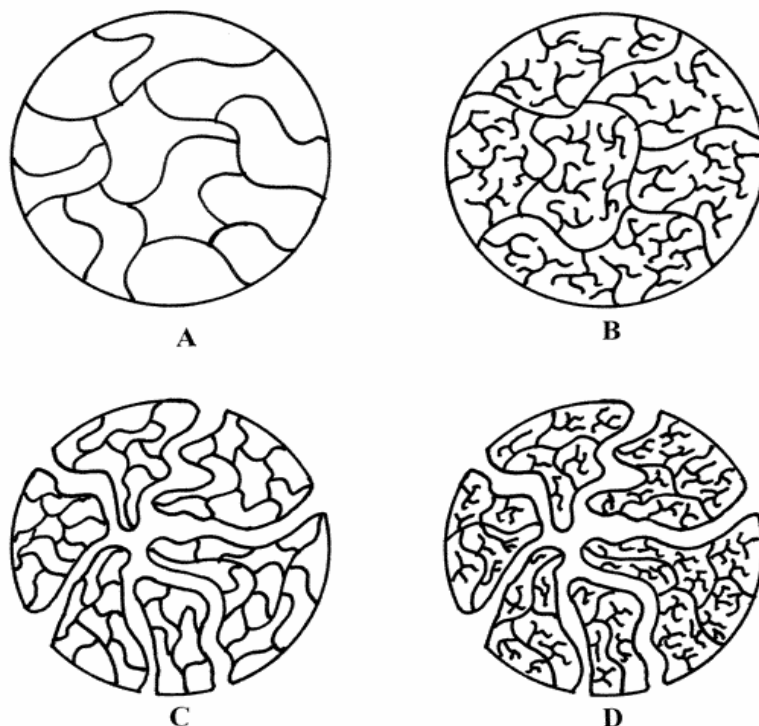
- napięcie powierzchniowe na granicy faz ,
- gęstość środowiska,
- objętość fazy rozpraszającej,
- geometryczne parametry charakteryzujące reaktor i mieszadło.

Po zainicjowaniu polimeryzacji krople monomeru przekształcają się w cząstki polimerowo-monomerowe. Powstaje polimer, dzięki któremu układ nie ma już właściwości cieczy. Na początku cząstki takie mogą łączyć się lub ulegać rozdrobnieniu. Wraz ze wzrostem stopnia konwersji i lepkości mieszaniny reakcyjnej wymiana masy między cząstkami jest coraz trudniejsza, a gdy konwersja monomeru osiąga poziom około 60-70% staje się całkowicie

niemożliwa. W tym momencie zostaje osiągnięte stadium krytyczne, które ostatecznie określa kształt i rozkład wymiarów cząstek dyspersji polimerowej. W końcowym etapie syntezy polimeryzacja przebiega wewnątrz ukształtowanych cząstek, z wykorzystaniem zawartego tam monomeru [4-6].

Metodą polimeryzacji suspensyjnej syntetyzowano między innymi żywice poli(diwinylobenzenowe) o różnej porowatości wynikającej z obecności mieszanin różnych rozpuszczalników podczas polimeryzacji. Zastosowano mieszaniny toluenu i następujących oligomerów: glikolu polipropylenowego 1000 i 4000 oraz polidimetylosiloksanu [7]. Otrzymano polimery charakteryzujące się różną porowatością, co wynikało z obecności oligomerycznych i polimerowych środków porotwórczych. W obecności toluenu otrzymano żywice mikroporowate o dużej powierzchni właściwej wynoszącej około 650 [m<sup>2</sup>/g], natomiast w obecności oligomerycznych i polimerowych porogów otrzymano żywice makroporowate o małej powierzchni właściwej wynoszącej około 15-50 [m<sup>2</sup>/g]. Wpływ rozpuszczalników na porowatość opisano także w [8,9]. Badano wpływ mieszaniny heptanu i toluenu w różnych stosunkach molowych na porowatość kopolimeru styrenu i metakryloamidu usieciowanego diwinylobenzenem [8] oraz wpływ mieszanin: toluen – 2-butanon, n-heptan – 2-butanon w różnych stosunkach molowych na porowatość kopolimerów styrenu i metakryloamidu, styrenu i kwasu metakrylowego oraz styrenu i akrylonitrylu usieciowanych diwinylobenzenem [9]. W literaturze opisano również syntezę rozgałęzionych żelowych i porowatych kopolimerów styrenu i diwinylobenzenu o różnej zawartości środka sieciującego (rysunek 2), jako czynnika przenoszącego łańcuch użyto dodekanotolu [10]. Rozgałęzione żywice żelowe syntetyzowano w obecności 1-10% diwinylobenzenu i odpowiednio 1-15% dodekanotolu. Chłonność żywicy polimeryzowanej w obecności 10% diwinylobenzenu i 15% dodekanotolu wynosiła 8,5 ml toluenu na gram suchego polimeru, wartość ta była dwukrotnie większa w porównaniu z chłonnością nierozgałęzionego kopolimeru styrenu i diwinylobenzenu o stopniu usieciowania 2% i około sześciokrotnie większa w porównaniu z chłonnością nierozgałęzionego kopolimeru styrenu i diwinylobenzenu o stopniu usieciowania 10%. W przypadku syntezy porowatych kopolimerów w obecności dodekanotolu otrzymano żywice o znacznie mniejszej powierzchni właściwej. Powierzchnia właściwa polimeru

zawierającego 60% diwinylobenzenu zmniejszyła się z około 550 [m<sup>2</sup>/g] do poniżej 5 [m<sup>2</sup>/g] przy zawartości dodekanotolu powyżej 5%.



**Rysunek 2 Schemat budowy żywicy żelowej (A), żelowej – rozgałęzionej (B), porowatej (C) i porowatej – rozgałęzionej (D) [10]**

Inne polimery suspensyjne to na przykład kopolimer styrenu i dimetakrylanu glicerolu [11], kopolimer metakrylanu glicydylu zmodyfikowanego ligandem zawierającym pirazol i dimetakrylanu glikolu etylenowego [12]. Z kolei Frechet i współpracownicy syntetyzowali hydrofilowe kopolimery suspensyjne metakrylanu glikolu polietylenowego i dimetakrylanu glikolu etylenowego [13], metakrylanu *tert*-butylu i dimetakrylanu glikolu etylenowego [14] czy metakrylanu hydroksyetylu i dimetakrylanu glikolu etylenowego [14]. Metodą polimeryzacji suspensyjnej można również otrzymywać polimery z odciskami molekularnymi. W tym celu do mieszaniny reakcyjnej dodaje się związek stanowiący matrycę odcisku, który po skończonej reakcji polimeryzacji jest wymywany z produktu. Zhang i współpracownicy opisali syntezę kopolimeru 2-winylopirydyny i kwasu 2-akryloamido-2-metylosulfonowego usieciowanego trimetakrylanem trimetylolopropanu z odciskiem molekularnym tyrozyny, który był stosowany

jako selektywny sorbent [15]. Lai i współpracownicy syntetyzowali kopolimery kwasu akrylowego usieciowanego dimetakrylanem glikolu etylenowego z odciskami 4-aminopirydyny [16].

Kolejną grupą polimerów możliwych do otrzymania metodą polimeryzacji suspensyjnej są polimery termoczułe. Na temat syntezy w suspensji takich termoczułych polimerów usieciowanych znaleziono tylko trzy prace [17-19], wszystkie dotyczą syntezy metodą odwróconej polimeryzacji suspensyjnej, co oznacza, że monomery i inicjator znajdowały się w fazie wodnej rozproszonej w fazie organicznej stanowiącej fazę ciągłą. W pracy [17] opisano syntezę poliNIPAAm usieciowanego N,N'-metylenobisakryloamidem oraz kopolimeru NIPAAm z metakryloamidem usieciowanego również MBA. Jako stabilizatora suspensji użyto kopolimeru blokowego ABA, gdzie A to kwas poli(hydroksystearynowy), a B to poli(tlenek etylenu). Fazę ciągłą stanowił heptan, inicjatorem reakcji był nadsiarczan potasu, który dodano do fazy wodnej zawierającej monomery. Polimeryzację prowadzono przez 12 godzin w temperaturze 70°C, otrzymany produkt oczyszczono przez odwirowanie heptanu i przemycie wodą. Ni i współpracownicy [18] syntetyzowali kopolimer NIPAAm i metakrylanu 2-hydroksyetylu usieciowany N,N'-metylenobisakryloamidem. Stabilizatorami suspensji były span 40 i span 80, fazę ciągłą stanowił cykloheksan. Reakcja była inicjowana w fazie wodnej za pomocą nadsiarczanu amonu i N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy. Przez pierwszą godzinę polimeryzacji stopniowo zwiększano temperaturę z 22 do 72°C, a następnie reakcję prowadzono przez 6 godzin w temperaturze 72°C. Otrzymany produkt oczyszczono acetonem i wodą. Praca [19] dotyczy syntezy magnetycznych nanocząstek o składzie: NIPAAm, Igepal CO-520, MBA, ferrofluid. Stabilizatorem suspensji był span 60. Reakcję polimeryzacji zainicjowaną przez nadsiarczan amonu i N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminę prowadzono przez 22 minuty, przy czym tylko przez pierwsze 2 minuty układ mieszano. Produkt oczyszczano acetonem, metanolem i wodą.

### 1.1.1 Zastosowanie polimerów usieciowanych – polimery specjalne

Polimery specjalne to polimery małotonażowe o specjalnych właściwościach znajdujące zastosowanie w różnych dziedzinach techniki.

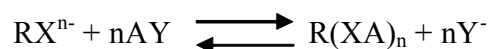
Szczególną grupą tych polimerów są polimery usieciowane. W zastosowaniach przemysłowych, w ochronie środowiska czy w analizie chemicznej istotną ich cechą jest możliwość wielokrotnego użycia, wynikająca z ich nierozpuszczalności.

Polimery usieciowane stosuje się jako sorbenty. Zastępuje one węgle aktywne i mają nad nimi tę przewagę, że łatwo ulegają regeneracji za pomocą organicznych rozpuszczalników. Odzyskują wtedy pierwotne właściwości sorpcyjne i nie wymagają dodatkowej aktywacji. Do niespecyficznych sorbentów polimerowych zalicza się kopolimery styrenu i diwinylobenzenu. Najbardziej znane to Amberlite XAD (Rohm & Haas Co.). Sorbenty specyficzne to kopolimery EGDMA i estrów akrylowych. Polimerowe sorbenty stosuje się przy zatażeniu związków organicznych, znajdujących się w śladowych ilościach w wodzie, dla ich odzyskiwania lub analizy [20]. Stosuje się je również do rozdziału związków organicznych, np. kwasów, fenoli i ich pochodnych [21]. W przemyśle służą między innymi do oczyszczania wód ściekowych [22], roztworów cukrów od barwnych zanieczyszczeń. Sorbenty stosuje się także jako wypełnienia kolumn chromatograficznych [3].

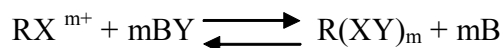
Polimery usieciowane stosuje się także jako wymiennicze jonowe. Wymiana jonów jest odwracalna i stechiometryczna, ale procesowi temu towarzyszą reakcje uboczne, przeważnie niestechiometryczne, a cały proces nazywany jest sorpcją [3,23].

Podstawowe reakcje wymiany jonowej:

- Wymiana kationów



- Wymiana anionów



gdzie:  $R$  – sieć polimerowa,  $X$  – trwale związane z siecią grupy jonocenne,  $A/B$  – ruchliwe kationy, tzw. przeciwjony grup jonocennych kationitu lub współjony grup jonocennych anionitu,  $Y$  – ruchliwe aniony,  $n/m$  – odpowiednie wartościowości kationitu i anionitu.

Polimer, w którym integralną część sieci stanowią wbudowane elektroujemne grupy jonocenne i który ma zdolność wiązania ruchliwych

---

przeciwjonów – kationów z roztworu jest kationem. Sieć polimerowa jest wówczas anionem. W przypadku anionitów mamy do czynienia z odwrotną sytuacją. Najważniejsze kationity mające znaczenie użytkowe to:

- słabo kwasowe z grupami: -OH (fenolowa), -COOH, -SH,
- silnie kwasowe z grupami: -SO<sub>3</sub>H, -PO(OH)<sub>2</sub>.

Najważniejsze anionity:

- słabo zasadowe z grupami: -NH<sub>2</sub> (aromatyczne i alifatyczne),
- średnio zasadowe z grupami: =NH, -NR<sub>2</sub>,
- silnie zasadowe z grupami: -N(R)<sub>3</sub><sup>+</sup>OH<sup>-</sup>.

Najważniejsze właściwości jonitów żelowych to:

- stężenie grup jonowymiennych (tzw. zdolność wymienna) [mmol/g suchego polimeru] lub [mmol/ml spęcznionego jonitu],
- pęcznienie.

W przypadku jonitów o strukturze porowatej ich właściwości opisują ponadto parametry charakterystyczne dla sorbentów:

- porowatość,
- objętość porów,
- powierzchnia właściwa.

Jonity o strukturze porowatej mają mniejszą pojemność wymienną i pęcznienie, ale lepszą kinetykę sorpcji. Dla wszystkich jonitów charakterystyczną właściwością jest rodzaj i stopień dysocjacji grup jonoczynnych [3].

Jonity mają zastosowanie przemysłowe między innymi do uzdatniania wody [24], do odsalania soków cukrowiczych i ich odbarwiania [25], do stabilizacji i odkwaszania win [26], odzyskiwania kwasu winowego, wydzielania kwasu cytrynowego i mlekowego [3]. W literaturze opisano wiele polimerów z ligandami fosfonowymi [27-34], fosfinowymi [35-38], karboksylowymi [34], sulfonowymi [27,28,30,33,35].

Jonity kompleksujące charakteryzują się wybiórczą zdolnością sorpcji jednego jonu lub grupy jonów wobec innych. Tworzą one kompleksy (chelaty) z metalami przez ligandy wbudowane do sieci polimerowej, a stężenie skompleksowanego metalu można oszacować na podstawie intensywności



zabarwienia, jeżeli kompleks absorbuje światło w zakresie widzialnym [3,39]. Ligandy mogą być wprowadzane na drodze kopolimeryzacji monomerów funkcjonalnych (monomery winyloaromatyczne jak: winyloimidazole, winylopirazole i winylopirydiny, monomery winyloalifatyczne jak: dialliloaminy, winyloaminy oraz monomery akrylowe i metakrylowe oraz ich pochodne), modyfikowania kopolimerów mających grupy reaktywne, polimeryzacji monomerów zawierających ligandy w sieci kopolimerów (interpolimeryzacja, kopolimeryzacja szczepiona chemicznie lub radiacyjnie) lub immobilizacji hydrofobowych chelatujących ekstrahentów podczas polimeryzacji lub po polimeryzacji. Najważniejszą metodą otrzymywania kompleksujących jonitów jest modyfikowanie kopolimerów styrenu i diwinylobenzenu lub metakrylanu glicydylu i dimetakrylanu glikolu etylenowego. Jonity kompleksujące stosuje się w analityce i odzyskiwaniu cennych metali z rud, szlamów i wód morskich oraz ściekowych [3,40].

Jonity są również stosowane jako katalizatory kwasowe i zasadowe, najnowocześniejsze katalizatory polimerowe posiadają immobilizowane kompleksy metali [41].

Polimery specjalne są również powszechnie stosowane jako nośniki substancji biologicznie czynnych. Do przyłączania białek wykorzystuje się właściwości adsorpcyjne nośnika, wiązania jonowe i kowalencyjne z grupami reaktywnymi nośników. Najczęściej są to kopolimery akrylowe usieciowane dimetakrylanem glikolu etylenowego. Nośniki substancji biologicznie czynnych zostaną omówione w rozdziale o immobilizacji enzymów.

Nośniki polimerowe znalazły także zastosowanie w chromatografii powinowactwa, w której wykorzystywane jest specyficzne oddziaływanie zachodzące pomiędzy substancją biologicznie czynną a ligandem unieruchomionym na nośniku [42,43].

Hydrożele, czyli materiały charakteryzujące się bardzo dużym pęcznieniem w wodzie, otrzymywane z monomerów hydrofilowych (akryloamid i jego pochodne, kwas akrylowy) i usieciowane hydrofilowym środkiem – N,N'-metylenobisakryloamidem znalazły zastosowanie jako materiały powszechnego użytkowania i specjalne. Do pierwszej grupy zaliczamy między innymi materiały higieny osobistej, „superabsorbenty” do uszczelniania w górnictwie, wierceniach geologicznych, budownictwie, fortyfikacjach gruntów przy pracach ziemnych,

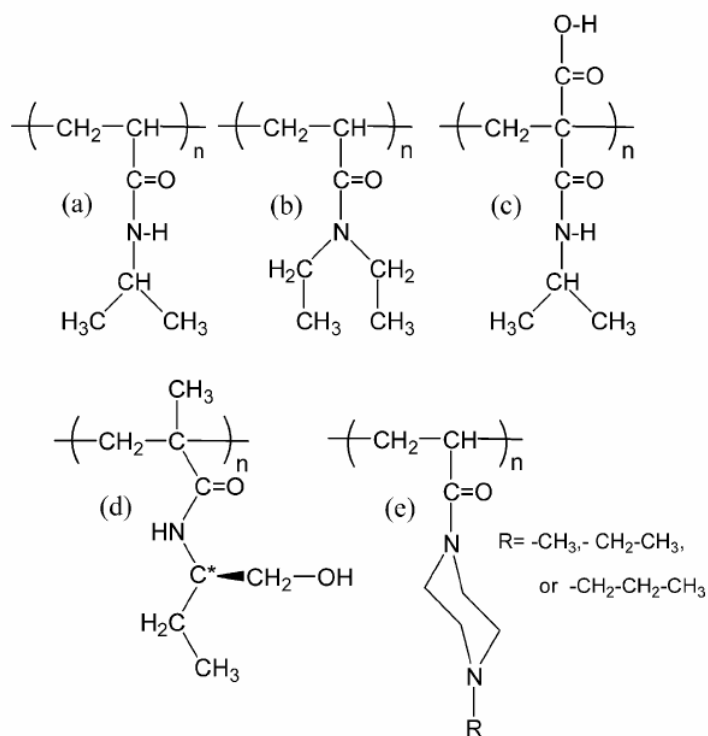
a także preparaty do granulacji materiałów pylistych i pasz, gaszenia ognia i transportu palnych płynów. Specjalne hydrożele to opatrunki przy leczeniu oparzeń i uszkodzeń skóry, szkła kontaktowe, nośniki do kontrolowanego uwalniania leków, immobilizacji enzymów, materiały chromatograficzne oraz membrany do różnych zastosowań [3,44].

## 1.2 Termoczule polimery

Żele polimerowe reagujące skokowymi zmianami na niewielkie bodźce ze środowiska zewnętrznego nazywane są czasem ‘inteligentnymi polimerami’ [45-49]. Polimery takie odpowiadają na niewielkie zmiany temperatury, pola elektrycznego, pH roztworu itd. Na poziomie mikrostruktury zmiany te powodują zmianę charakteru powierzchni z hydrofilowej na hydrofobową i na odwrót, natomiast zmiany makroskopowe to wytrącenie z roztworu w przypadku liniowych kopolimerów, gwałtowna zmiana objętości w przypadku kopolimerów usieciowanych, a także zmiany zawartości wody w przypadku hydrożeli [47]. Wrażliwość na bodźce jest powszechną cechą biopolimerów znajdujących się w organizmach żywych. Na podstawie obserwacji tych oddziaływań powstała idea stworzenia syntetycznych analogów biopolimerów, których wrażliwość można by kontrolować [49]. Wrażliwe polimery „rozpoznają” bodziec jako sygnał do gwałtownej zmiany swoich właściwości fizycznych lub chemicznych, a ponadto odpowiedź na dany bodziec jest proporcjonalna do jego intensywności. Wśród bodźców stymulujących polimery wyróżniamy czynniki fizyczne takie jak: temperatura, pole elektryczne i magnetyczne, oddziaływania mechaniczne oraz czynniki chemiczne takie jak: pH, siła jonowa, oddziaływanie z cząsteczkami związków chemicznych. Polimery mogą być wrażliwe na jeden lub kilka bodźców jednocześnie. Do najczęściej wykorzystywanych polimerów wrażliwych należą polimery termoczule, ze względu na stosunkowo łatwy sposób kontrolowania bodźca, jak i możliwość stosowania ich w testach *in vitro* i *in vivo*. Najczęściej wykorzystywane formy polimerów to usieciowane lub odwracalne hydrożele, micelle lub zmodyfikowane powierzchnie [49].

Polimery termoczule charakteryzują się krytyczną temperaturą rozpuszczalności (*critical solution temperature* – CST), to jest temperaturą, w której układ polimer-rozpuszczalnik ulega przemianie fazowej. Jeżeli poniżej temperatury CST układ polimer-rozpuszczalnik jest jednofazowy, natomiast powyżej dochodzi do separacji faz, wówczas mamy do czynienia z układem, który charakteryzuje się dolną krytyczną temperaturą rozpuszczalności (*lower critical solution temperature* – LCST). W sytuacji odwrotnej układ charakteryzuje się górną krytyczną temperaturą rozpuszczalności (*upper critical solution*

*temperature* – UCST). W większości zastosowań wykorzystuje się polimery rozpuszczalne w wodzie i posiadające dolną krytyczną temperaturę rozpuszczalności, do grupy tej zaliczamy między innymi poli(N-podstawione akryloamidy), przy czym podstawnikami mogą być na przykład grupy izopropylowe (rysunek 3a) [50], dietylowe (rysunek 3b) [51] czy 2-karboksyizopropylowe (rysunek 3c) [52], poli(N-akryloilo-N'-alkilopiperazyne) (rysunek 3e) [53,54], poli(N-winyloizobutyloamid) [55] czy poli(winylometrylo eter) [56]. Polimerem wrażliwym na temperaturę oraz aktywnym optycznie jest poli(N-(L)-(1-hydroksymetylo)propylometakryloamid (rysunek 3d) [57].



**Rysunek 3** Polimery charakteryzujące się dolną krytyczną temperaturą rozpuszczalności (LCST) [49]

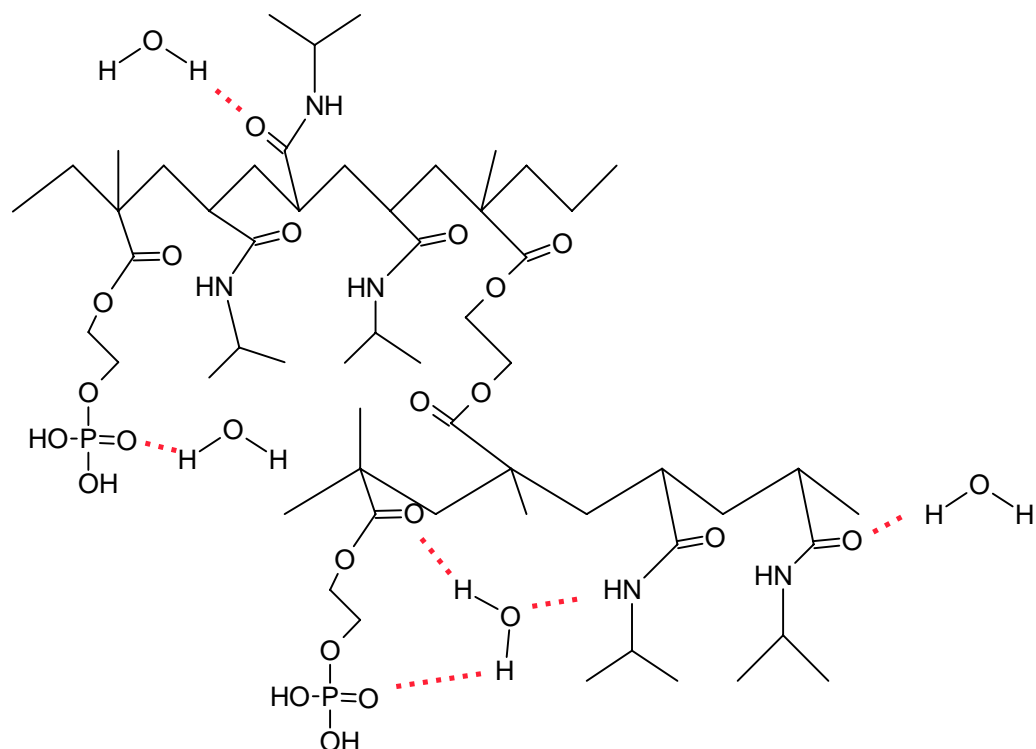
Amfifilowe kopolimery blokowe charakteryzują się wrażliwością na temperaturę micelizacją oraz tworzą hydrożele powyżej krytycznej temperatury żelowania [58]. Kopolimer blokowy poli(tlenku etylenu) i poli(tlenku propylenu) (PEO-PPO-PEO) w temperaturze około 36°C przechodzi z zolu w żel, natomiast w temperaturze około 50°C z żelu w zol [59]. Wśród naturalnych polimerów wrażliwość na temperaturę wykazują na przykład żelatyna [60] czy agaroz [61].

Polimery te żelują w roztworach wodnych podczas obniżania temperatury, łańcuchy tworzą struktury helikalne, które oddziaływując między sobą powodują fizyczne sieciowanie polimerów.

N-izopropylakryloamid (NIPAAm) jest najczęściej wykorzystywanym monomerem do syntezy termoczułych polimerów. Jego historia sięga lat pięćdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy Sprecht wraz z współpracownikami uzyskali patenty: amerykański i brytyjski [62-64]. Właściwości roztworów poli(N-izopropylakrylamidu) oznaczanego w skrócie jako poli(NIPAAm), zostały opisane między innymi w 1968 roku przez Heskins'a i Guillet'a [65]. W 1986 roku Pelton opublikował raport na temat syntezy poli(NIPAAm) [45]. W 1992 roku Schild opracował przegląd literatury dotyczącej syntezy i zastosowania poli(NIPAAm) w latach 1956-1991 [50]. Od tej pory liczba publikacji dotyczących syntezy, charakterystyki i zastosowań termoczułych hydrożeli opartych na NIPAAm sukcesywnie rosła.

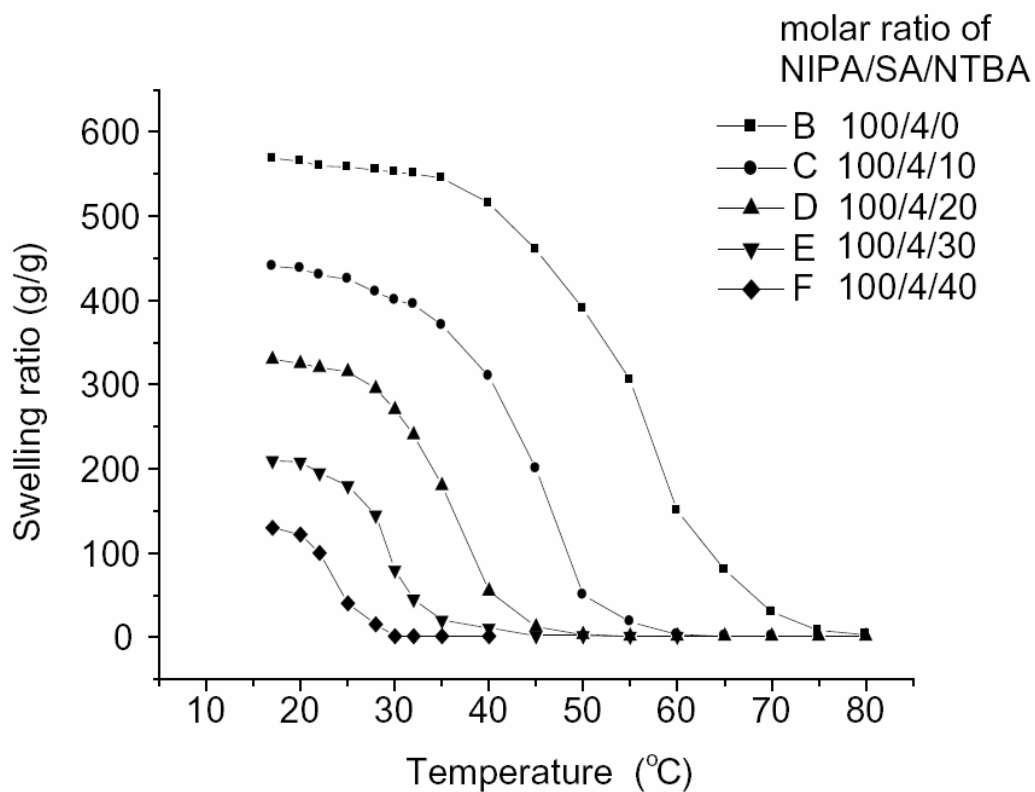
Konformacja makrocząsteczki w roztworze jest wynikiem oddziaływań polimer-rozpuszczalnik i polimer-polimer. W dobrym rozpuszczalniku dominują oddziaływania polimer-rozpuszczalnik, cząsteczki rozpuszczalnika solwują łańcuchy, a oddziaływania pomiędzy segmentami polimeru są bardzo słabe. W złym rozpuszczalniku następuje agregacja segmentów polimeru, w wyniku której łańcuchy zbliżają się do siebie silnie ze sobą oddziałując i tworzą zwarty kłębek [66].

Poli(N-izopropylakryloamid), dla którego LCST wynosi około 30-33°C, jest polimerem o stosunkowo prostej budowie opartej na hydrofobowym szkielecie z silnie hydrofilowymi grupami amidowymi (-CONH<sub>2</sub>) podstawionymi hydrofobowymi grupami izopropylowymi. Wrażliwość na temperaturę związana jest z równowagą hydrofobowo-hydrofilową łańcuchów polimeru. W temperaturze poniżej LCST dominują oddziaływania hydrofilowe, pomiędzy grupami amidowymi i cząsteczkami wody tworzą się wiązania wodorowe (rysunek 4), liniowe polimery są rozpuszczalne w wodzie, natomiast powyżej tej temperatury następuje zwiększenie oddziaływań hydrofobowych, zerwanie wiązań wodorowych i wykluczenie wody z kłębków polimerowych, co w konsekwencji powoduje nierozpuszczalność polimeru w roztworach wodnych [50,66].



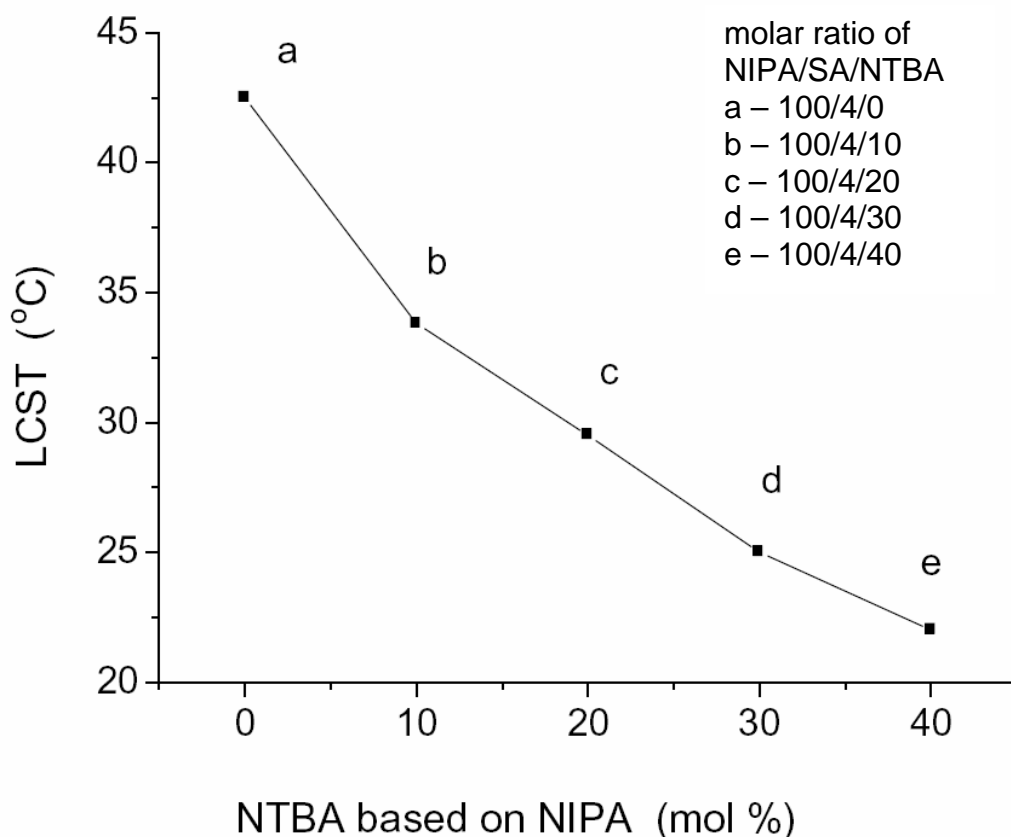
Rysunek 4 Schematyczne przedstawienie oddziaływań polimeru z cząsteczkami wody na przykładzie kopolimeru *N*-izopropylakryloamid i metakryloilo(oksyetylo) fosforanu usieciowanego dimetakrylanem glikolu etylenowego

Usieciowane polimery NIPAAm reagują zmianą objętości na zmiany temperatury otoczenia, kurczą się lub pęcznią odpowiednio powyżej i poniżej temperatury, zwanej w tym przypadku objętościową temperaturą przemiany fazowej (*volume phase transition temperature* - VPTT). Zjawiska zachodzące podczas zmian temperatury są intensywnie badane i opisywane np. w [67-74]. W pracy [67] opisano metodę konfokalnej mikroskopii skaningowej (*laser scanning confocal microscopy* – LSCM) pozwalającą na bezpośrednią obserwację wewnętrznej struktury żeli poliNIPAAm na przykładzie NIPAAm usieciowanego metylenobisakryloamidem. Techniki PMR [68] i NMR [69] wykorzystano do obserwacji liniowego poli(NIPAAm) w temperaturze LCST. Ni i Zhua na przykładzie terpolimeru NIPAAm, *N-tert*-butyloamidu (NTBA) i akrylanu sodu (SA) o różnym składzie, usieciowanym diakrylanem glikolu tetraetylenowego badali chłonność wody w zależności od temperatury [73]. Wyniki dla kopolimerów różniących się zawartością monomeru NTBA przedstawiono na rysunku 5. Im większa zawartość hydrofobowego NTBA tym mniejsza chłonność wody w temperaturze poniżej VPTT.



Rysunek 5 Zależność chłonności od temperatury dla hydrożeli o różnej zawartości NTBA [73]

Wprowadzenie do polimeru grup hydrofilowych lub kopolimeryzacja termoczułego monomeru z hydrofilowymi monomerami powoduje, że zmniejsza się ilość grup hydrofobowych i jednocześnie polimer jest bardziej hydrofilowy. W konsekwencji naładowane grupy na powierzchni polimeru silniej oddziałują z cząsteczkami wody, co prowadzi do podwyższenia temperatury LCST [70, 75,76]. Komonomery hydrofobowe obniżają temperaturę LCST (rysunek 6) [73].

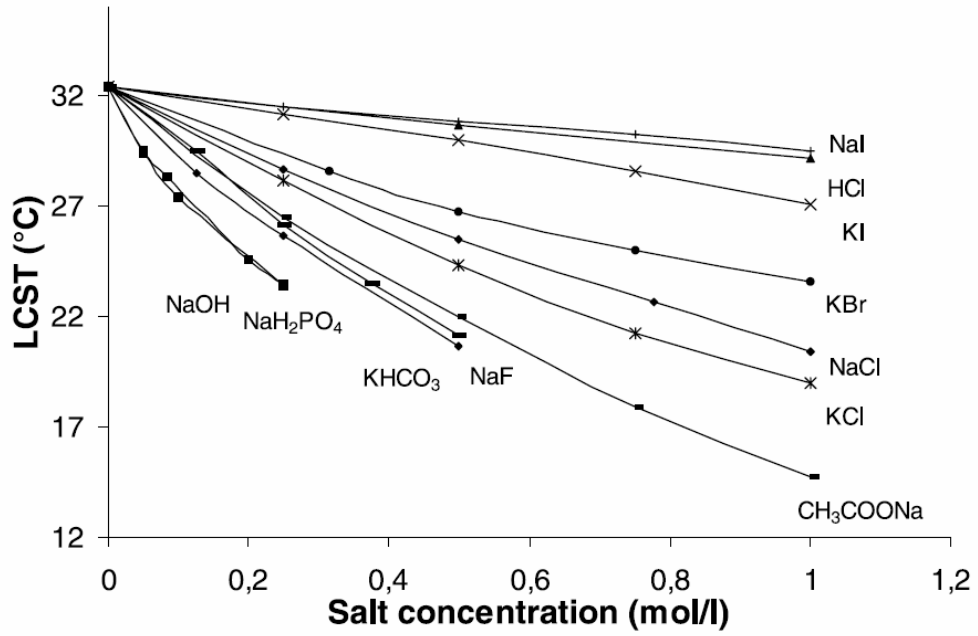


Rysunek 6 Wpływ ilości NTBA na LCST żelu [73]

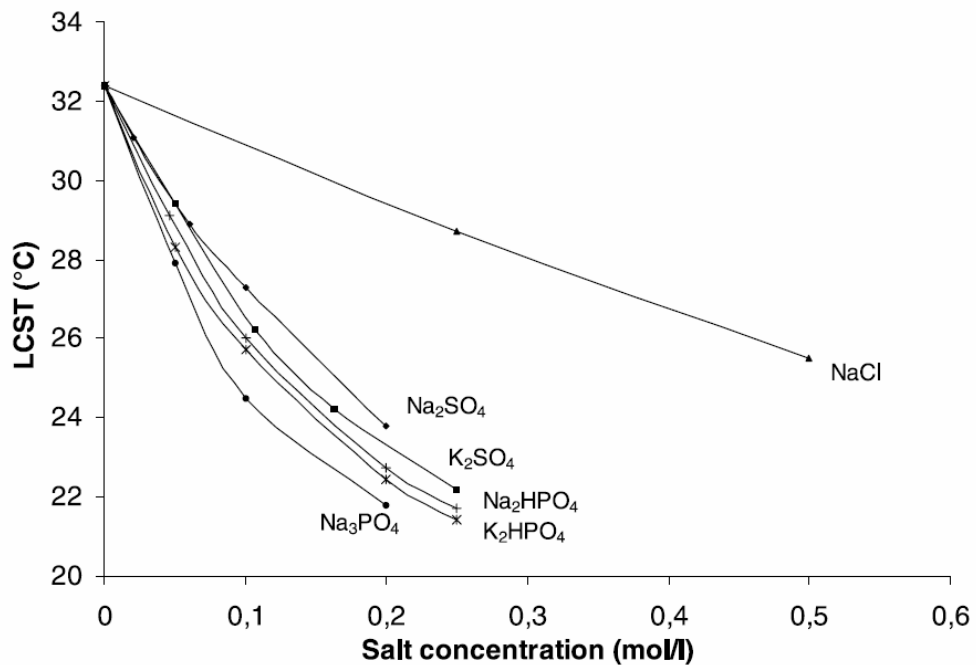
Na kurczenie hydrożeli mają wpływ między innymi sole. W przypadku polielektrolitów zmiana stężenia soli w roztworze wpływa głównie na oddziaływania jonowe stabilizujące makrocząsteczkę. Proces ten jest związany ze zmianą siły jonowej roztworu. Jeżeli mamy do czynienia z żelem niejonowym, wówczas zwiększenie stężenia soli wpływa na między- i wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, oddziaływania polarne oraz hydrofobowe. Pomimo przeprowadzonych wielu badań, mechanizm wywołujący zmiany hydrodynamicznych właściwości pozostaje nieznany. Jest to spowodowane faktem, że w każdym przypadku oddziaływania polimer – sól mamy do czynienia również z wodą, jako rozpuszczalnikiem. Taki układ dąży do zminimalizowania energii swobodnej zarówno poprzez dynamiczne zmiany konformacji polimeru, jak i zmiany struktury wody przy określonych stężeniach soli [77]. Niewielkie ilości soli powodują obniżenie temperatury LCST (VPTT). Oprócz stężenia istotne znaczenie mają również typ soli oraz wartościowość anionu. W pracy [78]



opisano wpływ różnych soli na LCST poli(NIPAAm), wyniki przedstawiono na poniższych rysunkach 7 i 8.



Rysunek 7 Wpływ jednowartościowych soli na LCST poli(N-izopropylakrylamidu) [78]

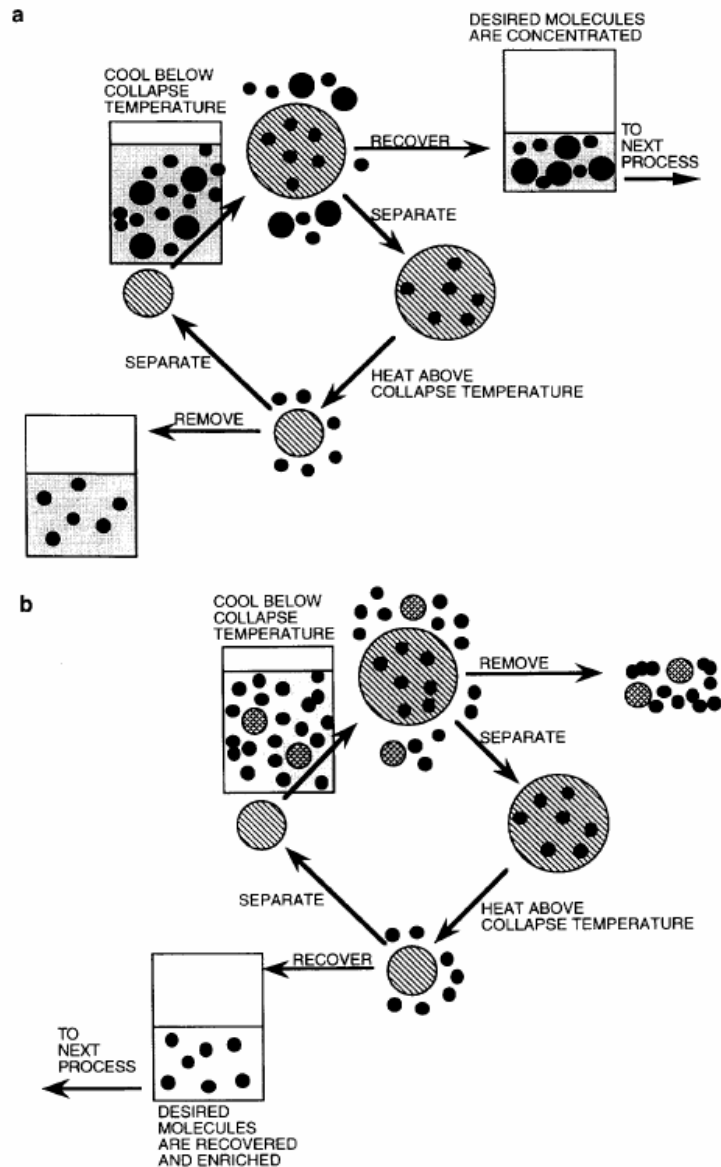


Rysunek 8 Wpływ wielowartościowych soli na LCST poli(N-izopropylakrylamidu) [78]

Największy wpływ na poli(NIPAAm) wywiera fosforan sodu. Stężenie soli 0,2M powoduje obniżenie temperatury LCST o blisko 10°C. Sole metali dwu- i trójwartościowych wywierają większy wpływ na LCST w porównaniu z solami metali jednowartościowych. Efekt wysalania można tłumaczyć zmianami w strukturze wody w otoczce hydratacyjnej polimeru oraz zmianami w oddziaływaniach pomiędzy polimerem a rozpuszczalnikiem w obecności soli. Elektrolit może zaburzyć wysoce uporządkowaną strukturę cząsteczek wody otaczających polimer. Powoduje to wzrost hydrofobowości łańcuchów polimeru, co w rezultacie powoduje obniżenie LCST [66,78].

### **1.2.1 Zastosowanie termoczułych polimerów**

Zmiany zachodzące pod wpływem temperatury w obrębie fazy polimerowej mogą być wykorzystane w wielu dziedzinach współczesnej chemii i technologii, czego przykładem są zastosowania takich polimerów w medycynie, np. kontrolowane uwalnianie leków [51,79-90] czy nośniki białek i peptydów [58,91,92]. W większości przypadków są to termoczułe hydrożele usieciowane głównie N'N'-metylenobisakryloamidem [79-84], a także dihydroksyetylenobisakryloamidem [85] i dimetakrylanem glikolu etylenowego [86] lub liniowe polimery poli(NIPAAm) [87-89]. Innym przykładem jest szczepienie liniowego poli(NIPAAm) na powierzchni kapsułek i sterowanie uwalnianiem leku za pomocą otwierania/zamykania porów membrany kapsułki dzięki rozkłębianiu/skłębianiu liniowego poli(NIPAAm) ze zmianami temperatury [89]. „Inteligentne polimery” są wykorzystywane ponadto w procesach separacyjnych, np. odwadnianie roztworów białek i innych wielkocząsteczkowych substancji biologicznie czynnych [51,81,93].



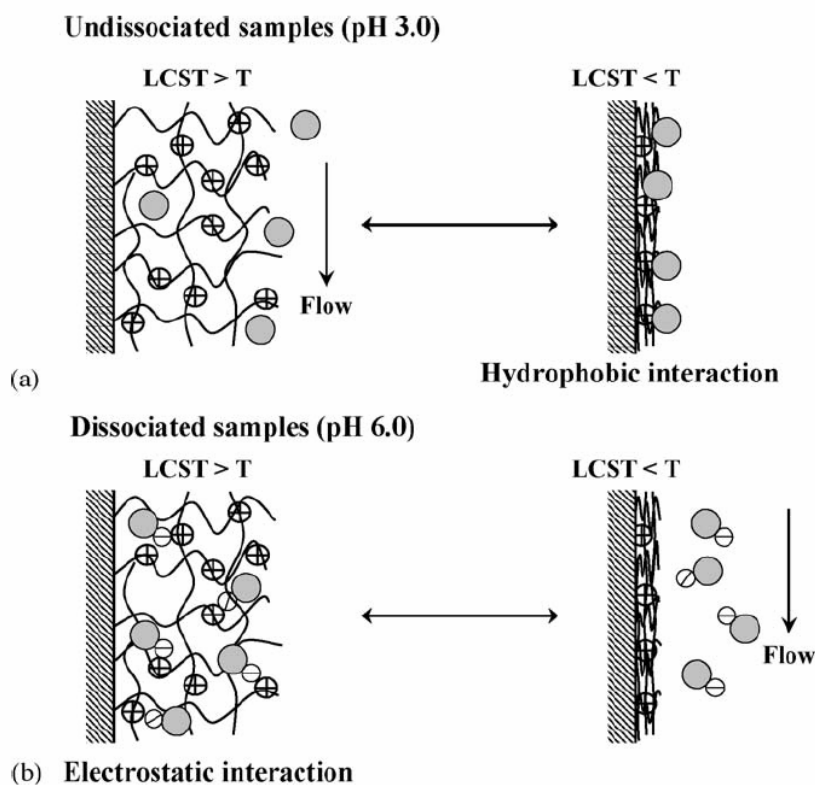
Rysunek 9 Odwadnianie roztworów białek [93]

Na rysunku 9 przedstawiono dwa schematy odwadniania roztworów białek zaproponowane przez dwie grupy badaczy. Na schemacie „a” przedstawiono metodę opracowaną w grupie kierowanej przez Cusslera [93]. Roztwór białka wylewa się na nie spęczniony żel, który w efekcie pęcznieje absorbując wodę i małącząsteczkowe związki. Następnie taki żel jest izolowany i regenerowany przez zwiększenie temperatury, co powoduje jego skurczenie i uwolnienie małącząsteczkowych związków i wody. Po regeneracji żel może być użyty ponownie.

Schemat „b” przedstawia metodę opracowaną pod kierownictwem Prausnitz’a. Ogólna zasada jest taka sama jak opisana w metodzie powyżej. Różnica polega na tym, że oprócz odwadniania roztworu istotne jest również odzyskanie konkretnych substancji. Wiąże się to z użyciem żelu, który jest selektywny w stosunku do interesującej nas substancji [93].

Fakt zmiany hydrofobowości polimerów bazujących na N-izopropylakryloamidzie wykorzystano do różnicowania oddziaływań związków organicznych takich jak steroidy i peptydy i powierzchni polimerów w funkcji temperatury. Pozwoliło to na stworzenie nowej metody chromatograficznej – *thermal responsive chromatography (TRC)*, w której eluentem jest woda. Podsumowanie prac w tej dziedzinie ukazało się niedawno w [94]. Podczas rozdzielania peptydów, białek i innych biocząsteczek unika się stosowania rozpuszczalników organicznych ze względu na ich denaturujące właściwości. Fazy stacjonarne zmodyfikowane poliNIPAAm mają właściwości hydrofilowe w niższych temperaturach i hydrofobowe powyżej temperatury LCST. Oddziaływanie eluowanych cząsteczek z materiałem wypełniającym kolumnę chromatograficzną może być zmieniane za pomocą zmian temperatury, zmniejszając lub zwiększając temperaturę obserwuje się odpowiednio zwiększenie lub zmniejszenie hydrofilowości powierzchni fazy stacjonarnej. W ten sposób prowadzono na przykład rozdział kwasów organicznych [95], steroidów i niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NSAIDs) - ibuprofenu, ketoprofenu i naproksenu [96]. Rozdział przeprowadzano na kolumnie z wypełnieniem krzemionkowym modyfikowanym kopolimerem N-izopropylakryloamidu, metakrylanu butylu i N,N-dimetyloaminopropylakryloamidu. Powierzchnia fazy stacjonarnej była wrażliwa na zmiany temperatury (hydrofilowa/hydrofobowa) i pH (naładowana/nienaładowana). Ponadto grupy jonocenne były obecne na powierzchni lub schowane pomiędzy łańcuchami, zależnie od temperatury kolumny. Selektywność separacji i czas retencji były kontrolowane jedynie niewielkimi zmianami temperatury kolumny chromatograficznej. Na rysunku 10 przedstawiono schematycznie oddziaływania pomiędzy fazą stacjonarną kolumny chromatograficznej a zdysocjowanym i niezdisocjowanym związkiem. W tym przypadku przeprowadzano rozdział NSAIDs. Podczas elucji roztworem o pH 3.0 (poniżej  $pK_a$  NSAIDs) wzrost retencji obserwowano w temperaturze powyżej LCST i był on wynikiem

oddziaływań hydrofobowych pomiędzy cząsteczkami NSAIDs a hydrofobową fazą stacjonarną. Natomiast podczas elucji roztworem o pH 6.0 (powyżej  $pK_a$  NSAIDs) retencja zwiększała się poniżej LCST i była wynikiem oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy zdysocjowanymi cząsteczkami NSAIDs i hydrofilową powierzchnią fazy stacjonarnej.



Rysunek 10 Schemat oddziaływań pomiędzy fazą stacjonarną a retentatem [96]

### 1.2.2 Termoczule jonity

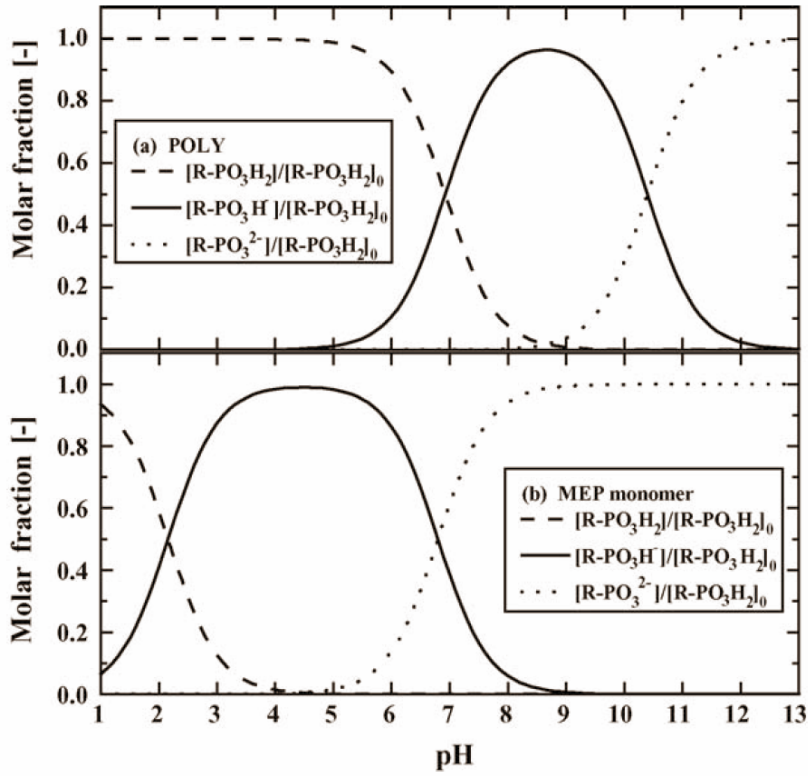
Polimery z grupami zdolnymi do wymiany jonowej lub do chelatowania metali są stosowane do oczyszczania wody i ścieków, w analizie metali oraz w ich wstępnym zatężaniu (np. metale przejściowe, lantanowce, uran i tor). Niektóre są wykorzystywane w procesach separacji metaloenzymów lub jako nośniki dla jonów metali w katalizie.

W przeciwieństwie do opisanych w rozdziale 1.1.1 polimerowych sorbentów uzyskanie nowego rodzaju polimerowych jonitów/żywic chelatujących

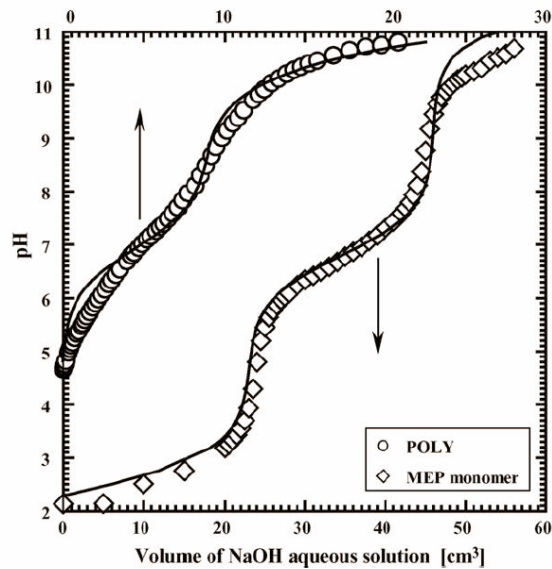
o właściwościach zależnych od temperatury jest nowym zagadnieniem w chemii polimerów. W literaturze znaleziono następujące przykłady syntezy takich polimerów i badań ich właściwości, wszystkie prace pochodzą z ostatnich kilku lat [36-38,97-107]. Część prac dotyczy liniowych kopolimerów NIPAAm zawierających grupy fosfinowe [36-38], winyloimidazolowe [97], kwasu akrylowego [97] czy iminodioctowego [97]. Na kopolimerach z grupami fosfinowymi sorbowano La(III), Nd(III), Sm(III), Cu(II), Ni(II) i Co(II) [36] w zakresie pH od 3 do 6, przy czym stężenie zaabsorbowanego metalu zwiększyło się wraz ze zwiększeniem pH i na przykład dla lantanu wynosiło 0,4-0,8 mmol/g suchego kopolimeru, a dla miedzi 0,2-0,6 mmol/g suchego kopolimeru. Kopolimery opisane w pracach [37,38] były wykorzystane do flokulacji bakterii. Z kolei na kopolimerach opisanych w [97] sorbowano Cu(II), Ni(II), Co(II), Pb(II) i Cd(II).

W pozostałych zaledwie kilku pracach prezentowane są wyniki doświadczeń prowadzonych z zastosowaniem usieciowanych N'N'-metylenobisakryloamidem żywic, o właściwościach zależnych od temperatury, zawierających w swoim składzie mery jonoczynne takie jak np. kwasu metakrylowego [98], akrylowego [103], 2-akrylamido-2-metylo(propanosulfonowego) [103], 2-acetamido-sulfonowego [103] czy z pierścieniem cyklamowym (1-akryloilo-1,4,8,11-tetraazacyklodekan) [104]. Na żywicach otrzymanych przez Lehto i współpracowników badano sorpcję Zn(II), Ni(II) i Cr(III) w różnych warunkach pH i temperatury. Nie zaobserwowano wpływu zmian struktury żywic spowodowanych zmianami temperatury na sorpcję metali [103]. Z kolei Kuckling badał wpływ następujących metali Cu(II), Ni(II), Mn(II), Zn(II), Fe(III) i Na(I) na zachowanie się polimeru z zakresie temperatury od 10 do 75°C. Zaadsorbowane kationy miedzi i niklu obniżały temperaturę VPTT z 48°C (temperatura jonitu) do 36°C [104]. Są też prace dotyczące syntezy i właściwości żywic amfoterycznych [99], na których badano sorpcję Al(III) i żywic anionowych [105] oraz żywic z odciskiem molekularnym metalu – z grupami kwasu metakrylowego z odciskiem zawierającym ołów(II) [98,101] i wapń(II) [98] oraz z grupami N-(4-winylobenzylo)etylenodiaminy z odciskiem zawierającym miedź(II) [106]. Żywice z odciskiem molekularnym wapnia wykorzystano do sorpcji Ca(II). Powinowactwo jonów wapnia do jonitu było większe w wyższych

temperaturach [98]. Na jonie z odciskiem molekularnym miedzi sorbowano Cu(II). W temperaturze 10°C sorpcja wynosiła 0,008 mmol/g suchego kopolimeru, a w 34°C 0,012 mmol/g suchego kopolimeru. Po sorpcji w 34°C obniżono temperaturę do 10°C, stężenie zdesorbowanego metalu wynosiło 0,004 mmol/g suchego kopolimeru [106]. Jedyne dwie prace dotyczą właściwości ekstrakcyjnych termoczulych polimerów z resztami kwasu fosforowego [102,107]. Takeshita i Nakano [102] badali sorpcję lantanu (III) i samaru (III) na kopolimerze NIPAAm-co-2-metakryloilo(oksyetylo) fosforan (MEP) usieciowanym N,N'-metylenobisakryloamidem w zakresie temperatur 5-50°C i zaobserwowali wyraźne zwiększenie logarytmu współczynnika podziału. Dla lantanu logarytm współczynnika podziału w temperaturze 5°C wynosił 1,7, a w temperaturze 50°C 2,3. Grupa pod kierownictwem Tokuyamy [107] badała sorpcję miedzi (II) na kopolimerze NIPAAm-co-MEP usieciowanym N,N'-metylenobisakryloamidem oraz na liniowym kopolimerze NIPAAm-co-MEP. Sorpcję miedzi na termoczulym żelu prowadzono w trzech cyklach, w temperaturze 30°C i 40°C. Średnie stężenie jonów miedzi w temperaturze 30°C wynosiło 0,016 mmol/g suchego kopolimeru, natomiast w temperaturze 40°C 0,020 mmol/g suchego polimeru. Na podstawie tych wyników stwierdzono, że adsorpcja miedzi może być sterowana temperaturą. Liniowy kopolimer NIPAAm-co-MEP posłużył do oznaczenia pK grup fosforanowych, uzyskane wartości ( $pK_1=6,92$ ;  $pK_2=10,80$ ) porównano z wartościami pK dla monomeru MEP ( $pK_1=2,15$ ;  $pK_2=6,80$ ) (rysunek 11). Wykresy miareczkowania liniowego kopolimeru NIPAAm-co-MEP i monomeru MEP przedstawiono na rysunku 12.



Rysunek 11 Stosunki molowe zdysocjowanych grup fosforanowych w kopolimerze NIPAAm-co-MEP (POLY) i w monomerze MEP (MEP monomer) w funkcji pH w temperaturze 25°C [107]



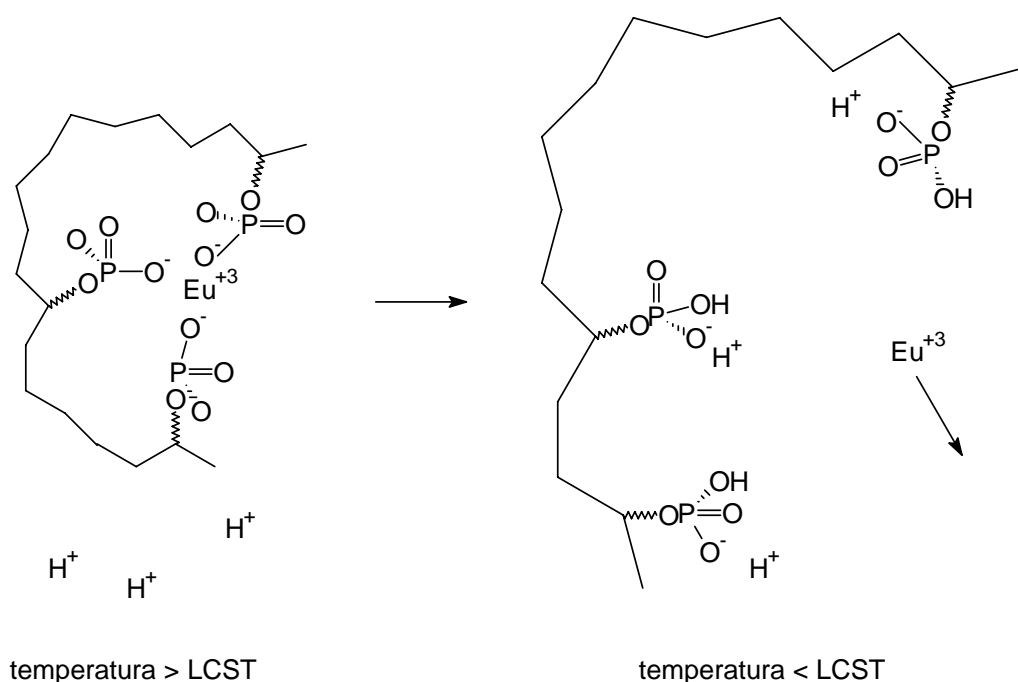
Rysunek 12 Krzywe miareczkowania pH-metrycznego wodnych roztworów NIPAAm-co-MEP (POLY) i monomeru MEP (MEP monomer) roztworem NaOH w temperaturze 25°C [107]



Reszty kwasów fosforowego i fosfonowego ( $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  i  $-\text{PO}(\text{OH})_2$ ) wydają się mieć, jako kwasy wielozasadowe, posiadające dodatkowo zdolność koordynowania wielu jonów za pomocą tlenu fosforylowego, najkorzystniejsze właściwości do wykorzystania w polimerach skokowo zmieniających objętość ze zmianą temperatury. Te właściwości to zachowywanie zdolności do wymiany jonowej w roztworach o umiarkowanej kwasowości i duża selektywność w stosunku do jonów wielowartościowych w tym lantanowców i aktynowców. Grupa fosforanowa, jak już wspomniano powyżej, może tworzyć silniejsze kompleksy w roztworach kwasowych niż grupy karboksylowe. Wynika to z obecności trzeciego donorowego atomu tlenu oraz z polarnej natury wiązania  $\text{P}=\text{O}$ , dzięki któremu możliwa jest koordynacja metalu [31].

Istotną cechą termoczułego jonitu jest zmniejszona, na skutek oddziaływań hydrofobowych, chłonność wody i objętość polimeru w temperaturze powyżej około  $34^\circ\text{C}$ . Pozwala to na jednoczesne oddziaływanie (wymianę jonową i/lub koordynację) pomiędzy sąsiednimi grupami fosforanowymi a wielowartościowymi jonami, znajdującymi się w roztworze zewnętrznym. Poniżej tej temperatury oddziaływania hydrofobowe są słabsze i umożliwiają znaczne pęcznienie materiału w roztworach wodnych. Pęcznienie to powoduje oddalenie się grup jonowymiennych/koordynujących od siebie i uniemożliwienie, ze względów sterycznych, wymiany jonowej i tworzenia kompleksów z jonami wielowartościowymi.

Rysunek 13 przedstawia wpływ temperatury na położenie grup jonoczynnych w żelu. Podczas ogrzewania następuje skurczenie i tym samym odległość pomiędzy grupami fosforanowymi ulega zmniejszeniu ułatwiając sorpcję metali [102].



**Rysunek 13** Schematyczne przedstawienie polimeru o właściwościach zależnych od temperatury [102]

Jony lantanowców (III) jako twarde kwasy wykazują duże powinowactwo do tlenu i ligandów zawierających tlen i dlatego też ulegają hydratacji, a w kompleksach w fazie stałej często w wewnętrznej sferze koordynacyjnej związane są cząsteczki wody poprzez pary elektronowe atomów tlenu.

Liczba koordynacyjna  $\text{Ln}^{x+}$  może przyjmować różne wartości, co jest uzależnione od wielkości ligandu. Bardzo często dla jonów lantanowców lekkich o większym promieniu jonowym liczba koordynacyjna przyjmuje wartość 9, a dla jonów lantanowców ciężkich o mniejszym promieniu jonowym – wartość 8.

Ze względu na dużą wartość liczby koordynacyjnej, często oprócz różnych ligandów organicznych lub nieorganicznych, w sferze koordynacyjnej znajdują się cząsteczki wody (woda koordynacyjna wewnętrzzsferowa).

W silnie uwodnionych kompleksach lantanowców cząsteczki wody mogą znajdować się zarówno w sferze koordynacyjnej, jak i poza sferą koordynacyjną (woda zewnętrzzsferowa). Woda zewnętrzzsferowa jest związana wiązaniem wodorowym z ligandami (także z cząsteczkami wody wewnętrzzsferowej).

W roztworach wodnych mamy do czynienia z nieznaną liczbą koordynowanych cząsteczek wody i silną konkurencją wody z ligandami [108,109].

Lantanowce występują w poszczególnych minerałach w niewielkich ilościach, z reguły w postaci mieszanin, często izomorficznych, dlatego ich wydobycie i rozdzielanie jest trudne. W ciągu kilku ostatnich lat ukazało się kilka publikacji dotyczących rozdziału lantanowców i aktynowców za pomocą wymiany jonowej lub chelatowania na żywicach z ligandami fosfonowymi [27-29,110,111] i fosfinowymi [112,113]. Badano rozdział aktynowców z roztworów kwasu azotowego i solnego [27, 111] oraz europu [28,29] i metali przejściowych [28]. Na jonicie z grupami fosfinowymi [112,113] rozdzielano lantanowce. Rozdział lantanu(III) i europu(III) badano na żywicach polikondensacyjnych zawierających katechol, rezorcynę i ich mieszaniny z 8-hydroksychinoliną [114], a neodymu(III) i lantanu(III) na żywicach z grupami fosfonowymi, w których zwiększono selektywność metodą wdrukowywania, w tym przypadku zastosowano odciski molekularne neodymu [115].

### 1.3 Immobilizacja enzymów

Immobilizacja polega na związaniu białkowego katalizatora ze stałym nierozpuszczalnym podłożem zwanym nośnikiem w taki sposób, aby enzym nie stracił swojej aktywności katalitycznej. Oznacza to włączenie enzymu w wyodrębnioną fazę, oddzieloną od fazy swobodnego roztworu, z zachowaniem możliwości wymiany znajdujących się w obu fazach cząsteczek substratu. Immobilizacja stanowi włączenie enzymu w środowisko, w którym dostęp do niego ma tylko pewna część ogólnej objętości roztworu. Enzymy immobilizuje się metodami fizycznymi i chemicznymi. Metody fizycznej immobilizacji możemy podzielić na cztery grupy [116-119]:

- adsorpcja na nierozpuszczalnych nośnikach,
- zamknięcie w żelu,
- przestrzenne oddzielenie enzymu półprzepuszczalną przegrodą (membraną) od mieszaniny reakcyjnej,
- włączenie rozpuszczalnego enzymu w dwufazowe środowisko reakcyjne, w którym znajduje się on tylko w jednej z faz.

Charakterystyczną cechą chemicznych metod immobilizacji jest powstanie nowych wiązań kowalencyjnych, zwłaszcza między białkiem i nośnikiem. Takie połączenie enzymu z nośnikiem zapewnia dużą trwałość preparatu. Ponadto zmiany pH i temperatury w dość szerokich granicach nie powodują desorpcji enzymu z nośnika i tym samym nie następuje zanieczyszczenie końcowych produktów katalizowanej reakcji. Chemiczna modyfikacja enzymów może prowadzić do znacznych zmian właściwości, takich jak: swoistość substratowa, aktywność katalityczna i trwałość [116-120]. Wśród metod kowalencyjnej immobilizacji wyróżniamy:

- bezpośrednie przyłączenie do nośnika,
- pośrednie przyłączenie do nośnika poprzez czynnik sprzęgający będący związkiem dwu- lub wielofunkcyjnym,
- sieciowanie.

Bezpośrednie przyłączenie do nośnika zachodzi, gdy na powierzchni nośnika są obecne grupy funkcyjne zdolne do wstępowania w reakcje chemiczne z grupami funkcyjnymi enzymu z utworzeniem wiązań kowalencyjnych.

Pośrednie przyłączenie do nośnika poprzez czynnik sprzęgający powoduje oddalenie cząsteczki immobilizowanego enzymu od powierzchni nośnika. Sposób ten jest pożądany w sytuacji, w której ścisły kontakt białka z nośnikiem może spowodować niekorzystne zmiany mikrośrodowiska enzymu oraz ograniczenia steryczne i dyfuzyjne. Dobór długości czynnika sprzęgającego (lub optymalnej mieszaniny czynników sprzęgających o różnej długości) może prowadzić do zmiany cech katalitycznych immobilizowanego enzymu.

Wiele różnych możliwości kowalencyjnej immobilizacji enzymów istnieje również wówczas, gdy stosuje się jedynie enzym i czynnik sieciujący, a nośnik jako ciało stałe powstaje dopiero w procesie immobilizacji albo sam enzym staje się równocześnie nośnikiem. W tych przypadkach można mówić o kowalencyjnym „wszywaniu” cząsteczki enzymu w różne typy sieci. Po wprowadzeniu do roztworu enzymu dwufunkcyjnego czynnika sieciującego, poszczególne cząsteczki enzymu łączą się między sobą tworząc mniej lub bardziej złożone agregaty o strukturze sieci, w której jako węzły występują same cząsteczki enzymu [116-119].

Enzymy immobilizowane wykazują wiele zalet takich jak możliwość wielokrotnego użycia lub wykorzystania w procesach ciągłych czy łatwość wydzielania produktu i biokatalizatora z mieszaniny poreakcyjnej. Immobilizowane preparaty charakteryzują się przedłużoną stabilnością katalityczną. Stosowanie immobilizowanych enzymów w procesach technologicznych jest bardziej ekonomiczne w porównaniu z kosztami procesów technologicznych wykorzystujących natywne enzymy [116,117,121,122].

W porównaniu z natywnymi, immobilizowane enzymy są bardziej odporne na działanie podwyższonej temperatury, inhibitorów i rozpuszczalników organicznych. Immobilizacja powoduje, że nie występują niektóre wielocząsteczkowe procesy inaktywacji, takie jak agregacja i autoliza. Unieruchomienie biokatalizatora na powierzchni lub wewnątrz nośnika powoduje na ogół powstawanie wokół cząsteczek enzymu ograniczeń sterycznych, które mogą stanowić osłonę przed niekorzystnym oddziaływaniem cząsteczek

z zewnętrznego roztworu [119]. Immobilizacja może spowodować również niekorzystne zmiany, takie jak zmniejszenie aktywności, czy ograniczenie dyfuzji substratów i produktów [123,124]. Przejawem tych zmian jest zwiększenie stałej Michaelisa i zmniejszenie maksymalnej szybkości reakcji enzymatycznej [127]. Zmniejszenie szybkości reakcji enzymatycznej spowodowane jest utrudnieniem dostępu do centrum aktywnego, powolnym transportem dyfuzyjnym substratu do centrum aktywnego, a także zmianami lokalnego pH [125,126].

Nośniki do immobilizacji enzymów powinny charakteryzować się dużą trwałością chemiczną i biologiczną, dużą odpornością mechaniczną (przede wszystkim na ścieranie), dostateczną przenikalnością dla enzymu i substratów, dużą powierzchnią właściwą, pojemnością i porowatością. Postać fizyczna nośnika powinna gwarantować możliwość otrzymywania form immobilizowanego enzymu dogodnych z technologicznego punktu widzenia (np.: granulki, membrany). Ponadto nośniki powinny być podatne na aktywację oraz wysoce hydrofilowe, aby reakcja immobilizacji mogła przebiegać w środowisku wodnym. Enzymy immobilizuje się zarówno na nieorganicznych nośnikach (szkło, materiały ceramiczne, tlenki metali, jak i na organicznych: naturalnych polimerach (polisacharydy, białka, lipidy) lub syntetycznych nośnikach (polimery styrenowe, akrylowe, poliamidowe, na bazie poli(alkoholu winylowego), poliuretany) [120,127,128].

### **1.3.1 Adsorpcja**

Immobilizacja następuje w wyniku kontaktu wodnego roztworu enzymu z nośnikiem. Po odmyciu nie zaadsorbowanego enzymu, preparat immobilizowanego biokatalizatora jest gotowy do użycia. Enzym można immobilizować w sposób statyczny. Nośnik wprowadza się do wodnego roztworu enzymu i pozostawia na pewien czas bez mieszania. Immobilizacja następuje dzięki samorzutnej dyfuzji enzymu do powierzchni nośnika, a potem adsorpcji. Bardziej wydajny proces zapewniający równomierne wypełnienie powierzchni nośnika zaadsorbowanym enzymem to adsorpcja z mieszaniem. Nośnik zawieszają w roztworze enzymu i poddaje ciągłemu mieszaniu za pomocą mieszadła albo na wytrząsarce. Innym sposobem jest elektroosadzanie enzymu

na nośniku – w roztworze enzymu zanurza się dwie elektrody, a na powierzchni jednej z nich umieszcza się warstwę nośnika. Po włączeniu prądu cząsteczki enzymu o odpowiednim ładunku przemieszczają się w roztworze, w kierunku elektrody z nośnikiem i osadzają się na jego powierzchni. W przypadku preparatów wykorzystywanych przemysłowo enzym adsorbuje się metodą nanoszenia na kolumnie. Przez kolumnę wypełnioną nośnikiem tworzącym upakowane złożę, przy użyciu pompy w kierunku z góry w dół przepuszcza się roztwór enzymu w warunkach ciągłej cyrkulacji. Sposób ten ma tę zaletę, że umożliwia nanoszenie enzymu, przemywanie preparatu, a następnie prowadzenie procesu enzymatycznego w tej samej kolumnie bez dodatkowych manipulacji [116-119].

Metodą adsorpcji immobilizowano między innymi trypsynę na kopolimerze styrenu i metakrylanu 2-hydroksyetylu [129]. Inwertazę i glukoamylazę immobilizowano wewnątrz alginianu sodu, przy czym inwertaza była zamykana w kapsułkach [130], a glukoamylaza we włóknach [131].

Utrzymywanie zaadsorbowanej cząsteczki enzymu na powierzchni nośnika zapewniają niespecyficzne oddziaływania van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne, wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe między nośnikiem a grupami na powierzchni białka. Oddziaływania mogą być na tyle silne, że adsorpcji towarzyszyć będzie zniszczenie struktury biokatalizatora.

Przebieg procesu adsorpcji i trwałość połączenia enzymu z nośnikiem w znacznym stopniu są zależne od warunków przeprowadzenia immobilizacji.

Adsorpcję enzymu warunkują głównie:

- powierzchnia właściwa i porowatość nośnika,
- wartość pH,
- siła jonowa roztworu,
- stężenie enzymu w roztworze,
- temperatura prowadzenia procesu.

Pojemność adsorpcyjna nośnika jest proporcjonalna do jego powierzchni właściwej. W odniesieniu do enzymów o prawidłowości tej można mówić tylko w tym przypadku, gdy nośnik jest nieporowaty lub średnica porów jest o wiele większa niż wymiary cząsteczek białka. Jeżeli jednak pory nośnika są małe, tak że

---

cząsteczki enzymu nie mogą się w nich zmieścić, wówczas dla białka dostępna jest tylko część powierzchni, a więc pojemność adsorpcyjna nośnika względem enzymu jest niewielka.

Duży wpływ na wydajność adsorpcji enzymu na powierzchni nośnika wywiera odczyn środowiska, zwłaszcza jeżeli adsorpcja zachodzi głównie dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym. Na nośnikach nie będących wymieniaczami jonowymi, maksymalną adsorpcję osiąga się zwykle w punkcie izoelektrycznym białka.

Wartość siły jonowej wpływa na trwałość połączenia enzymu z nośnikiem. Przy dużym stężeniu soli, obecne w roztworze jony wypierają z powierzchni nośnika cząsteczki białka przyłączone dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym. Zwiększenie siły jonowej powoduje desorpcję enzymu.

Zwiększanie stężenia enzymu w roztworze, z którego następuje adsorpcja, powoduje, że zwiększa się ilość enzymu zaadsorbowanego na nośniku i wzrasta katalityczna aktywność właściwa immobilizowanego preparatu. Liczba miejsc przyłączania enzymu na powierzchni nośnika jest jednak ograniczona, a ponadto miejsca te wykazują niejednakowe powinowactwo względem białka. Następstwem dalszego zwiększania stężenia enzymu w roztworze może być to, że na pierwszej warstwie zaadsorbowanego enzymu mogą się tworzyć druga i dalsze warstwy. Największą aktywność katalityczną będą wykazywać zewnętrzne warstwy zaadsorbowanego enzymu, w których dyfuzja substratu w najmniejszym stopniu będzie ograniczać szybkość reakcji. „Przeładowanie” nośnika enzymem powoduje, że głębiej umieszczone warstwy zaadsorbowanego biokatalizatora są wyeliminowane ze strefy reakcji i w rezultacie ogólna efektywność działania preparatu zmniejsza się.

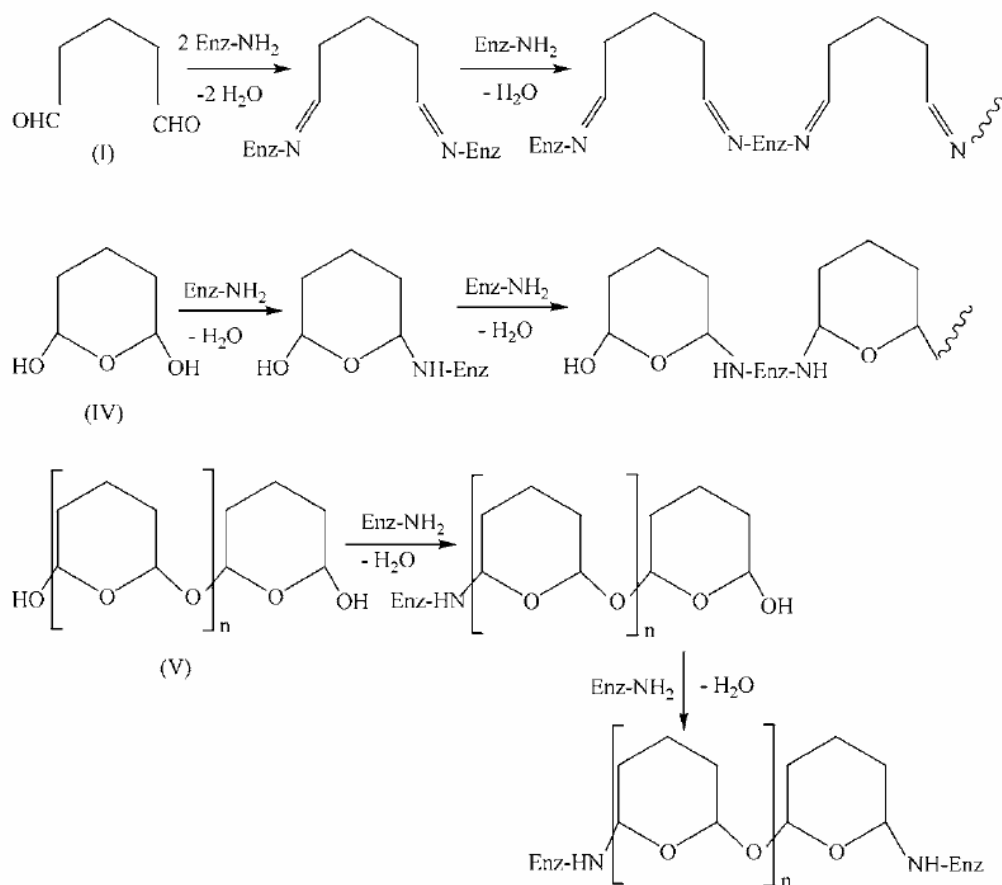
Podwyższenie temperatury wywiera dwojaki wpływ na proces adsorpcji enzymów na nośniku. Silne ogrzewanie prowadzi do utraty aktywności enzymu w wyniku termicznej denaturacji cząsteczki białka, ale z drugiej strony proces adsorpcji ulega przyspieszeniu, ponieważ zwiększa się szybkość dyfuzji cząsteczek enzymu do porów nośnika. Wartość optymalnej temperatury zależy od charakteru adsorbowanego enzymu i powierzchni nośnika [119].

Istnieje kilka sposobów zwiększenia efektywności łączenia się enzymu z nośnikiem. Jednym z nich jest immobilizacja na nośnikach wstępnie



modyfikowanych. Wstępna modyfikacja nośnika powoduje w wielu przypadkach znaczne zwiększenie trwałości przyłączenia enzymu, a także niekiedy poprawę właściwości katalitycznych białka dzięki utworzeniu bardziej korzystnego mikrośrodowiska. Nośnik można zmodyfikować poprzez traktowanie jonami metali (np. Ti, Sn, Zr, V, Fe), traktowanie substancjami, których cząsteczki zawierają dużą liczbę grup funkcyjnych, zdolnych do oddziaływania z grupami na powierzchni cząsteczki enzymu dzięki wiązaniom elektrostatycznym i wodorowym, traktowanie substancjami hydrofobowymi, zaadsorbowanie pojedynczej warstwy lipidu lub kowalencyjne przyłączenie do powierzchni nośnika cząsteczek będących specyficznymi ligandami immobilizowanego enzymu (adsorpcja afinitywna). Innym sposobem zwiększenia efektywności łączenia się enzymu z nośnikiem jest immobilizacja wstępnie modyfikowanych enzymów [122].

Enzymy immobilizowane metodą adsorpcji są podatne na wymywanie z nośnika podczas wielokrotnego użycia. Jednym ze sposobów zapobiegających wymywaniu jest sieciowanie warstwy zaadsorbowanego enzymu odczynnikiem dwufunkcyjnym. W rezultacie na powierzchni nośnika powstaje jednolita błonka złożona z usieciowanych wzajemnie cząsteczek enzymu. Jako czynnik sieciujący stosuje się najczęściej aldehyd glutarowy [132-134]. Aldehyd glutarowy reaguje gwałtownie z grupami aminowymi w środowisku obojętnym, przy czym w reakcji uczestniczą grupy  $\epsilon$ -aminowe reszt lizylowych białka. Większość białek zawiera w swoim składzie wiele reszt lizylowych, są one umieszczone na powierzchni i nie uczestniczą w procesach katalizy. Z tego względu sieciowanie białek aldehydem glutarowym nie niszczy konformacji biokatalizatora i w rezultacie nie powinno obniżać jego aktywności katalitycznej [135]. W środowisku kwasowym i obojętnym aldehyd glutarowy jest mieszaniną liniowego związku, cyklicznego hemiacetalu i cyklicznego oligomeru (rysunek 14). Każda z tych form może reagować z grupami  $\epsilon$ -aminowymi reszt lizylowych białka.



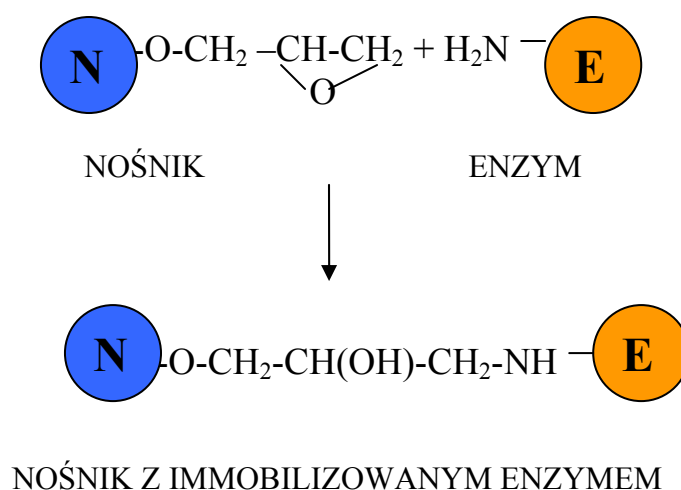
**Rysunek 14** Reakcje aldehydu glutarowego z białkami w środowisku kwasowym i zasadowym [135]

Sieciowanie aldehydem glutarowym w łagodnych warunkach, w temperaturze pokojowej i w pH 7 pozwala na aktywację pierwszorzędowych grup aminowych zarówno nośnika, jak i białka za pomocą tylko jednej cząsteczki aldehydu glutarowego [136].

Adsorpcja enzymów na nośnikach jest powszechnie stosowaną metodą ze względu na dostępność i stosunkowo niską cenę adsorbentów oraz na prostotę używanych procedur unieruchamiania. Adsorpcja często wiąże się z jednoczesnym oczyszczaniem enzymu, ponieważ łączenie się białka z nośnikiem jest w wielu przypadkach dość specyficzne. Otrzymywane preparaty charakteryzują się jednak małą trwałością, ze względu na wymywanie biokatalizatora z preparatu [116-119].

### 1.3.2 Immobilizacja kowalencyjna

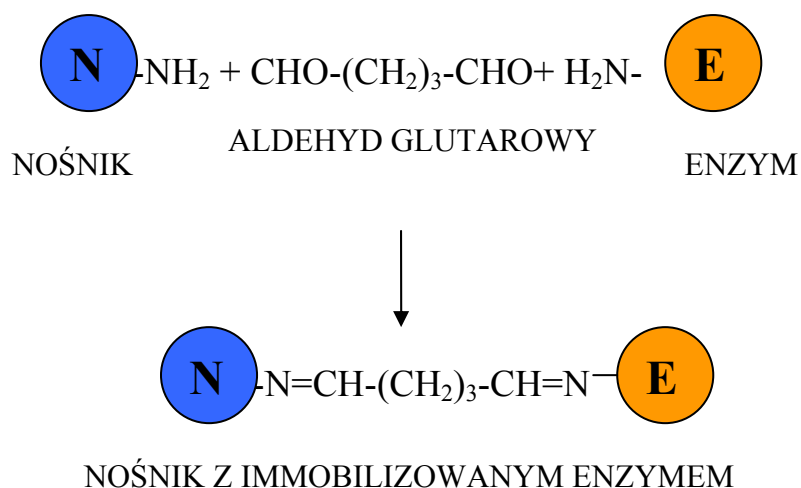
Immobilizacja kowalencyjna polega na związaniu białkowego katalizatora z nośnikiem za pomocą wiązań chemicznych. W zależności od typu nośnika mamy do czynienia z bezpośrednią immobilizacją enzymu lub immobilizacją poprzedzoną aktywacją podłoża. Wśród nośników stosowanych bezpośrednio do immobilizacji wyróżniamy syntetyczne polimery z reaktywnymi grupami epoksydowymi. Jednym z nich jest produkowany na skalę przemysłową Eupergit® C – kopolimer metakryloamidu i metakrylanu glicydylu usieciowany N,N'-metylenobisakryloamidem, na którym immobilizowano między innymi lakkazę [137]. Niewątpliwą zaletą immobilizacji na nośniku tego typu jest prosta procedura unieruchamiania enzymu. Schemat reakcji grup epoksydowych z enzymem przedstawiono na rysunku 15.



Rysunek 15 Schematyczne przedstawienie immobilizacji enzymu na nośniku z grupami epoksydowymi [119]

Inne nośniki z grupami epoksydowymi pochodzącymi od metakrylanu glicydylu to na przykład kopolimery wymienionego monomeru z dimetakrylanem 1,3-butanodiolu [138] lub kwasem metakrylowym [139]. Na takich nośnikach immobilizowano między innymi trypsynę [138] i glukoamylazę [139]. Nośnik z grupami epoksydowymi można również otrzymać na drodze modyfikacji polimeru posiadającego grupy hydroksylowe za pomocą epichlorohydryny. Na takim polimerze immobilizowano glukoamylazę [140].

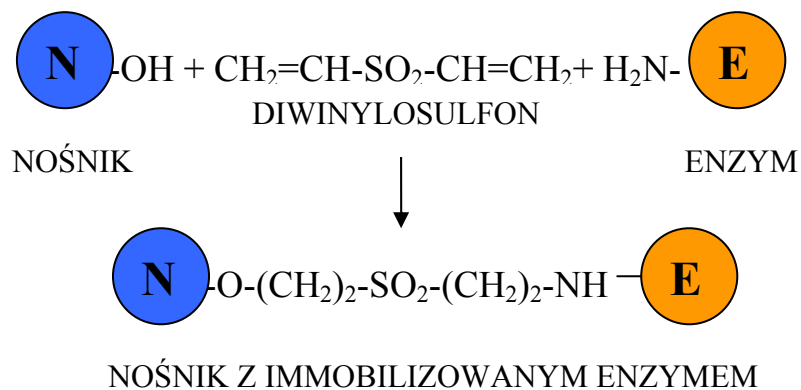
Nośniki posiadające grupy aminowe, hydroksylowe czy karboksylowe wymagają aktywacji zanim zostaną użyte do immobilizacji białek. Do aktywacji grup aminowych wykorzystuje się aldehyd glutarowy. Schemat aktywacji i immobilizacji przedstawiono na rysunku 16.



**Rysunek 16** Schematyczne przedstawienie aktywacji i immobilizacji enzymu na nośniku z grupami aminowymi [117]

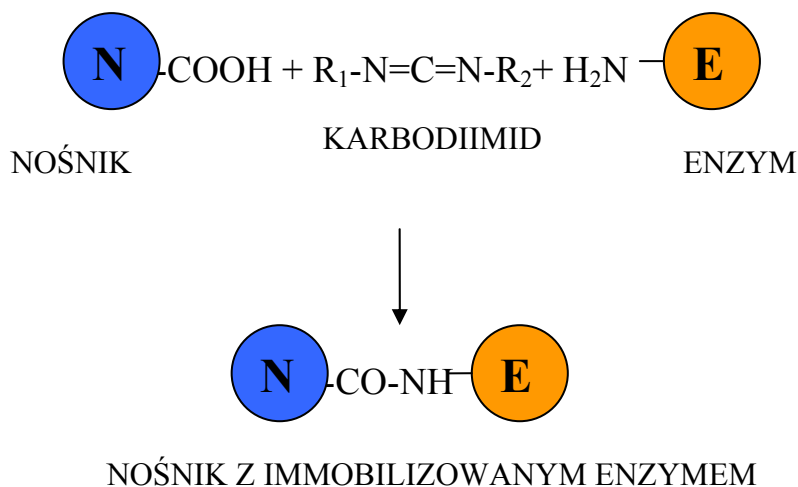
Immobilizacja poprzez grupy aminowe z wykorzystaniem aldehydu glutarowego jako czynnika sprzęgającego jest popularnym sposobem unieruchamiania. W ten sposób były immobilizowane między innymi lakkaza [141], trypsyna [142], glukoamylaza [143],  $\alpha$ - i  $\beta$ -amylaza [143] czy ureaza [144].

Do aktywacji grup hydroksylowych często wykorzystuje się metodę Peppera [145], w której czynnikiem sprzęgającym nośnik i enzym jest diwinylosulfon. W ten sposób immobilizowano między innymi lakkazę na nośnikach celulozowych [141], glukoamylazę oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -amylazę na nośnikach akrylowych [143]. Schematycznie reakcję aktywacji i immobilizacji przedstawiono na rysunku 17.



Rysunek 17 Schematyczne przedstawienie aktywacji i immobilizacji enzymu na nośniku z grupami hydroksylowymi [119]

Z kolei grupy karboksylowe można aktywować między innymi za pomocą karbodiimidu, co schematycznie przedstawiono na rysunku 18.



Rysunek 18 Schematyczne przedstawienie aktywacji i immobilizacji enzymu na nośniku z grupami hydroksylowymi [146]

Metodą tą immobilizowano na polimerach akrylowych między innymi lakkazę [141], glukozamylazę oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -amylazę [143].

Enzymy immobilizowane kowalencyjnie charakteryzują się dużą trwałością, a złożoność i elastyczność metod umożliwia otrzymanie

immobilizowanych enzymów o ściśle określonych i kontrolowanych właściwościach. Preparaty enzymów immobilizowanych metodami chemicznymi są mniej przydatne przemysłowo z uwagi na złożoność i wysokie koszty otrzymywania [116-119].

Jedynym lub głównym składnikiem każdego enzymu jest białko. Składniki niebiałkowe to grupy prostetyczne o charakterze nieorganicznym lub organicznym, lipidy (w lipoproteinach) i węglowodany (w glikoproteinach). Chemiczne metody immobilizacji są ukierunkowane na modyfikację białkowej części cząsteczki enzymu. Część ta zbudowana jest z aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi. Zawartość różnych reszt aminokwasowych w różnych białkach jest bardzo podobna. Prawie połowę stanowią aminokwasy z niepolarnymi lub słabo polarnymi grupami bocznymi. W rezultacie, dzięki oddziaływaniom hydrofobowym łańcuchy polipeptydowe zwijają się w globularne struktury, których rdzeń stanowią niepolarne fragmenty łańcuchów polipeptydowych, a warstwę zewnętrzną tworzą człony z grupami polarnymi zdolnymi do dysocjacji, takimi jak: -SH, -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>. Pewna ilość ugrupowań hydrofobowych może także występować na powierzchni, stanowią one miejsca kontaktowe dla przyłączania substratów i (lub) miejsca wzajemnych oddziaływań pomiędzy podjednostkami enzymu.

W immobilizacji kowalencyjnej powinny uczestniczyć tylko te grupy funkcyjne, które nie odgrywają istotnej roli dla katalitycznego działania enzymu, tzw. grupy tarczowe. Grupy te powinny być wysoce reaktywne, aby w miarę możliwości zapewnić wybiórczość reakcji modyfikacji, a także jej przebieg w łagodnych warunkach, nie powodujących denaturacji. Ponadto grup tarczowych powinno być dostatecznie dużo, aby zapewnić możliwość wprowadzenia nowych wiązań chemicznych do cząsteczki białka, regulacji ich liczby i lokalizacji oraz obniżenia w ten sposób prawdopodobieństwa modyfikacji aktywnych centrów enzymów.

Najbardziej reaktywnymi grupami białek są grupy -SH cysteiny. Znaczenie grup tiolowych białka jako grup tarczowych w kowalencyjnej immobilizacji nie jest jednak duże. Wynika to przede wszystkim z faktu, że zawartość cysteiny w białkach jest na ogół niewielka. Bardzo często w białkach

w ogóle nie występują wolne grupy tiolowe, ponieważ uczestniczą one w tworzeniu mostków disiarczkowych stabilizujących strukturę enzymów.

Najczęściej do immobilizacji kowalencyjnej wykorzystuje się grupy aminowe białka. Grup tych jest w białku dość dużo i są one wysoce reaktywne. Większość grup aminowych odgrywa drugorzędną rolę w utrzymywaniu struktury i pełnieniu katalitycznej funkcji enzymów. Ważną właściwością grup aminowych jest zdolność do protonizacji ( $pK$  9-10), zapewniająca w warunkach fizjologicznych występowanie na powierzchni białek ładunków dodatnich, które oddziałują z jonami o przeciwnym ładunku, znajdującymi się w roztworze lub z ujemnie naładowanymi grupami karboksylowymi białka.

W kowalencyjnej immobilizacji mogą ponadto uczestniczyć grupy imidazolowe histydyny, guanidynowe argininy, wodorotlenowe seryny, tyrozyny i treoniny, a także niebiałkowe składniki enzymu lub układu reakcyjnego, zwłaszcza woda. Reaktywność danych grup białka w dużym stopniu zależy od warunków, takich jak: charakter rozpuszczalnika,  $pH$  środowiska, temperatura. Struktury białkowe są na ogół bardzo labilne i ogromna liczba czynników, w tym chemicznych, powoduje denaturację i inaktywację enzymów [119].

Immobilizacja wywołuje niebezpieczeństwo przyłączenia do nośnika białka o konformacji różniącej się od natywnej. Aktywność katalityczna enzymu może się wówczas istotnie zmienić lub w ogóle zaniknąć. Stosując fizyczne metody badań, takie jak: spektrofotometria, fluorescencja czy MRI można badać struktury immobilizowanych enzymów. Na ogół przestrzenna struktura enzymu pozostaje niezmienną w wyniku immobilizacji. Jeżeli jednak występują różnice konformacji enzymu natywnego i immobilizowanego, wówczas są one spowodowane przez jedną z trzech przyczyn:

- chemiczną modyfikację grup funkcyjnych białka, warunkujących strukturę, ale nie biorących udziału w samej immobilizacji,
- nieswoistymi oddziaływaniami (elektrostatyczne, hydrofobowe, wiązania wodorowe) między enzymem i nośnikiem, prowadzącymi do denaturacji,
- dużą liczbą wiązań między enzymem i nośnikiem.

Chemicznej modyfikacji grup funkcyjnych białka można zapobiec poprzez dobór odpowiedniej metody immobilizacji, zachowującej wyżej wymienione grupy funkcyjne białka w stanie niezmiennym lub dodanie substratu lub

wprowadzenie innego swoistego ligandu, co często powoduje ochronę enzymu przed inaktywacją w stadium immobilizacji.

W celu zmniejszenia nieswoistych oddziaływań pomiędzy enzymem i nośnikiem można zastąpić dany nośnik innym, nieczynnym względem immobilizowanego białka (np. nośnikiem polisacharydowym lub poliakryloamidowym) lub oddalić cząsteczki białka od powierzchni nośnika przez zastosowanie czynnika sprzęgającego podczas immobilizacji.

W wyniku immobilizacji może powstać również taka sytuacja, że konformacja enzymu praktycznie nie zmienia się, ale zostaje naruszona dynamika zmian konformacyjnych białka spowodowana dużą liczbą wiązań między enzymem i nośnikiem. W przypadku białek związanych z nośnikiem zmiany konformacyjne niezbędne dla procesu katalizy mogą ulec spowolnieniu, może zmniejszyć się liczba stadiów konformacyjnych i intensywność ich przebiegu. W takim wypadku konieczne jest przeprowadzenie immobilizacji enzymu na nieczynnym nośniku [119].

Jeżeli cząsteczka enzymu znajduje się na powierzchni lub wewnątrz cząstki nośnika, wówczas dla przebiegu reakcji enzymatycznej konieczne jest, aby:

- cząsteczka substratu zbliżyła się do cząstki nośnika,
- cząsteczka substratu przedyfundowała do cząstki nośnika.

Zależnie od stosunku szybkości dyfuzji do szybkości reakcji katalizowanej przez enzym mamy do czynienia z następującymi przypadkami kontrolowania procesu katalizy:

- kontrola przez dyfuzję zewnętrzną,
- kontrola przez dyfuzję wewnętrzną,
- kataliza kontrolowana kinetycznie.

W przypadku katalizy kontrolowanej przez dyfuzję zewnętrzną reakcja enzymatyczna w powierzchniowych warstwach cząstki nośnika przebiega szybciej niż substrat z roztworu dochodzi do powierzchni, w wyniku tego w krótkim czasie wokół cząstki nośnika powstaje strefa zubożona w substrat. W rezultacie, obserwowana szybkość reakcji enzymatycznej immobilizowanego



preparatu będzie zależna od szybkości przenoszenia masy substratu do cząstki nośnika.

W katalizie kontrolowanej przez dyfuzję wewnętrzną przenoszenie masy substratu zachodzi szybciej niż reakcja enzymatyczna na powierzchni cząstki nośnika. Gdy rozmiary cząstek nośnika są duże, a enzym bardzo aktywny (lub jego zagęszczenie wewnątrz cząstki nośnika jest bardzo duże), wówczas praktycznie cały substrat zostaje zużyty już w warstwach zbliżonych do powierzchni nośnika, a obszary głębiej położone będą zubożone w substrat.

W przypadku katalizy kontrolowanej kinetycznie dyfuzja substratu zarówno do warstwy zewnętrznej, jak i do wewnętrznych obszarów cząstki nośnika przebiega z dostateczną szybkością. W tej sytuacji ogólna szybkość przemiany substratu zależy bezpośrednio od szybkości reakcji enzymatycznej.

Przestrzenna sieć nośnika, w której znajduje się immobilizowany enzym, może stanowić przeszkodę w przemieszczaniu się cząsteczek substratu, na przykład czysto mechaniczną. W rezultacie aktywne centra części cząsteczek enzymu są niedostępne dla substratu. Powoduje to, że ilość enzymu dostępna dla substratu jest mniejsza niż jego rzeczywista ilość w preparacie i prowadzi do zmniejszenia obserwowanej szybkości reakcji enzymatycznej. Takie zmniejszenie aktywności katalitycznej immobilizowanego enzymu przejawia się zwłaszcza w przypadku substratów wielkocząsteczkowych [119].

Od enzymów wymaga się, aby działały w podwyższonych temperaturach, w skrajnych wartościach pH, w obecności dużych stężeń rozpuszczalników organicznych lub substancji powierzchniowo czynnych. Natywne enzymy odznaczają się jednak bardzo małą stabilnością. Standardowa energia swobodna natywnej konformacji w normalnych warunkach (temperatura pokojowa, fizjologiczne wartości pH, normalne ciśnienie, określony skład środowiska) jest na ogół tylko o 20-60 kJ/mol mniejsza od energii swobodnej fazy zdenaturowanej. Odpowiada to energii zaledwie kilku wiązań wodorowych i z tego względu, nawet niewielkie odchylenia warunków zewnętrznych od tych, w jakich enzym działa w mikrośrodku komórki, mogą być wystarczające dla naruszenia jego struktury i funkcji, to jest do inaktywacji.

---

Oddziaływania fizyczne to zmiana temperatury, promieniowanie ( $\gamma$  lub rentgenowskie), ultradźwięki, adsorpcja na powierzchni granicznej faz. Inaktywacja chemiczna może być spowodowana np. przez ługi lub kwasy, substancje powierzchniowo czynne, rozpuszczalniki organiczne, mocznik i chlorek guanidyny, niektóre czynniki utleniające (np. tlen, nadtlenek wodoru) i redukujące (np. tiole, jony metali), a także przez niektóre enzymy (np. proteazy, kinazy białkowe) [116-119].

Wśród molekularnych mechanizmów inaktywacji enzymów wyróżniamy:

- agregację,
- zmianę struktury pierwszorzędowej,
- desorpcję kofaktora z aktywnego centrum enzymu,
- dysocjację oligomerycznych białek na podjednostki,
- adsorpcję białka na ściankach naczynia reakcyjnego,
- inaktywację w strumieniu cieczy,
- nieodwracalne zmiany konformacji (nieodwracalna denaturacja).

Agregacja jest często wynikiem długotrwałej inkubacji roztworu enzymu w podwyższonej temperaturze, skrajnych wartościach pH, w obecności chemicznych czynników denaturujących. Decydujące znaczenie ma jednak stężenie białka. Zwiększenie stężenia białka prowadzi do zwiększenia szybkości agregacji i wielkości powstających agregatów, a także przyspieszenia inaktywacji w ogóle. Agregaty białkowe na ogół tworzą się w wyniku słabych oddziaływań, takich jak oddziaływania hydrofobowe i wiązania wodorowe. Zmiany wielkości i kształtu agregatów prowadzą aż do utworzenia odrębnej fazy - osadów białka.

Zmiana struktury pierwszorzędowej może być spowodowana następującymi czynnikami:

- hydrolizą wiązań peptydowych, proteolizą i autolizą,
- utlenianiem grup funkcyjnych enzymu,
- rozkładem wiązań disiarczkowych w białkach,
- chemiczną modyfikacją grup tiolowych enzymów, uczestniczących w katalizie,
- fosforylacją białek *in vivo*,

- „samobójczą” inaktywacją,
- radiacyjną inaktywacją enzymów,
- recemizacją aminokwasów w białkach.

W skład aktywnych centrów wielu enzymów wchodzi atomy metali, klastry metalosiarkowe i inne niekowalencyjnie przyłączone grupy prostetyczne (kofaktory). Ogrzewanie, działanie niektórych odczynników chemicznych (np. chelatujących), dializa i inne procedury, które zmieniają równowagę między kofaktorem związanym z białkiem i formą niezwiązaną, mogą powodować, że kofaktory dysocjują z centrów aktywnych enzymów do roztworu. W takim przypadku może nastąpić samorzutna reaktywacja enzymu po dodaniu nadmiaru kofaktora, ale tylko w przypadku, jeśli usunięciu kofaktora nie towarzyszyły znaczne zmiany konformacji białka. W przeciwnym wypadku inaktywacja enzymu jest nieodwracalna.

Dysocjację oligomerycznych białek na podjednostki powoduje wiele czynników denaturujących (np. mocznik, detergenty, kwasy, ogrzewanie). Ten rodzaj inaktywacji jest w zasadzie odwracalny.

W wyniku adsorpcji białka na ściankach naczyń reakcyjnych następuje zmniejszenie stężenia białka w roztworze reakcyjnym. Powierzchnia naczyń reakcyjnych nie jest całkowicie obojętna względem białka. Na powierzchni szkła na przykład, znajdują się grupy obdarzone ładunkiem oraz potencjalne donory i akceptory wiązań wodorowych, dlatego też na takiej powierzchni możliwa jest adsorpcja enzymów dzięki występowaniu słabych oddziaływań niekowalencyjnych.

Inaktywacja w strumieniu cieczy dotyczy procesów enzymatycznych prowadzonych w reaktorach przepływowych. Prawdopodobnie w strumieniu cieczy następuje mechaniczna deformacja cząsteczek białka.

Nieodwracalne zmiany konformacji są wynikiem działania czynników denaturujących. Wiązania niekowalencyjne utrzymujące natywną strukturę białka ulegają rozerwaniu, powstają także inne, „nienatywne” wiązania niekowalencyjne. Po obniżeniu temperatury zmniejsza się ruchliwość konformacji cząsteczki białka i w rezultacie „nienatywne” wiązania niekowalencyjne zostają zachowane. Białko zostaje „zamrożone” w stanie nieodwracalnie zdenaturowanym [119].

Stabilizacja enzymów po immobilizacji wynika z następujących powodów:

- zmiany konformacji immobilizowanego enzymu w porównaniu ze strukturą enzymu natywnego,
- zmiany mikrośrodowiska wokół cząsteczki enzymu,
- usztywnienia natywnej konformacji cząsteczki białka.

Immobilizacja na (lub w) nośniku powoduje na ogół powstawanie wokół cząsteczek enzymu ograniczeń sterycznych, które stanowią osłonę przed oddziaływaniem cząsteczek z zewnętrznego roztworu. Immobilizowane białka są bardziej odporne niż natywne na inaktywację w strumieniu cieczy. Nośnik mechanicznie chroni cząsteczki enzymów przed deformacją w strumieniu, spełniając rolę swego rodzaju amortyzatora.

Wielopunktowe niekowalencyjne oddziaływanie enzymu z nośnikiem – cząsteczki białka mogą łączyć się z nośnikami, na powierzchni których występują grupy naładowane, hydrofobowe i polarne, dzięki stosunkowo słabym oddziaływaniom elektrostatycznym i hydrofobowym oraz wiązanom wodorowym. Dodatkowym warunkiem jest użycie stężonych żeli polimerowych jako nośnika, ponieważ łańcuchy takiego żelu będą otaczać ze wszystkich stron cząsteczkę białka. Układ ten nie jest jednak pozbawiony wad. Cząstki żelu mają skłonność do pęcznienia w wodzie, co prowadzi do obniżenia stężenia polimerowych łańcuchów w żelu. W rezultacie efekt stabilizacji zamkniętego w nim enzymu może się zmniejszać, a nawet zanikać.

Wielopunktowe kowalencyjne przyłączanie enzymu do powierzchni nośnika – immobilizacja na nośniku poprzez utworzenie dużej liczby wiązań kowalencyjnych.

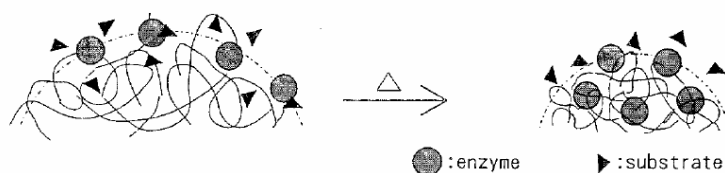
Wewnątrzcząsteczkowe sieciowanie enzymu odczynnikami dwufunkcyjnymi – taka modyfikacja enzymu powinna prowadzić do nałożenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań poprzecznych na globularną cząsteczkę białka [116,117,119].

### 1.3.3 Immobilizacja enzymów na termoczulych polimerach

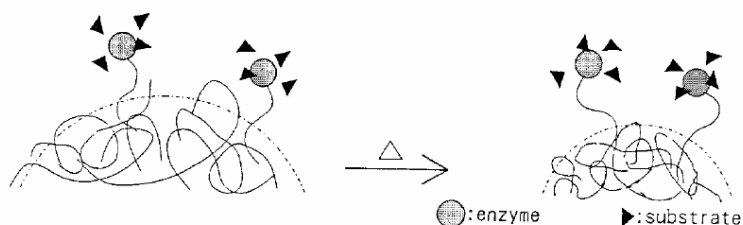
Immobilizacja enzymów w termoczulych żelach powoduje, że zmiany konformacji polimeru wywołane zmianami temperatury otoczenia mogą mieć wpływ na aktywność enzymu oraz na dostępność enzymu dla substratu. W przypadku nośników do immobilizacji enzymów istotne są zmiany objętości porów otrzymanych polimerów spowodowane zmianą temperatury. Przewiduje się, że proces ten może mieć wpływ na specyficzność substratową preparatu, tzn. w temperaturze powyżej VPTT, gdy nośnik jest skurczony i pory są małe, preferowany będzie substrat małocząsteczkowy, substrat wielkocząsteczkowy może mieć trudności w dotarciu do centrum aktywnego enzymu immobilizowanego na nośniku. W temperaturze poniżej VPTT, nośnik jest rozkurczony i pory są duże, centrum aktywne enzymu będzie zatem dostępne dla substratu wielkocząsteczkowego [147,148].

Pierwszy raport dotyczący oddziaływania biocząsteczek z żelem poli(NIPAAm) opublikował Kawaguchi na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku [149]. Zespół badał sorpcję i desorpcję ludzkiej gammaglobuliny w różnych temperaturach. Wiązanie się biocząsteczek z żelem było wynikiem oddziaływań hydrofobowych pomiędzy białkiem a grupami izopropylowymi polimeru i zachodziło w temperaturze 40°C, powyżej VPTT żelu.

Parę lat później, Shiroya i współpracownicy przeprowadzili serię doświadczeń, w których szczepili trypsynę i peroksydazę na żelu poli(NIPAAm). Aktywność enzymu zmniejszała się, kiedy temperatura rosła powyżej VPTT. Skurczenie żelu powodowało utrudniony dostęp substratu do enzymu, który dodatkowo był zamykany przez zbliżające się do siebie polimerowe łańcuchy (rysunek 19). Aktywność enzymu przyłączonego do nośnika z wbudowaniem „ramienia przestrzennego”, którego rolę pełnił glikol polietylenowy, nie zależała od temperatury (rysunek 20) [150].

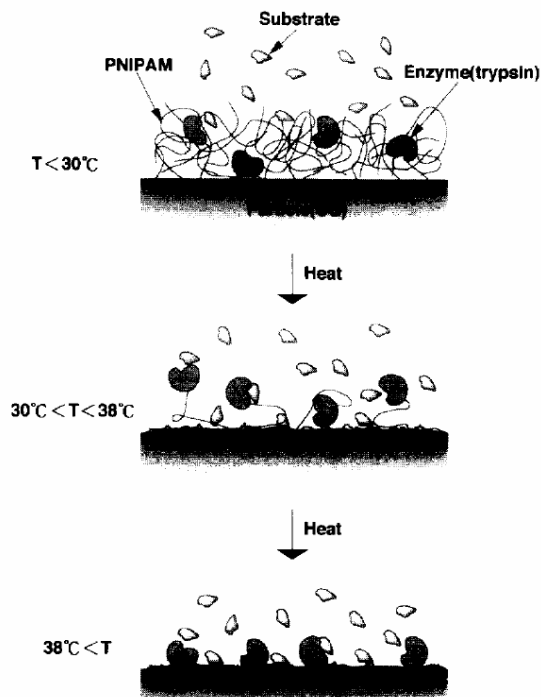


Rysunek 19 Powierzchnia mikrosfery poli(NIPAAm) [150]



Rysunek 20 Powierzchnia mikrosfery poli(NIPAAm) z wbudowanym „ramieniem przestrzennym” PEG [150]

W 1997 roku Yasui opisał kolejne badania dotyczące aktywności enzymatycznej sterowanej temperaturą. Trypsynę przyłączoną do końców łańcuchów poli(NIPAAm) immobilizowano na powierzchni nośnika, do którego przyłączone były również łańcuchy poli(NIPAAm) bez enzymu. Układ charakteryzował się dwiema temperaturami VPTT. Łańcuchy poli(NIPAAm) bez enzymu miały niższą temperaturę VPTT niż łańcuchy zakończone trypsyną. Aktywność enzymu wzrastała, kiedy „puste” łańcuchy poli(NIPAAm) były skurczone. W temperaturze poniżej VPTT „pustych” łańcuchów enzym był otoczony poli N-izopropylakryloamidem, co utrudniało transport substratu (rysunek 21) [151].



Rysunek 21 Powierzchnia polimeru w różnej temperaturze [151]

Trypsyna była również immobilizowana kowalencyjnie na magnetycznym termoczułym kopolimerze N-izopropylakryloamidu i kwasu akrylowego, usieciowanym N,N'-metylenobisakryloamidem [152]. Wydajność immobilizacji dla białka była duża, a związany enzym był aktywny.

Inny enzym immobilizowany na magnetycznym termoczułym żelu to inwertaza [153]. W pracy opisano immobilizację enzymu i  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  na kopolimerze N-izopropylakryloamidu i akryloamidu. Aktywność otrzymanego preparatu badano na kolumnie poddawanej oddziaływaniom pola magnetycznego. Temperaturę kolumny zwiększano w zakresie  $24\text{-}56^\circ\text{C}$ . Wpływ pola magnetycznego powodował początkowo zwiększenie stężenia cukrów redukujących (produktów hydrolizy) w roztworze odbieranym z kolumny, a następnie obserwowano zmniejszenie stężenia produktu, ponieważ w wyniku ogrzewania żel kurczył się. Początkowe zwiększenie stężenia produktu mogło być spowodowane przyspieszeniem reakcji enzymatycznej w podwyższonej temperaturze oraz „wypychaniem” produktu z kurczącego się żelu.

Glukoamylaza również była immobilizowana na termoczułych polimerach. Japońscy naukowcy pod kierownictwem Ohtani'ego zbadali wpływ rozmiarów porów żelu poli(NIPAAm) na hydrolizę skrobi. Enzym został zaimmobilizowany podczas polimeryzacji NIPAAm i MBA. Skrobia jest substratem zbudowanym z amylopektyny, amylozy i glukozy. Amylopektyna i amyloza są związkami wielkocząsteczkowymi, przy czym cząsteczki amylopektyny są większe. Natomiast glukoza jest związkiem małowcząsteczkowym. Reakcję hydrolizy prowadzono w dwóch temperaturach: 20 i 30°C. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że szybkość hydrolizy amylopektyny była większa w temperaturze 20°C niż 30°C. W przypadku amylozy zaobserwowano odwrotną zależność. Wymiar porów żelu poli(NIPAAm) jest mniejszy w wyższych temperaturach i większy w niższych temperaturach, wpływa to na dostępność enzymu dla substratu [147].

W podobny sposób glukoamylaza była immobilizowana przez zespół Kato. W trakcie kopolimeryzacji NIPAAm i akryloamidu sieciowanego MBA enzym był unieruchamiany w żelu. Następnie badano wpływ temperatury na zachowanie się żelu i aktywność glukoamylazy [148]. Badano reakcję odwrotnej hydrolizy, tzn. glukoamylaza katalizowała reakcję syntezy izomaltozy z glukozy. W temperaturze 50°C i przy większych stężeniach substratu uzyskane stężenie było większe.

Enzymy immobilizowano również na nieusieciowanych termoczułych polimerach NIPAAm. Zespół Liu przeprowadził syntezę kopolimeru NIPAAm i N-akryloiloimidu kwasu bursztynowego i zbadał zastosowanie otrzymanego polimeru do immobilizacji kowalencyjnej termolizyny. Termoczułe właściwości zostały wykorzystane podczas oddzielania enzymu ze środowiska reakcji – enzym wytrącano z roztworu zwiększając temperaturę powyżej LCST polimeru [154]. Chen i Hoffman [155] zsyntetyzowali żel poli(N-izopropylakryloamidowy), którego łańcuchy zakończone były grupami karboksylowymi, a następnie immobilizowali kowalencyjnie glukozydazę. Otrzymali termoczuły, rozpuszczalny w wodzie żel z enzymem immobilizowanym na końcu każdego łańcucha. Reakcję z substratem prowadzono w zakresie temperatur 25-60°C, temperatura LCST polimeru wynosiła 33°C. Powyżej temperatury LCST reakcja enzymatyczna przebiegała w układzie heterogenicznym, ponieważ polimer był wytrącony z roztworu. Maksymalną aktywność zaobserwowano w temperaturze



50°C. Syntezę poli(N-izopropylakryloamidu), którego łańcuchy zakończone były grupami karboksylowymi opisano również w [156]. Tak otrzymany polimer wykorzystano do immobilizacji trypsyny, którą przyłączano do końców poli(NIPAAm). Temperatura LCST zależała wówczas od masy cząsteczkowej poli(NIPAAm). Aktywność enzymu malała powyżej temperatury LCST, co było spowodowane ograniczeniem dyfuzji substratu w wyniku kurczenia łańcuchów poli(NIPAAm).

Nie znaleziono publikacji dotyczących immobilizacji lakkazy na termoczulych nośnikach.

Podsumowując przegląd literatury stwierdzono, że w cytowanych pracach dotyczących termoczulych polimerów usieciowanych opisano polimery syntetyzowane metodą polimeryzacji rodnikowej w masie [98-107,147,148,153] i polimeryzacji w roztworze z wytrąceniem polimeru [150,152]. Reakcję polimeryzacji w masie najczęściej przeprowadzano w szklanych cylindrach [103-105,147,148,153], otrzymany żel był wykorzystywany do badań w formie dysków lub w cylindrycznych mikropipetkach [99,101]. Tylko trzy prace dotyczyły syntezy usieciowanych kopolimerów NIPAAm metodą polimeryzacji suspensyjnej, a dokładnie metodą odwrotnej polimeryzacji suspensyjnej [17-19]. W dostępnej literaturze nie znaleziono przykładów syntezy usieciowanych kopolimerów NIPAAm metodą polimeryzacji suspensyjnej, w której fazę ciągłą stanowiła woda.

Na temat usieciowanych kopolimerów poli(NIPAAm) można znaleźć stosunkowo dużo publikacji. Tyczą one jednak głównie hydrożeli i ich właściwości oraz zastosowania do kontrolowanego uwalniania substancji biologicznie czynnych [79-86]. Termoczułe, usieciowane jonity opisano w [98-107], termoczułe kopolimery NIPAAm i MEP będące przedmiotem tej pracy doktorskiej zaprezentowano jedynie w [102,107] przy czym właściwości sorpcyjne badano w obecności La(III) i Sm(III) [102] lub Cu(II) [107]. Termoczułe, usieciowane nośniki do immobilizacji opisano w [147-150,152,153] i tylko w kilku przypadkach immobilizowano glukoamylazę [147,148], inwertazę [153] lub trypsynę [150-152] – enzymy, które immobilizowano w ramach pracy doktorskiej. Nie znaleziono publikacji dotyczących immobilizacji lakkazy na termoczulych nośnikach.

W cytowanych pracach brakuje badania wpływu środka sieciującego na właściwości otrzymywanych termoczułych materiałów, w większości przypadków stosowany jest N,N'-metylenobisakryloamid [79-84,98-107,147-150,152,153].

## 2. CEL PRACY

Celem pracy jest otrzymanie termoczulych polimerów zawierających grupy funkcyjne. Obecność tych grup pozwoli na zastosowanie polimerów jako jonitów chelatujących do sorpcji metali i zbadanie wpływu temperatury na procesy wymiany jonowej i/lub chelatowania wybranych jonów metali oraz otrzymanie termoczulych nośników do immobilizacji enzymów.

Cechą charakterystyczną syntetyzowanych polimerów jest zastosowanie N-izopropylakryloamidu (NIPAAm) jako komonomeru wymuszającego zmiany objętości usieciowanych polimerów w funkcji temperatury.

Poznanie zależności objętości otrzymanych polimerów od temperatury umożliwi uzyskanie następujących efektów:

- sterowania za pomocą temperatury powinowactwem żywicy jonowymiennej/chelatującej w stosunku do jonów wielowartościowych,
- immobilizacji enzymów podczas rozkurczania nośnika.

Zostanie zbadany również wpływ mało- i wielkocząsteczkowych substratów na aktywność otrzymanych preparatów enzymatycznych.

Materiały o powyższych cechach będą mogły znaleźć zastosowanie w specyficznych procesach wymiany jonowej, a także jako nowe materiały w chromatografii jonowej. Ponadto można je wykorzystać jako nośniki do immobilizacji enzymów, nośniki leków lub w chromatografii powinowactwa i żelowej oraz w procesach bioseparacji.

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1 Materiały użyte podczas syntezy polimerów i badania ich właściwości

W tabeli 1 zebrano monomery, środki sieciujące i inne odczynniki użyte do syntezy jonitów i nośników do immobilizacji enzymów.

Tabela 1 Odczynniki użyte podczas syntezy jonitów.

<i>Nazwa</i>	<i>Producent</i>
N-izopropylakryloamid (NIPAAm) $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Aldrich
2-metakryloilooksyetylofosforan (MEP) $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$	Aldrich
metakrylan 2-hydroksyetylu (HEMA) $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$	Serva
metakrylan glicydyłu (GMA) $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$	Aldrich
kwask metakrylowy (MA) $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{OH}$	Aldrich
metakrylan 2-aminoetylu (AEMA) $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Aldrich
Nadtlenek benzoilu $(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO})_2\text{O}_2$	Benzyl, Skarżysko Kamienna
AIBN $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CN})\text{N}=\text{NC}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$	Aldrich
Toluen $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	POCh
Polialkohol winylowy GH-23	Tokyo, Osaka, Japan
Chlorek wapnia $\text{CaCl}_2$	POCh
Etylenodiamina $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$	Aldrich

W tabeli 2 zebrano nośniki i odczynniki użyte podczas sorpcji metali termoczułych żywicach.

**Tabela 2 Spis jonitów i odczynników wykorzystanych podczas oznaczania zdolności jonowymiennych**

<i>Nazwa</i>	<i>Producent</i>
Nośnik TP8	Synteza w ramach pracy doktorskiej
Nośnik TP12	Synteza w ramach pracy doktorskiej
Nośnik TPT*	Synteza w ramach pracy doktorskiej
Nośnik TPT	Synteza w ramach pracy doktorskiej
Nośnik TP12	Synteza w ramach pracy doktorskiej
Kwas azotowy HNO <sub>3</sub>	POCh
Azotan potasu KNO <sub>3</sub>	POCh
Azotan miedzi Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x3H <sub>2</sub> O	POCh
Azotan europu Eu(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x5H <sub>2</sub> O	Aldrich
Chlorek potasu KCl	POCh
Azotan lantanu La(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x6H <sub>2</sub> O	Aldrich

Nośniki, enzymy i odczynniki użyte do immobilizacji i oznaczania aktywności uzyskanych preparatów enzymatycznych zebrano w tabeli 3.

**Tabela 3 Spis nośników i innych materiałów wykorzystanych podczas immobilizacji enzymów**

<i>Nazwa</i>	<i>Producent</i>
Nośnik TH8	Synteza w ramach pracy doktorskiej
Nośnik THN	Synteza w ramach pracy doktorskiej
Nośnik TG8	Synteza w ramach pracy doktorskiej

Nośnik T8	Synteza w ramach pracy doktorskiej
Nośnik TH8-NH <sub>2</sub>	Modyfikacja w ramach pracy doktorskiej
Nośnik TG8-NH <sub>2</sub>	Modyfikacja w ramach pracy doktorskiej
Nośnik TMA	Synteza w ramach pracy doktorskiej
Nośnik TAEMA	Synteza w ramach pracy doktorskiej
Inwertaza, proszek IV090004 EC 3.2.1.26	Novo Nordisk
Glukoamylaza, ciecz EC 3.2.1.3	Novo Nordisk
Trypsyna EC 3.4.21.4	Przygotowano według metody Wilimowskiej [157]
Trihydroksymetyloaminometan (Tris)	Sigma
Aldehyd glutarowy (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CHO) <sub>2</sub>	Sigma
Diwinylosulfon (CH <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	Aldrich
1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyllo) karobodiimid C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub>	Aldrich
Zestaw do oznaczania stężenia białka metodą Lowry'ego (P 5656)	Sigma
Zestaw do oznaczania stężenia glukozy (Glukoza EO)	POCh
Skrobia rozpuszczalna	Aldrich
Maltoza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Aldrich
Sacharoza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Aldrich

Chlorowodorek p-nitroanilidu N $\alpha$ -benzoilo-DL-argininy (BAPNA) $C_{19}H_{22}N_6O_4 \cdot HCl$	Sigma
Kazeina	Park (UK)
DMSO $(CH_3)_2SO$	Aldrich
Kwas octowy $CH_3COOH$	POCh
Octan sodu $CH_3COONa$	POCh
Kwas solny $HCl$	POCh
Chlorek wapnia $CaCl_2$	POCh
Fosforan potasu jednozasadowy $KH_2PO_4$	POCh
Fosforan sodu dwuzasadowy $Na_2HPO_4$	POCh
Kwas borowy $H_3BO_3$	POCh
Czteroboran sodu $Na_2B_4O_7$	POCh

## 3.2 Polimeryzacja suspensyjna

### 3.2.1 Synteza jonitów

Wszystkie jonity zsyntetyzowano metodą polimeryzacji suspensyjnej w termostatowanym reaktorze szklanym o pojemności 1,5 dm<sup>3</sup> zaopatrzonym w mieszadło z tyrystorową regulacją obrotów. Reakcję prowadzono przez 6 godzin, przy czym w pierwszej godzinie reakcja przebiegała w 60°C, w drugiej godzinie – w 70°C, a następnie temperaturę zwiększono do 85°C i pozostawiono bez zmian do końca reakcji. W skład fazy wodnej wchodziły: 700 ml wody destylowanej, 35 g chlorku wapnia (5% fazy wodnej) oraz stabilizator suspensji – poli(alkohol winylowy) w ilości 0,6 g (1% fazy organicznej). Składy faz organicznych zebrano w tabeli 4. Fazę organiczną wlewano do ogrzanej do temperatury 60°C fazy wodnej i utrzymywano obroty w granicach 180-240 na minutę.

Tabela 4 Składy faz organicznych

<i>Nazwa</i>	<i>Skład</i>
<b>TP8</b>	NIPAAm/MEP/EGDMA 28,65 g/ 26,60 g/ 4,8 g
<b>TP12</b>	NIPAAm /MEP/EGDMA 28,65 g/ 26,60 g/ 6,63 g
<b>TPT*</b>	NIPAAm /MEP/TEGDMA 28,65 g/ 26,62 g/ 4,42 g
<b>TPT</b>	NIPAAm /MEP/TEGDMA 27,06 g/ 25,22 g/ 7,15 g
<b>TP3F</b>	NIPAAm /MEP/TMPMA 28,06 g/ 26,06 g/ 5,35 g

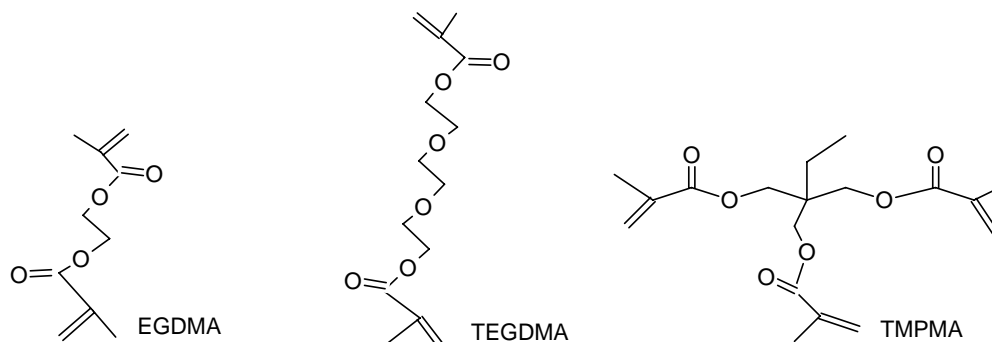
Stosunek molowy komonomerów: (NIPAAm:komonomer odpowiedzialny za wymianę jonową) wynosił 2:1 dla wszystkich jonitów. Jako inicjatora użyto nadtlenu benzoilu w ilości 0,5% wag. fazy organicznej, a jako rozpuszczalnika –



tolenu, w ilości 20% wag. fazy organicznej. Otrzymany produkt oczyszczano wodą i acetonem, a po wysuszeniu ekstrahowano toluenem.

### 3.2.2 Struktury użytych środków sieciujących

Na rysunku 22 przedstawiono struktury dimetakrylanu glikolu etylenowego (EGDMA), dimetakrylanu glikolu trietylenowego (TEGDMA) i trimetakrylanu 2-etylo-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiolu (TMPMA).



Rysunek 22 *Struktury środków sieciujących*

### 3.2.3 Synteza nośników do immobilizacji enzymów

Wszystkie nośniki zsyntetyzowano metodą polimeryzacji suspensyjnej w termostatowanym reaktorze szklanym o pojemności 1,5 dm<sup>3</sup> zaopatrzonym w mieszadło z tyrystorową regulacją obrotów. Reakcję prowadzono przez 6 godzin, przy czym w pierwszej godzinie reakcja przebiegała w 60°C, w drugiej godzinie – w 70°C, a następnie temperaturę zwiększono do 85°C i pozostawiono bez zmian do końca reakcji. W przypadku nośników TH8, THN, TG8, T8 w skład fazy wodnej wchodziły: 700 ml wody destylowanej, 35 g chlorku wapnia (5% fazy wodnej) oraz stabilizator suspensji – poli(alkohol winylowy) w ilości 0,6 g (1% fazy organicznej). W przypadku nośników TMA i TAEMA skład fazy wodnej uległ zmianie – zawartość chlorku wapnia stanowiła 50% jej masy. W przypadku nośnika TAEMA zwiększono dodatkowo ilość stabilizatora suspensji do 2% fazy organicznej. Składy faz organicznych dla poszczególnych nośników zostały zebrane w tabeli 5. Fazę organiczną wlewano do ogrzanej do temperatury 60°C fazy wodnej i utrzymywano obroty w granicach 180-260 na

minutę dla nośników TH8, THN, TG8 i T8 oraz 360-500 obrotów na minutę dla nośników TMA i TAEMA.

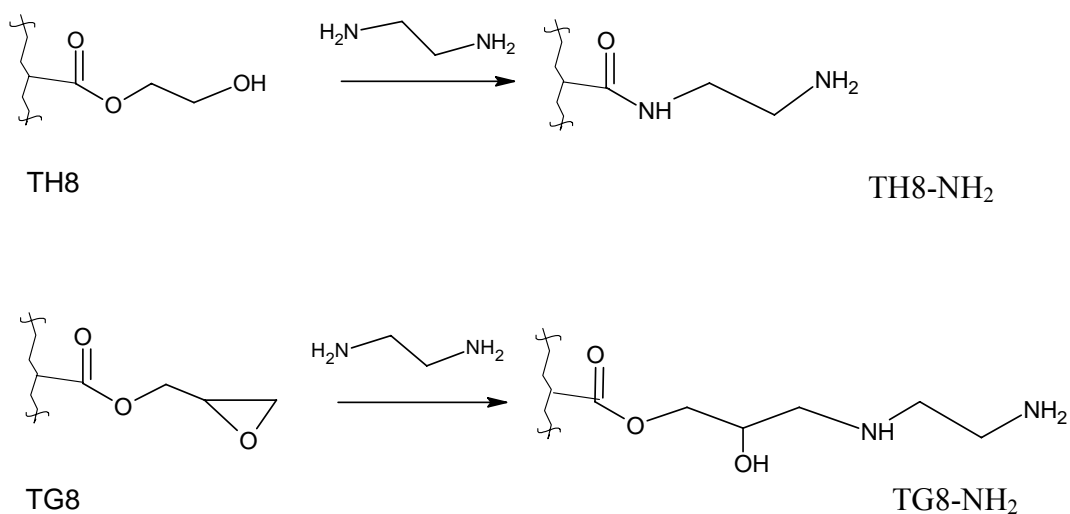
**Tabela 5 Składy faz organicznych**

<i>Nazwa</i>	<i>Skład</i>
<b>TH8</b>	NIPAAm /HEMA/EGDMA 34,82 g/ 20,02 g/ 4,8 g
<b>THN</b>	NIPAAm /HEMA/TEGDMA 34,93 g/ 20,12 g/ 4,8 g
<b>TG8</b>	NIPAAm /GMA/EGDMA 34,79 g/ 21,89 g/ 4,8 g
<b>T8</b>	NIPAAm /EGDMA 46,0 g/ 4,0 g
<b>TMA</b>	NIPAAm /MA/EGDMA 39,61 g/ 15,07 g/ 4,8 g
<b>TAEMA</b>	NIPAAm /AEMA/EGDMA 48,66 g/ 11,92 g/ 4,85 g

Stosunek molowy NIPAAm:komonomer z grupą funkcyjną wynosił 2:1 dla następujących nośników: TH8, THN, TG8, T8 i TMA. Dla nośnika TAEMA stosunek molowy NIPAAm:komonomer z grupą funkcyjną wynosił 6:1. Jako inicjatora użyto nadtlenu benzoilu w ilości 0,5% wag. fazy organicznej dla nośników TH8, THN, TG8 i T8. Dla nośnika TAEMA ilość nadtlenu benzoilu wynosiła 3% wag. fazy organicznej, natomiast podczas syntezy TMA inicjatorem był AIBN w ilości 1% wag. fazy organicznej. Jako rozpuszczalnika użyto toluenu, w ilości 20% wag. fazy organicznej. Otrzymany produkt oczyszczano wodą i acetonem, a po wysuszeniu ekstrahowano toluenem.

### 3.2.4 Modyfikacja etylenodiaminą

Kopolimery TH8 i TG8 zostały poddane aminolizie w celu wprowadzenia grup aminowych i uzyskania w rezultacie bardziej hydrofilowej powierzchni, co powinno zwiększyć wydajność immobilizacji i aktywność preparatów enzymatycznych. TH8 był modyfikowany etylenodiaminą w temperaturze wrzenia przez 4 godziny. Natomiast modyfikacja TG8 trwała 7 dni i przebiegała w temperaturze pokojowej. Rysunek 23 przedstawia schemat modyfikacji.



Rysunek 23 Schemat modyfikacji etylenodiaminą nośników do immobilizacji enzymów

### 3.3 Charakterystyka otrzymanych polimerów

#### 3.3.1 Oznaczanie azotu – metoda Kjeldahla

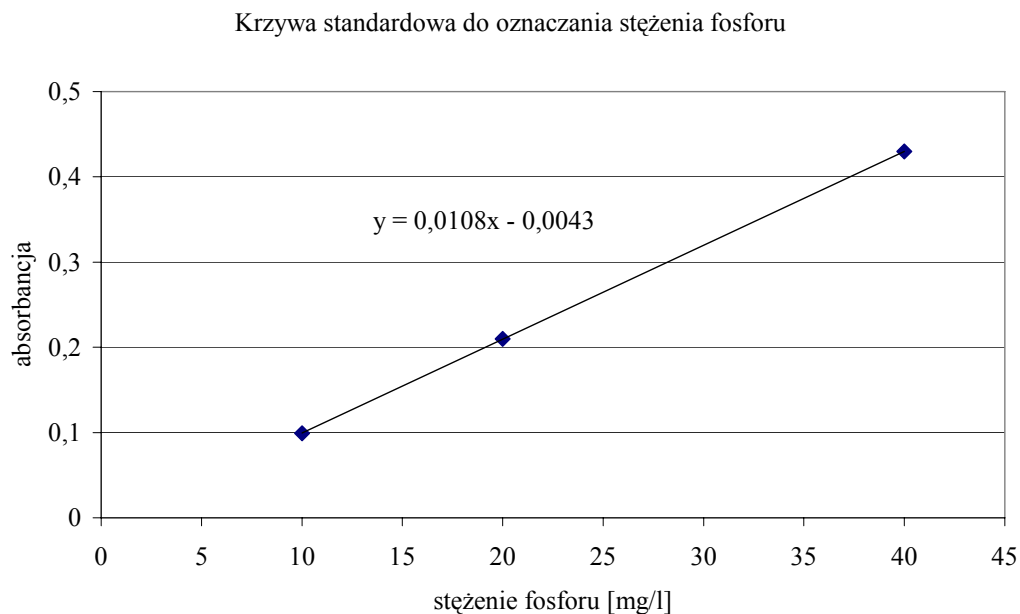
Okolo 0,2 g polimeru, odważonego z dokładnością 0,0001 g umieszczono w probówce, dodano 0,3 – 0,4 g siarczanu miedzi, okolo 0,8 – 1,0 g siarczanu potasu i 20 cm<sup>3</sup> stężonego kwasu siarkowego (96-98%). Kolbę zamykano i ogrzewano do utlenienia polimeru, następnie ochłodzono. Po ochłodzeniu do kolby dodano 40 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i w małych ilościach 35% NaOH do momentu zabarwienia się roztworu na kolor brunatny. Destylowano z parą wodną (destylatorka Büchi K-314), proces destylacji trwał ok. 4 minut. W tym czasie następowało pochłonięcie wydzielającego się amoniaku przez kwas borowy (okolo 60 cm<sup>3</sup>) umieszczony w kolbie stożkowej (odbieralnik). Następnie otrzymany w kolbie stożkowej roztwór miareczkowano 0,1M HCl do momentu zmiany barwy wskaźnika z zielonej na brunatno-szarą – roztwór zieleni bromokrezolowej i czerwieni metylowej w 2% kwasie borowym. Zawartość azotu obliczano ze wzoru:

$$Z_N \text{ [mmol/g suchego polimeru]} = [(V_0 - V_x) * N_0] / m_{\text{sucha}}$$

gdzie:  $V_0$ ,  $V_x$  – objętość roztworu kwasu solnego zużytego na zmiareczkowanie odpowiednio ślepej próby i badanego roztworu [cm<sup>3</sup>],  $N_0$  – miano roztworu kwasu solnego [mol/dm<sup>3</sup>],  $m_{\text{sucha}}$  – masa suchego jonitu [g].

#### 3.3.2 Oznaczanie fosforu

Okolo 0,02 g polimeru, odważonego z dokładnością 0,0001 g umieszczono w probówce i dodano 15 cm<sup>3</sup> stężonego kwasu siarkowego (96-98%). Kolbę zamykano i ogrzewano do utlenienia polimeru. Po ochłodzeniu przenoszono jej zawartość ilościowo do kolby 100 cm<sup>3</sup>. Następnie pobrano 5 cm<sup>3</sup> roztworu i dodano 3,5 cm<sup>3</sup> kwasu nadchlorowego, 4,5 cm<sup>3</sup> świeżo przygotowanego roztworu amidolowego oraz 3,5 cm<sup>3</sup> 0,45M molibdenianu amonu, uzupełniono wodą do 50 cm<sup>3</sup>. Po 30 minutach próbki oznaczono spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda=700$  nm. Stężenie fosforu w próbce ( $Z_p$ ) obliczono korzystając z równania krzywej standardowej przedstawionej na rysunku 24.



**Rysunek 24** *Krzywa standardowa do oznaczania stężenia fosforu*

### 3.3.3 Grupy epoksydowe

Ok. 0,5 g suchego polimeru zalano 10 cm<sup>3</sup> 48% roztworu bromowodoru i zostawiono na 24 godziny. Następnie odmyto nośnik wodą destylowaną i wysuszono. Kolejnym etapem było spalenie próbek (20-30 mg) w tlenie: zapakowane w bibułki i owinięte drutem platynowym próbki spalono w tlenie w kolbach z 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i zostawiono na 30 minut w celu pochłonięcia par. Następnie dodano 5 cm<sup>3</sup> 2M HNO<sub>3</sub>, 10 cm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub> i miareczkowano 0,1M NH<sub>4</sub>SCN w obecności wskaźnika FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

### 3.3.4 Chłonność

Oznaczanie chłonności wykonano metodą wirówkową [158]. Próbkę polimeru w ilości około 0,5 g spęczniano przez 24h w wodzie. Spęczniony polimer przenoszono do nuczki szkalnej i wirowano przez 5 minut przy częstotliwości 3000 obrotów/minutę w wirówce laboratoryjnej typu MPW-360 dla usunięcia rozpuszczalnika z przestrzeni między ziarnami.

Po zakończeniu wirowania zawartość nuczek szklanych przenoszono do uprzednio zważonych naczynek wagowych ( $\pm 0,0001$  g). Ważono i suszono na powietrzu do stałej masy. Chłonność wody wyznaczano z zależności:

$$W [\text{g H}_2\text{O/g suchego polimeru}] = (m_s - m_d) / m_d$$

gdzie:  $m_s$  – masa spęcznionego polimeru [g],  $m_d$  – masa suchego polimeru [g].

### 3.3.5 Objętość właściwa polimeru i zawartość polimeru w żelu

Spęczniony polimer o znanej objętości odwirowano (5 minut, 3000 obrotów/minutę), zważono w naczynku wagowym, wysuszono i ponownie zważono. Na podstawie uzyskanej wartości suchej masy obliczono z proporcji objętość 1 g suchego polimeru.

Zawartość polimeru w żelu obliczono ze wzoru:

$$\% \text{ polimeru w spęcznionym żelu} = (m_d / m_s) * 100\%$$

gdzie:  $m_s$  – masa spęcznionego polimeru [g],  $m_d$  – masa suchego polimeru [g].

Maksymalną zmianę objętości właściwej w temperaturze powyżej VPPT obliczono ze wzoru:

$$V_{\text{max}} [\text{cm}^3/\text{g suchego polimeru}] = V_0 - V_x$$

$$\text{Zmiana objętości właściwej } [\%] = [(V_0 - V_x) / V_0] * 100$$

gdzie:  $V_0$  – objętość właściwa polimeru w temperaturze pokojowej (poniżej VPPT) [ $\text{cm}^3/\text{g}$ ],  $V_x$  – objętość właściwa polimeru w temperaturze powyżej VPPT [ $\text{cm}^3/\text{g}$ ].

### 3.3.6 Pojemność kwasowa

Okolo 0,5 g suchego polimeru zalano 50  $\text{cm}^3$  0,1M NaOH, zostawiono na dwie doby, a następnie nadmiar wodorotlenku sodu odmiareczkowano 0,1M HCl wobec fenoloftaleiny. Pojemność kwasową obliczono ze wzoru:

$$Z [\text{mmol/g suchego polimeru}] = (C_z V_z - C_k V_k) / (m_d * \% \text{ polimeru w spęcznionym żelu})$$

gdzie:  $C_z$  – stężenie zasady [ $\text{mmol}/\text{cm}^3$ ],  $V_z$  – objętość zasady [ $\text{cm}^3$ ],  $C_k$  – stężenie kwasu [ $\text{mmol}/\text{cm}^3$ ],  $V_k$  – objętość kwasu [ $\text{cm}^3$ ],  $m_d$  – masa spęcznionego polimeru [g].

### 3.3.7 Oznaczanie grup aminowych

Zastosowano zmodyfikowaną metodę Heckera [159,160]. Nośnik po aminolizie i cyklowaniu przemyto 1M HCl, następnie odmywano go 0,001M HCl

aż do uzyskania pH 3. Wyznaczono chłonność nośnika w 0,001M HCl. Następnie próbkę polimeru o znanej masie przeniesiono do kolumny i odmywano 5% roztworem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w stężonym amoniaku. Przesącz zbierano do kolby miarowej o pojemności 500 cm<sup>3</sup>. Następnie oznaczono zawartość chlorków metodą Volharda.

(50 cm<sup>3</sup> przesączu + 5 cm<sup>3</sup> 2N HNO<sub>3</sub> + 10 cm<sup>3</sup> 0,1M AgNO<sub>3</sub> + 2 cm<sup>3</sup>1 wskaźnika FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> miareczkowano 0,1M NH<sub>4</sub>SCN do zmiany barwy na koniakową)

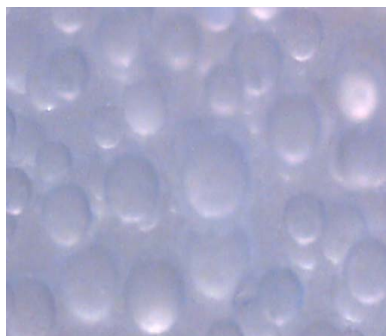
Stężenie grup aminowych obliczono ze wzoru:

$$Z_{\text{NH}_2} [\text{mmol/g suchego polimeru}] = [(10 - V_x) * 0,1 * 500 / 50] / m_d$$

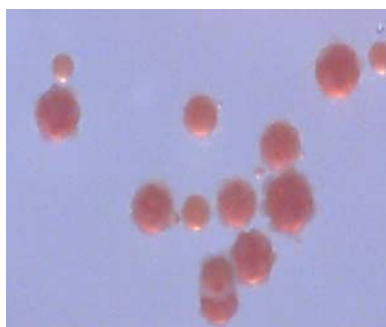
gdzie:  $V_x$  – objętość rodu amonu [cm<sup>3</sup>],  $m_d$  – masa suchego polimeru [g].

### 3.3.8 Jakościowe oznaczanie grup aminowych

Oznaczenie polega na reakcji z aldehydem glutarowym. Użyto roztworu o stężeniu 2,5%, w buforze fosforanowym pH 7,0. Bezbarwny nośnik z grupami aminowymi (fotografia 1) pod wpływem reakcji tych grup z aldehydem glutarowym zmienia barwę na żółtą, przy czym intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do ilości grup aminowych i przy dużej zawartości tych grup nośnik może zabarwiać się na pomarańczowo (fotografia 2).



Fotografia 1 TG8-NH<sub>2</sub> przed reakcją z aldehydem (A. Hamerska-Dudra)



Fotografia 2 TG8-NH<sub>2</sub> po reakcji z aldehydem (A. Hamerska-Dudra)

### 3.3.9 Wyznaczenie temperatury objętościowej przemiany fazowej (VPTT)

- w wodzie

0,4 g suchego kopolimeru spęczniono w temperaturze pokojowej wodą destylowaną w cylindrze miarowym o objętości 10 cm<sup>3</sup> przez 24 godziny. Następnie próbkę wstawiono do cieplarki i co 2 godziny podwyższano temperaturę o 1,0 lub 2,0°C, a zmianę objętości notowano i przeliczano według wzoru:

$$V_{\text{właściwa}} [\text{cm}^3/\text{g}] = V_{\text{w danej temperaturze}} [\text{cm}^3] / \text{masa polimeru} [\text{g}]$$

- w roztworach kwasu azotowego

0,4 g suchego kopolimeru spęczniono w temperaturze pokojowej wodą destylowaną w cylindrze miarowym o objętości 10 cm<sup>3</sup> przez 24 godziny. Po spęcznieniu i zanotowaniu uzyskanej objętości zastępowano wodę odpowiednim roztworem kwasu azotowego i zostawiano próbkę na 30 minut. Następnie próbkę wstawiono do cieplarki i co 2 godziny podwyższano temperaturę o 1,0 lub 2,0°C, a zmianę objętości notowano i przeliczano według wzoru:

$$V_{\text{właściwa}} [\text{cm}^3/\text{g}] = V_{\text{w danej temperaturze}} [\text{cm}^3] / \text{masa polimeru} [\text{g}]$$

- w buforze fosforanowym 0,1M i 0,5M o pH 7,0

Próbki nośników do immobilizacji spęczniano najpierw w wodzie destylowanej w temperaturze pokojowej w cylindrach miarowych o objętości 10 cm<sup>3</sup> przez 24 godziny, następnie wodę w odpowiednich próbkach zastępowano buforem fosforanowym 0,1M lub 0,5M. Po około 30 minutach odczytywano objętości, a następnie wszystkie próbki wstawiano do cieplarki i co 2 godziny podwyższano temperaturę o 1,0 lub 2,0°C, a zmiany objętości notowano.

### 3.3.10 Miareczkowanie pH-metryczne

5,0046 g spęcznionego polimeru TP8 zalano 25 cm<sup>3</sup> roztworu KCl i co 45 minut dodawano po 50 µl 0,1M NaOH. Wartości pH odczytywano co 15 minut. Pomiar prowadzono w temperaturze 25°C.



---

### 3.4 Sorpcja metali na jonitach

#### 3.4.1 Sorpcja europu

Przygotowano roztwór jonów metali:  $10^{-4}$ M azotan europu w roztworze  $\text{HNO}_3$  (pH 2, 3 i 4). Odważono spęcznione nośniki tak, aby był 10-krotny nadmiar grup fosforanowych w stosunku do sorbowanych metali. Próbki polimeru zalewano  $20 \text{ cm}^3$  roztworu i zostawiano w odpowiednich temperaturach na 24 godziny. Następnie pobierano po  $5 \text{ cm}^3$  próbek do analizy metodą atomowej spektroskopii absorpcyjnej (ASA). Do każdej próbki dodano  $75 \mu\text{l}$  8M KCl, który zapobiega jonizacji europu. Pomiar wykonywano na spektrofotometrze Perkin-Elmer AAnalyst przy długości fali  $\lambda=459,4 \text{ nm}$ . Jako odnośnika użyto roztworu kwasu azotowego o odpowiednim pH.

#### 3.4.2 Sorpcja miedzi

Przygotowano roztwór jonów metali:  $10^{-4}$ M azotan miedzi w roztworze  $\text{HNO}_3$  (pH 2, 3 i 4). Odważono spęcznione nośniki tak, aby był 10-krotny nadmiar grup fosforanowych w stosunku do sorbowanych metali. Próbki polimeru zalewano  $20 \text{ cm}^3$  roztworu i zostawiano w odpowiednich temperaturach na 24 godziny. Następnie pobierano po  $5 \text{ cm}^3$  próbek do analizy metodą ASA. Pomiar wykonywano przy długości fali  $\lambda=327,4 \text{ nm}$ . Jako odnośnika użyto roztworu kwasu azotowego o odpowiednim pH.

#### 3.4.3 Sorpcja potasu

Przygotowano roztwór jonów metali:  $10^{-4}$ M azotan potasu w roztworze  $\text{HNO}_3$  (pH 2, 3 i 4). Odważono spęcznione nośniki tak, aby był 10-krotny nadmiar grup fosforanowych w stosunku do sorbowanych metali. Próbki polimeru zalewano  $20 \text{ cm}^3$  roztworu i zostawiano w odpowiednich temperaturach na 24 godziny. Następnie pobierano po  $5 \text{ cm}^3$  próbek do analizy metodą ASA. Do każdej próbki dodano  $100 \mu\text{l}$  10% roztworu  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Pomiar wykonywano przy długości fali  $\lambda=766,5 \text{ nm}$ . Jako odnośnika użyto roztworu kwasu azotowego o odpowiednim pH.

### 3.4.4. Obliczanie parametrów sorpcji jonów

Wartość sorpcji jonu na polimerze wyrażoną jako ilość milimoli jonu zasorbowanego na jednostkę masy polimeru oblicza się z zależności:

$$S_A \text{ [mmol/g]} = [(C_0 - C_x) * V * (W + 1)] / m_s$$

gdzie:  $S_A$  – wartość sorpcji jonu  $A$  [mmol/g],  $c_0$  – stężenie początkowe jonu, [mmol/dm<sup>3</sup>],  $c_x$  – stężenie jonu po sorpcji [mmol/dm<sup>3</sup>],  $V$  – objętość roztworu [dm<sup>3</sup>],  $W$  – chłonność rozpuszczalnika przez polimer [g<sub>rozpuszczalnika</sub>/g<sub>suchego polimeru</sub>],  $m_s$  – masa spęcznionego polimeru [g].

Współczynnik podziału jonu pomiędzy polimer a roztwór definiuje się jako stosunek ilości jonu zasorbowanego przez jednostkę masy polimeru do ilości jonu w takiej samej jednostce masy roztworu po sorpcji:

$$K_A = (S_A * \rho_R) / C_x$$

gdzie:  $K_A$  - współczynnik podziału jonu, bezwymiarowy,  $S_A$  – wartość sorpcji jonu  $A$  [mmol/g],  $c_x$  – stężenie jonu po sorpcji [mmol/dm<sup>3</sup>],  $\rho_R$  – gęstość rozpuszczalnika [g/dm<sup>3</sup>].

Współczynnik selektywności polimeru wobec pary jonów oblicza się jako stosunek współczynnika podziału jednego jonu do współczynnika podziału drugiego jonu:

$$S = K_{A1} / K_{A2}$$

gdzie:  $S$  – współczynnik selektywności polimeru wobec pary jonów  $A1$  i  $A2$ , bezwymiarowy,  $K_{A1}$  – współczynnik podziału jonu  $A1$ , bezwymiarowy,  $K_{A2}$  – współczynnik podziału jonu  $A2$ , bezwymiarowy.

### 3.4.5 Wpływ rodzaju środka sieciującego na sorpcję

Aby zbadać wpływ rodzaju środka sieciującego na sorpcję metali przez termoczulý kopolimer porównano ze sobą wyniki uzyskane dla następujących jonitów: TP8, TPT i TP3F, które były usieciowane odpowiednio: dimetakrylanem glikolu etylenowego, dimetakrylanem glikolu trietylenowego i trimetakrylanem 2-etylo-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiolu. Struktury środków sieciujących przedstawiono w paragrafie 3.4.2. Zawartość środka sieciującego była stała dla poszczególnych kopolimerów i odpowiadała 5,9% molowym grup winylowych.

### 3.4.6 Wpływ ilości środka sieciującego na sorpcję

W celu zbadania wpływu ilości użytego środka sieciującego na sorpcję wybranych jonów metali na termoczulych nośnikach wybrano następujące jonity: TP8 i TP12 oraz TPT\* i TPT. Jonity TP8 i TP12 były usieciowane dimetakrylanem glikolu etylenowego, którego zawartość wynosiła odpowiednio: 5,9 i 8,0% molowych grup winylowych, natomiast jonity TPT\* i TPT usieciowano dimetakrylanem glikolu trietylenowego, którego zawartość wynosiła 4,0 i 5,9% molowych grup winylowych.

### 3.4.7 Kinetyka sorpcji europu i miedzi

Przygotowano roztwór jonów metali:  $10^{-4}$ M azotan metalu w roztworze  $\text{HNO}_3$  (pH 2, 3 i 4). Odważono spęcznione nośniki tak, aby był 10-krotny nadmiar grup fosforanowych w stosunku do sorbowanych metali. Próbki polimeru zalano  $150 \text{ cm}^3$  odpowiedniego roztworu. Próbki ( $5 \text{ cm}^3$ ) pobrano po 3, 6, 9, 12, 20, 30, 60 minutach, a następnie co godzinę. Do każdej próbki z jonami europu dodano  $75 \mu\text{l}$  8M KCl, który zapobiega jonizacji metalu. Następnie próbki poddano analizie metodą atomowej spektroskopii absorpcyjnej (ASA). Europ oznaczono emisyjnie przy długości fali  $\lambda=459,4 \text{ nm}$ , miedź - absorpcyjnie przy długości fali  $\lambda=327,4 \text{ nm}$ . Jako odnośnika użyto roztoru kwasu azotowego o odpowiednim pH.

### 3.4.8 Rozdział lantanowców

Badania dotyczące rozdziału lantanowców zostały wykonane w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie, we współpracy z dr Bożeną Danko i z dr Zbigniewem Samczyńskim.

$0,3 \text{ g}$  suchego jonitu TP8 umieszczono w kolbce i dodano  $14,9 \text{ cm}^3$   $0,01\text{M}$  roztworu  $\text{HNO}_3$ , a następnie  $100 \mu\text{l}$   $0,01\text{M}$  roztworu  $\text{HNO}_3$  zawierającego radioaktywne pierwiastki:  $^{141}\text{Ce}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{160}\text{Tb}$ ,  $^{170}\text{Tm}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{133}\text{Ba}$  i  $^{134}\text{Cs}$ . Kolbkę termostatowano w temperaturze  $20^\circ\text{C}$  przez 6 godzin i pobrano  $200 \mu\text{l}$  próbki. Ilość zaadsorbowanych metali oznaczono metodą spektrometrii promieniowania gamma na spektrometrze TUKAN z detektorem Canberra. Kolbkę termostatowano następnie kolejno w temperaturach  $30$ ,  $40$ ,  $50$  i  $60^\circ\text{C}$  przez 6 godzin i wykonywano analogiczne pomiary w celu oznaczenia stężenia

zaadsorbowanych metali. W kolejnym etapie eksperymentu temperatura była obniżana w zakresie 60-20°C, przy czym kolbkę z jonitem i roztworem zawierającym radioaktywne pierwiastki w każdej temperaturze termostutowano przez 6 godzin, następnie pobierano próbkę do oznaczeń metodą spektrometrii promieniowania gamma. Na podstawie otrzymanych wyników obliczono współczynniki selektywności oraz wyznaczono wartości funkcji termodynamicznych: entropii, entalpii i entalpii swobodnej.

### 3.5 Charakterystyka preparatów enzymatycznych

Badania dotyczące immobilizacji enzymów na termoczulych nośnikach oraz aktywności otrzymanych preparatów enzymatycznych wykonano we współpracy z dr hab. Jolantą Bryjak, w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska.

#### 3.5.1 Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry'ego

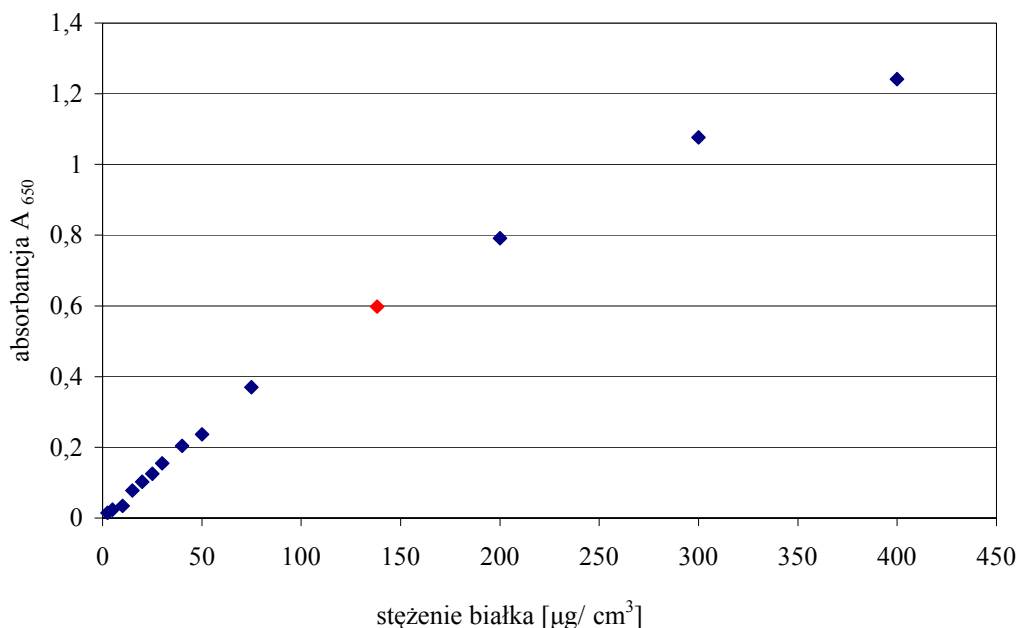
Metoda opiera się na reakcji dwuwartościowych jonów miedzi z wiązaniami peptydowymi. W wyniku tej reakcji powstają kompleksy miedzi i białka, następuje redukcja jonów miedzi  $\text{Cu}^{2+}$  do jonów  $\text{Cu}^+$ . W kolejnym etapie, po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej odczynnika Folina-Ciocalteu (kompleksu kwasów fosfomolibdenowego i fosfowolframowego) następuje powolna redukcja kompleksu przez jony  $\text{Cu}^+$  oraz przez obecne w białku reszty tyrozyny, tryptofanu i cysteiny, w rezultacie dochodzi do zmiany barwy roztworu na niebieską. Zmiana barwy jest proporcjonalna do ilości kompleksów miedziowo-białkowych, a tym samym do stężenia białka w badanej próbce. Intensywność barwy mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda=650$  nm [161].

Do 1 cm<sup>3</sup> próbki w probówce dodano 3 cm<sup>3</sup> świeżo przygotowanego odczynnika Lowry'ego ( $\text{CuSO}_4$ /cytrynian sodu w buforze  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaOH}$ ). Po dokładnie 20 minutach do próbki dodano 0,5 cm<sup>3</sup> odczynnika Folina-Ciocalteu i dobrze wymieszano. Próbkę zostawiono na 30 minut, a następnie zmierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda=650$  nm.

Stężenie białka w próbkach obliczono na podstawie krzywej standardowej, przedstawionej na rysunku 25, korzystając z następujących równań:

$$C = A_{650} * 201 - 1,65 \text{ (zakres liniowy dla absorbancji 0-0,25)}$$

$$C = (A_{650})^2 * 137,53 + A_{650} * 148,86 \text{ (zakres nieliniowy dla absorbancji 0,25-1,0)}$$



Rysunek 25 Krzywa standardowa do oznaczania stężenia białka metodą Lowry'ego

### 3.5.2 Aktywność inwertazy natywnej

Aktywność inwertazy oznaczano w obecności substratu – sacharozy. Przygotowano 175 mM roztwór enzymu w 0,05M buforze octanowym, pH 4,5. Reakcję prowadzono przez 5 minut w temperaturze 50°C, a następnie mierzono spektrofotometrycznie stężenie produktu – glukozy przy długości fali  $\lambda=670$  nm na spektrofotometrze Heliosa – Unicam. Na podstawie stężenia glukozy w próbce obliczono aktywność enzymu według wzoru:

$$\text{Akt [U]} = (\text{mmol glukozy} / \text{czas reakcji [min]}) * \text{rozcieńczenie} * V_{\text{roztwór}} [\text{cm}^3]$$

Jednostka aktywności enzymatycznej (U) – ilość enzymu powodująca uwolnienie 1 mM glukozy na minutę w warunkach reakcji.

Aktywność specyficzną białka obliczono na podstawie wzoru:

$$\text{Aktywność specyficzna [U/mg]} = \text{Akt [U]} / \text{masa enzymu [mg]}$$

### 3.5.3 Oznaczanie stężenia glukozy

Stężenie glukozy oznaczano metodą oksydaza glukoza – peroksydaza (zestaw Glukoza EO). Glukoza pod wpływem oksydazy glukozy (GOD, EC 1.1.3.4.) utlenia się do kwasu glukonowego z wytworzeniem nadtlenku wodoru. Reakcja przebiega w obecności peroksydazy (POD EC 1.11.1.7.) i chromogenu

(ABTS, sól sodowa kwasu 2,2'-azyno-di(3-etylo-benzotiazolino-6-sulfonowego)). Natężenie powstałego zabarwienia (zielone) jest proporcjonalne do stężenia glukozy w badanej próbce. Odczytu dokonuje się przy długości fali  $\lambda=670$  nm.

Odczytaną absorbancję przeliczono na stężenie glukozy na podstawie absorbancji standardu glukozy o stężeniu 5 mM.

#### 3.5.4 Aktywność glukoamylazy natywnej

Do 1 cm<sup>3</sup> enzymu w 0,05M buforze octanowym o pH 4,5 dodano 1 cm<sup>3</sup> 2,5% zżelowanej skrobi (15 minut w 100°C, ciągle mieszanie) lub 1 cm<sup>3</sup> 2,5% maltozy w 0,05M buforze octanowym o pH 4,5. Po 5 minutach inkubacji w 50°C pobrano 20  $\mu$ l próbki i dodano do 2,5 cm<sup>3</sup> roztworu do oznaczania stężenia glukozy metodą oksydaza glukozy – peroksydaza (zestaw Glukoza EO). Po 30 minutach rozwijania barwy w temperaturze pokojowej zmierzono absorbancję próbki przy długości fali  $\lambda=670$  nm. Stężenie glukozy obliczono na podstawie absorbancji standardu glukozy o stężeniu 5 mM, a następnie wyznaczono aktywność enzymu korzystając ze wzoru:

$$\text{Akt [U]} = (\text{mmol glukozy} / \text{czas reakcji [min]}) * \text{rozcieńczenie} * V_{\text{roztwór}} [\text{cm}^3]$$

#### 3.5.5 Aktywność trypsyny natywnej

Aktywność trypsyny oznaczono metodą Kunitz'a [162] w obecności 1,0% kazeiny w 0,2M buforze Tris-HCl o pH 8,0 w temperaturze 37°C. Do 1 cm<sup>3</sup> enzymu dodano 1 cm<sup>3</sup> kazeiny, hydrolizę substratu prowadzono w termostatowanym reaktorze. Po 10 minutach reakcji do 2 cm<sup>3</sup> próbki dodano 3 cm<sup>3</sup> kwasu trichlorooctowego z octanem sodu. Po 20 minutach ekstrakcji produktów hydrolizy próbkę odwirowano (15 minut, 10000 obrotów/minutę). Absorbancję produktów hydrolizy rozpuszczonych w kwasie trichlorooctowym zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda=280$  nm wobec wody. Równolegle przygotowano próbkę kontrolną zawierającą 1 cm<sup>3</sup> kazeiny, 1 cm<sup>3</sup> buforu 0,05M Tris-HCl z 1mM CaCl<sub>2</sub> o pH 8,0 i 3 cm<sup>3</sup> kwasu trichlorooctowego z octanem sodu, którą poddano analogicznej procedurze jak próbkę do oznaczania aktywności. Aktywność obliczono ze wzoru:

$$\text{Akt [U]} = [(A_{280} - \text{kontrola}) / \Delta t] * \text{rozcieńczenie} * V_{\text{roztwór}} [\text{cm}^3]$$





### 3.5.7 Aktywność nośników z immobilizowaną glukoamylazą

1–2 cm<sup>3</sup> nośnika zawieszonego w 0,05M buforze octanowym o pH 4,5 umieszczono w termostatowanym reaktorze w temperaturze 50°C. Następnie dodano 10 cm<sup>3</sup> substratu (skrobia lub maltoza). Po określonym czasie pobrano próbki i oznaczono w nich stężenie glukozy, na podstawie którego obliczono aktywność preparatu korzystając ze wzoru:

$$\text{Akt [U/cm}^3\text{]} = (\text{mmol glukozy/czas reakcji [min]}) * V \text{ reaktora [cm}^3\text{]} / V_{\text{nośnik [cm}^3\text{]}}$$

### 3.5.8 Aktywność nośników z immobilizowaną trypsyną

1 cm<sup>3</sup> nośnika zawieszonego w 9 cm<sup>3</sup> 0,05M buforze Tris-HCl z 1mM CaCl<sub>2</sub> o pH 8,0 umieszczono w termostatowanym reaktorze w temperaturze 25°C dla BAPNA lub 37°C dla kazeiny.

Hydroliza BAPNA: 500 µl 80mM substratu w DMSO dodano do reaktora i po określonym czasie reakcji pobrano 1050 µl próbki, do której dodano 2 cm<sup>3</sup> 30% kwasu octowego. Zmianę absorbancji zmierzono przy długości fali λ=410 nm w obecności ślepej próbki (50 µl BAPNA, 1 cm<sup>3</sup> buforu Tris-HCl, 2 cm<sup>3</sup> 30% CH<sub>3</sub>COOH). Aktywność obliczono ze wzoru:

$$\text{Akt [U/cm}^3\text{]} = (A_{410} / t) * V \text{ reaktora [cm}^3\text{]} / V_{\text{nośnik [cm}^3\text{]}}$$

Hydroliza kazeiny: 10 cm<sup>3</sup> 1,0% substratu dodano do reaktora. Po określonym czasie pobrano 2 cm<sup>3</sup> próbki z reaktora, do której dodano 3 cm<sup>3</sup> kwasu trichlorooctowego z octanem sodu. Próbki zostawiono w temperaturze pokojowej, aby produkty hydrolizy rozpuściły się w kwasie trichlorooctowym, a następnie odwirowano (15 minut, 10000 obrotów/minutę) i zmierzono absorbancję przy długości fali λ=280 nm wobec wody. Równolegle przygotowano próbkę kontrolną zawierającą 1 cm<sup>3</sup> kazeiny, 1 cm<sup>3</sup> buforu 0,05M Tris-HCl z 1mM CaCl<sub>2</sub> o pH 8,0 i 3 cm<sup>3</sup> kwasu trichlorooctowego z octanem sodu, którą poddano analogicznej procedurze jak próbkę do oznaczania aktywności. Aktywność obliczono ze wzoru:

$$\text{Akt [U/cm}^3\text{]} = [(A_{280} - \text{kontrola}) / \Delta t] * V \text{ reaktora [cm}^3\text{]} / V_{\text{nośnik [cm}^3\text{]}}$$

### 3.5.9 Aktywność nośników z immobilizowaną lakkazą

1 cm<sup>3</sup> nośnika zawieszono w 0,1M buforze octanowym o pH 5,23 umieszczono w termostatowanym reaktorze w temperaturze 30°C. Reakcję prowadzono w obecności syringaldazyny lub gwajakolu. Po określonym czasie mierzono zmianę absorbancji przy długości fali  $\lambda=525$  nm. Aktywność obliczono ze wzoru:

$$\text{Akt [U/cm}^3] = (\Delta A_{525} / \Delta t * 20) / V_{\text{nośnik [cm}^3]}$$

### 3.5.10 Stabilność preparatów enzymatycznych

Po 30 dniach przechowywania nośników w temperaturze 4°C w 0,05M buforze octanowym o pH 4,5 (nośniki z immobilizowaną inwertazą i glukoamylazą) lub w 0,001M HCl (nośniki z immobilizowaną trypsyną) mierzono ich aktywność. Wartość aktywności, która była mierzona bezpośrednio po immobilizacji przyjęto jako 100%.

$$\text{Stabilność [\%]} = (\text{Akt}_{\text{po miesiącu [U/cm}^3]} / \text{Akt}_{\text{po immobilizacji [U/cm}^3]}) * 100,$$

gdzie:  $\text{Akt}_{\text{po miesiącu}}$  – aktywność preparatu oznaczona po miesiącu przechowywania [U/cm<sup>3</sup>],  $\text{Akt}_{\text{po immobilizacji}}$  – aktywność preparatu oznaczona bezpośrednio po immobilizacji [U/cm<sup>3</sup>].

### 3.6 Immobilizacja inwertazy

#### 3.6.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH<sub>2</sub> i TG8-NH<sub>2</sub>

Przygotowano roztwór inwertazy o stężeniu 5 mg/cm<sup>3</sup> w 0,1M buforze fosforanowym o pH 7,0. Na 25 cm<sup>3</sup> nośnika dawano po 25 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu.

Przed immobilizacją wszystkie nośniki zostały umieszczone w termostatowanych reaktorach i były inkubowane w temperaturze 50°C (temperatura powyżej VPTT nośników). Roztwór inwertazy inkubowano w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie dodano do skurczonych nośników.

Proces immobilizacji prowadzono w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie wszystkie reaktory ochłodzono i dalej immobilizację prowadzono w temperaturze 4°C przez 1 godzinę. Po skończonej reakcji wszystkie nośniki podzielono na cztery części i odessano roztwór enzymu. Eluaty zostały zebrane w celu oznaczenia stężenia białka i jego aktywności po reakcji.

Kolejnym etapem było sieciowanie aldehydem glutarowym. Przygotowano roztwory aldehydu 0,5; 1,0 i 2,5% w 0,1M buforze fosforanowym, pH 7,0. Następnie do trzech części każdego nośnika dodano odpowiednie roztwory aldehydu, a do czwartej części dodano 0,1M bufor fosforanowy o pH 7,0. Po 15 minutach reakcji wszystkie nośniki przemyto trzykrotnie 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0. Aby zapobiec dalszemu sieciowaniu wszystkie nośniki zawieszono w 0,5M buforze Tris-HCl o pH 8,0. Tak przygotowane nośniki przechowywano w temperaturze 4°C.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono na podstawie stężenia i aktywności białka użytego do immobilizacji oraz stężenia i aktywności białka pozostałego po immobilizacji. W ten sposób wyznaczono bilans masy i aktywności inwertazy.

Wydajność immobilizacji obliczono zarówno dla ilości związanego białka, jak i jego aktywności według następujących wzorów:

$$\text{Wydajność [\%] (białko)} = (C_{\text{białko związane}} [\text{mg/cm}^3] / C_{\text{białko wyjściowe}} [\text{mg/cm}^3]) * 100$$

gdzie:  $C_{\text{białko związane}}$  – stężenie białka w preparacie po immobilizacji [mg/cm<sup>3</sup>],  
 $C_{\text{białko wyjściowe}}$  – stężenie białka danego do immobilizacji [mg/cm<sup>3</sup>].

---

Wydajność [%] (aktywność) =  $(Akt_{\text{immobilizowany enzym}} [U/cm^3] / Akt_{\text{oczekiwana}} [U/cm^3]) * 100$

gdzie:  $Akt_{\text{immobilizowany enzym}}$  – aktywność preparatu z immobilizowanym enzymem  $[U/cm^3]$ ,  $Akt_{\text{oczekiwana}}$  – teoretyczna aktywność preparatu z immobilizowanym enzymem  $[U/cm^3]$ .

### 3.6.2 „Ssanie” na nośniku T8

Przygotowano roztwór inwertazy o stężeniu 5 mg/ cm<sup>3</sup> w 0,1M buforze fosforanowym o pH 7,0. Na 20 cm<sup>3</sup> nośnika dawano po 20 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu.

Przed immobilizacją wszystkie nośniki zostały umieszczone w termostatowanych reaktorach i były inkubowane w temperaturze 50°C (temperatura powyżej VPTT nośników). Roztwór inwertazy inkubowano w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie dodano do skurczonych nośników.

Proces immobilizacji prowadzono w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie wszystkie reaktory ochłodzono i dalej immobilizację prowadzono w temperaturze 4°C przez 1 godzinę. Po skończonej reakcji wszystkie nośniki podzielono na cztery części i odessano roztwór enzymu.

Kolejnym etapem było sieciowanie aldehydem glutarowym. Przygotowano roztwory aldehydu 0,5; 1,0 i 2,5% w 0,1M buforze fosforanowym, pH 7,0. Następnie do trzech części każdego nośnika dodano odpowiednie roztwory aldehydu, a do czwartej części dodano 0,1M bufor fosforanowy o pH 7,0. Po 15 minutach reakcji wszystkie nośniki przemyto trzykrotnie 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0. Aby zapobiec dalszemu sieciowaniu wszystkie nośniki zawieszono w 0,5M buforze Tris-HCl o pH 8,0. Tak przygotowane nośniki przechowywano w temperaturze 4°C.

### 3.6.3 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach z grupami aminowymi: TAEMA, TG8-NH<sub>2</sub> i TH8-NH<sub>2</sub>

5 cm<sup>3</sup> spęcznionych nośników przemyto wodą destylowaną i 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0. W celu aktywacji grup aminowych nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> 2,5% roztworu aldehydu glutarowego w 0,1M buforze fosforanowym o pH 7,0 i mieszano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.

---

Następnie odmyto nadmiar aldehydu wodą i 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0.

Kolejnym etapem była immobilizacja białka. Przygotowano roztwór inwertazy o stężeniu 5 mg/ cm<sup>3</sup> w 0,1M buforze fosforanowym o pH 7,0. Nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu i proces immobilizacji prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie przeniesiono próbki do lodówki i zostawiono na 24 godziny.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto kolejno: 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0; 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0 z 0,5M NaCl; 0,05M buforem octanowym o pH 5,2. W celu zablokowania nieprzereagowanych aktywnych grup funkcyjnych nośniki zawieszono w 0,5M buforze Tris-HCl o pH 8,0 i wstawiono do lodówki na 24 godziny.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

#### **3.6.4 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami hydroksylowymi: TH8**

5 cm<sup>3</sup> spęcznionych nośników przemyto wodą destylowaną i 1M roztworem węglanu sodu o pH 11. Do aktywacji grup hydroksylowych wykorzystano metodę opisaną w [109]. 1 cm<sup>3</sup> diwinylosulfonu dodano kroplami do nośnika zawieszzonego w 10 cm<sup>3</sup> 1M roztworu węglanu sodu o pH 11 i mieszano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie odmyto nadmiar aktywatora wodą i 0,1M roztworem Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> z H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o pH 8,4.

Kolejnym etapem była immobilizacja białka. Przygotowano roztwór inwertazy o stężeniu 5 mg/ cm<sup>3</sup> w 0,1M roztworze Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> z H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o pH 8,4. Nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu i proces immobilizacji prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie przeniesiono próbki do lodówki i zostawiono na 24 godziny.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto według schematu opisanego w paragrafie 3.6.3.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

### **3.6.5 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami karboksylowymi: TMA**

5 cm<sup>3</sup> spęcznionych nośników przemyto wodą destylowaną i 0,05M buforem octanowym o pH 5,2. W celu aktywacji grup karboksylowych nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> 0,3% roztworu karbodiimidu w 0,05M buforze octanowym o pH 5,2 i mieszano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie odmyto nadmiar karbodiimidu wodą i 0,05M buforem octanowym o pH 5,2.

Kolejnym etapem była immobilizacja białka. Przygotowano roztwór inwertazy o stężeniu 5 mg/ cm<sup>3</sup> w 0,05M buforze octanowym o pH 5,2. Nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu i proces immobilizacji prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie przeniesiono próbki do lodówki i zostawiono na 24 godziny.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto według schematu opisanego w paragrafie 3.6.3.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

### **3.6.6 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami epoksydowymi: TG8**

5 cm<sup>3</sup> spęcznionych nośników przemyto wodą destylowaną i 0,1M roztworem Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> z H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o pH 8,4.

Kolejnym etapem była immobilizacja białka. Przygotowano roztwór inwertazy o stężeniu 5 mg/ cm<sup>3</sup> w 0,1M roztworze Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> z H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o pH 8,4. Nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu i proces immobilizacji prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie przeniesiono próbki do lodówki i zostawiono na 24 godziny.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto według schematu opisanego w paragrafie 3.6.3.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

### 3.7 Immobilizacja glukoamylazy

#### 3.7.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH<sub>2</sub> i TG8-NH<sub>2</sub>

Przygotowano roztwór enzymu: 16 cm<sup>3</sup> glukoamylazy (Novo 2) dopełnione do 80 cm<sup>3</sup> 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0. Do immobilizacji dawano po 25 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu na 25 cm<sup>3</sup> nośnika.

Przed immobilizacją wszystkie nośniki zostały umieszczone w termostatowanych reaktorach i były inkubowane w temperaturze 50°C (temperatura powyżej VPTT nośników). Roztwór glukoamylazy inkubowano w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie dodano do skurczonych nośników.

Proces immobilizacji prowadzono w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie wszystkie reaktory ochłodzono i dalej immobilizację prowadzono w temperaturze 4°C przez 1 godzinę. Po skończonej reakcji wszystkie nośniki podzielono na cztery części i odessano roztwór enzymu. Eluaty zostały zebrane w celu oznaczenia stężenia białka i jego aktywności po reakcji.

Kolejnym etapem było sieciowanie aldehydem glutarowym. Przygotowano roztwory aldehydu 0,5; 1,0 i 2,5% w 0,1M buforze fosforanowym, pH 7,0. Następnie do trzech części każdego nośnika dodano odpowiednie roztwory aldehydu, a do czwartej części dodano 0,1M bufor fosforanowy o pH 7,0. Po 15 minutach reakcji wszystkie nośniki przemyto trzykrotnie 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0. Aby zapobiec dalszemu sieciowaniu wszystkie nośniki zawieszono w 0,5M buforze Tris-HCl o pH 8,0. Tak przygotowane nośniki przechowywano w temperaturze 4°C.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

#### 3.7.2 „Ssanie” na nośniku THN

Przygotowano roztwór enzymu: 22 cm<sup>3</sup> glukoamylazy (Novo 2) dopełnione do 100 cm<sup>3</sup> 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0. Do immobilizacji dawano po 25 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu na 25 cm<sup>3</sup> nośnika.

Przed immobilizacją wszystkie nośniki zostały umieszczone w termostatowanych reaktorach i były inkubowane w temperaturze 50°C

(temperatura powyżej VPTT nośników). Roztwór glukoamylazy inkubowano w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie dodano do skurczonych nośników.

Proces immobilizacji prowadzono w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie wszystkie reaktory ochłodzono i dalej immobilizację prowadzono w temperaturze 4°C przez 1 godzinę. Po skończonej reakcji wszystkie nośniki podzielono na cztery części i odessano roztwór enzymu. Eluaty zostały zebrane w celu oznaczenia stężenia białka i jego aktywności po reakcji.

Kolejnym etapem było sieciowanie aldehydem glutarowym. Przygotowano roztwory aldehydu 0,5; 1,0 i 2,5% w 0,1M buforze fosforanowym, pH 7,0. Następnie do trzech części każdego nośnika dodano odpowiednie roztwory aldehydu, a do czwartej części dodano 0,1M bufor fosforanowy o pH 7,0. Po 15 minutach reakcji wszystkie nośniki przemyto trzykrotnie 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0. Aby zapobiec dalszemu sieciowaniu wszystkie nośniki zawieszono w 0,5M buforze Tris-HCl o pH 8,0. Tak przygotowane nośniki przechowywano w temperaturze 4°C.

### **3.7.3 „Ssanie” na nośniku T8**

Przygotowano roztwór glukoamylazy: 11 cm<sup>3</sup> enzymu (Novo 2) w 39 cm<sup>3</sup> 0,1M buforu fosforanowego o pH 7,0. Na 20 cm<sup>3</sup> nośnika dawano po 20 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu.

Przed immobilizacją wszystkie nośniki zostały umieszczone w termostatowanych reaktorach i były inkubowane w temperaturze 50°C (temperatura powyżej VPTT nośników). Roztwór glukoamylazy inkubowano w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie dodano do skurczonych nośników.

Proces immobilizacji prowadzono w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie wszystkie reaktory ochłodzono i dalej immobilizację prowadzono w temperaturze 4°C przez 1 godzinę. Po skończonej reakcji wszystkie nośniki podzielono na cztery części i odessano roztwór enzymu.

Kolejnym etapem było sieciowanie aldehydem glutarowym. Przygotowano roztwory aldehydu 0,5; 1,0 i 2,5% w 0,1M buforze fosforanowym, pH 7,0. Następnie do trzech części każdego nośnika dodano odpowiednie



roztwory aldehydu, a do czwartej części dodano 0,1M bufor fosforanowy o pH 7,0. Po 15 minutach reakcji wszystkie nośniki przemyto trzykrotnie 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0. Aby zapobiec dalszemu sieciowaniu wszystkie nośniki zawieszono w 0,5M buforze Tris-HCl o pH 8,0. Tak przygotowane nośniki przechowywano w temperaturze 4°C.

### **3.7.4 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami epoksydowymi – dobór warunków reakcji**

12 próbek nośnika TG8 przemyto wodą i następującymi roztworami buforów: 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0; 1,0M buforem fosforanowym o pH 7,0; 0,1M buforem fosforanowym o pH 8,0; 1,0M buforem fosforanowym o pH 8,0; 0,1M buforem węglanowym o pH 9,0 i 1,0M buforem węglanowym o pH 9,0. W celu zbadania wpływu temperatury na immobilizację, połowę próbek aktywowano w temperaturze 5°C, a pozostałe 6 próbek w temperaturze 45°C.

Przygotowano roztwory glukoamylazy: 9 cm<sup>3</sup> białka rozpuszczono w 27 cm<sup>3</sup> odpowiedniego buforu i inkubowano w temperaturze 5 lub 45°C. Na 7 cm<sup>3</sup> nośnika dawano po 15 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu. Proces immobilizacji prowadzono w temperaturze 5 lub 45°C przez 2 godziny, a następnie nośniki przeniesiono z termostatowanych reaktorów na kolumny i odmywano nadmiar białka. Jako pierwszego buforu użyto 0,1M buforu o odpowiednim pH, następnie nośniki przemywano 0,1M buforem o odpowiednim pH z 0,5M NaCl. Eluaty zostały zebrane w celu oznaczenia stężenia białka i jego aktywności po reakcji. Na koniec nośniki przemyto 0,05M buforem octanowym o pH 4,5 i zawieszono w 0,5M buforze Tris-HCl o pH 8,0 w celu zablokowania nieprzereagowanych grup epoksydowych. Tak przygotowane nośniki przechowywano w temperaturze 4°C.

### **3.7.5 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach z grupami aminowymi: TAEMA, TG8-NH<sub>2</sub> i TH8-NH<sub>2</sub>**

Aktywację nośnika i immobilizację glukoamylazy przeprowadzono identycznie jak to opisano w paragrafie 3.6.3.

Białko użyte do immobilizacji przygotowano następująco: 1 cm<sup>3</sup> roztworu glukoamylazy rozpuszczono w 13 cm<sup>3</sup> 0,1M buforu fosforanowego o pH 7,0.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto według schematu opisanego w paragrafie 3.6.3.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

### **3.7.6 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami hydroksylowymi: TH8**

Aktywację nośnika i immobilizację glukoamylazy przeprowadzono identycznie jak to opisano w paragrafie 3.6.4.

Białko użyte do immobilizacji przygotowano następująco: 1 cm<sup>3</sup> roztworu glukoamylazy rozpuszczono w 13 cm<sup>3</sup> 0,1M roztworu Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> z H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o pH 8,4.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto według schematu opisanego w paragrafie 3.6.3.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

### **3.7.7 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami karboksylowymi: TMA**

Aktywację nośnika i immobilizację glukoamylazy przeprowadzono identycznie jak to opisano w paragrafie 3.6.5.

Białko użyte do immobilizacji przygotowano następująco: 1 cm<sup>3</sup> roztworu glukoamylazy rozpuszczono w 13 cm<sup>3</sup> 0,05M buforu octanowego o pH 5,2.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto według schematu opisanego w paragrafie 3.6.3.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

### **3.7.8 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami epoksydowymi: TG8**

Aktywację nośnika i immobilizację glukoamylazy przeprowadzono identycznie jak to opisano w paragrafie 3.6.6.

Białko użyte do immobilizacji przygotowano następująco: 1 cm<sup>3</sup> roztworu glukoamylazy rozpuszczono w 13 cm<sup>3</sup> 0,1M roztworu Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> z H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o pH 8,4.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto według schematu opisanego w paragrafie 3.6.3.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

### 3.8 Immobilizacja trypsyny

#### 3.8.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH<sub>2</sub> i TG8-NH<sub>2</sub>

Przygotowano roztwór trypsyny: enzym liofilizowany 1 mg/ cm<sup>3</sup> w 0,1M buforze boranowym o pH 8,0 z 80 mM CaCl<sub>2</sub>. Na 25 cm<sup>3</sup> nośnika dawano po 25 cm<sup>3</sup> enzymu.

Przed immobilizacją wszystkie nośniki zostały umieszczone w termostatowanych reaktorach i były inkubowane w temperaturze 45°C (temperatura powyżej VPTT nośników). Roztwór trypsyny inkubowano w temperaturze 45°C przez 15 minut, a następnie dodano do skurczonych nośników.

Proces immobilizacji prowadzono w temperaturze 45°C przez 15 minut, a następnie wszystkie reaktory ochłodzono i dalej immobilizację prowadzono w temperaturze 4°C przez 1 godzinę. Po skończonej reakcji wszystkie nośniki podzielono na cztery części i odessano roztwór enzymu. Eluaty zostały zebrane w celu oznaczenia stężenia białka i jego aktywności po reakcji.

Kolejnym etapem było sieciowanie aldehydem glutarowym. Przygotowano roztwory aldehydu 0,5; 1,0 i 2,5% w 0,1M buforze boranowym, pH 8,0 z 80 mM CaCl<sub>2</sub>. Następnie do trzech części każdego nośnika dodano odpowiednie roztwory aldehydu, a do czwartej części dodano 0,1M bufor boranowy, pH 8,0 z 80 mM CaCl<sub>2</sub>. Po 15 minutach reakcji wszystkie nośniki przemyto trzykrotnie 0,1M buforem boranowym, pH 8,0 z 80 mM CaCl<sub>2</sub>. Aby zapobiec dalszemu sieciowaniu wszystkie nośniki zawieszono w 0,5M buforze Tris-HCl o pH 8,0. Tak przygotowane nośniki przechowywano w temperaturze 4°C.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

#### 3.8.2 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach z grupami aminowymi: TAEMA, TG8-NH<sub>2</sub> i TH8-NH<sub>2</sub>

5 cm<sup>3</sup> spęcznionych nośników przemyto wodą destylowaną i 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0. W celu aktywacji grup aminowych nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> 2,5% roztworu aldehydu glutarowego

---

w 0,1M buforze fosforanowym o pH 7,0 i mieszano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie odmyto nadmiar aldehydu wodą i 0,1M buforem boranowym z 2 mM CaCl<sub>2</sub> o pH 7,4.

Kolejnym etapem była immobilizacja białka. Przygotowano roztwór trypsyny o stężeniu 2,5 mg/ cm<sup>3</sup> w 0,1M buforze boranowym z 2 mM CaCl<sub>2</sub> o pH 7,4. Nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu i proces immobilizacji prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie przeniesiono próbki do lodówki i zostawiono na 24 godziny.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto kolejno: 0,1M buforem boranowym z 2 mM CaCl<sub>2</sub> o pH 7,4; 0,1M buforem boranowym z 2 mM CaCl<sub>2</sub> o pH 7,4 z 0,5M NaCl; 0,05M buforem octanowym z 2 mM CaCl<sub>2</sub> o pH 5,2. W celu zablokowania nieprzereagowanych aktywnych grup funkcyjnych nośniki zawieszono w 0,5M buforze Tris-HCl o pH 8,0 i wstawiono do lodówki na 24 godziny.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

### **3.8.3 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami hydroksylowymi: TH8**

5 cm<sup>3</sup> spęcznionych nośników przemyto wodą destylowaną i 1M roztworem węglanu sodu o pH 11. Do aktywacji grup hydroksylowych wykorzystano metodę opisaną w [109]. 1 cm<sup>3</sup> diwinylosulfonu dodano kroplami do nośnika zawieszonego w 10 cm<sup>3</sup> 1M roztworu węglanu sodu o pH 11 i mieszano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie odmyto nadmiar aktywatora wodą i 0,1M buforem boranowym z 2 mM CaCl<sub>2</sub> o pH 8,4.

Kolejnym etapem była immobilizacja białka. Przygotowano roztwór trypsyny o stężeniu 2,5 mg/ cm<sup>3</sup> w 0,1M buforze boranowym z 2 mM CaCl<sub>2</sub> o pH 8,4. Nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu i proces immobilizacji prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie przeniesiono próbki do lodówki i zostawiono na 24 godziny.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto według schematu opisanego w paragrafie 3.8.2.

---

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

#### **3.8.4 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami karboksylowymi: TMA**

5 cm<sup>3</sup> spęcznionych nośników przemyto wodą destylowaną i 0,05M buforem octanowym o pH 5,2. W celu aktywacji grup karboksylowych nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> 0,3% roztworu karbodiimidu w 0,05M buforze octanowym o pH 5,2 i mieszano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie odmyto nadmiar karbodiimidu wodą i 0,1M kwasem borowym z 2 mM CaCl<sub>2</sub> o pH 5,2.

Kolejnym etapem była immobilizacja białka. Przygotowano roztwór trypsyny o stężeniu 2,5 mg/ cm<sup>3</sup> w 0,1M kwasie borowym z 2 mM CaCl<sub>2</sub> o pH 5,2. Nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu i proces immobilizacji prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie przeniesiono próbki do lodówki i zostawiono na 24 godziny.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto według schematu opisanego w paragrafie 3.8.2.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

#### **3.8.5 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku z grupami epoksydowymi: TG8**

5 cm<sup>3</sup> spęcznionych nośników przemyto wodą destylowaną i 0,1M buforem boranowym z 2 mM CaCl<sub>2</sub> o pH 8,4.

Kolejnym etapem była immobilizacja białka. Przygotowano roztwór trypsyny o stężeniu 2,5 mg/ cm<sup>3</sup> w 0,1M buforze boranowym z 2 mM CaCl<sub>2</sub> o pH 8,4. Nośniki zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu i proces immobilizacji prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie przeniesiono próbki do lodówki i zostawiono na 24 godziny.

Nadmiar białka, które nie uległo immobilizacji odmyto według schematu opisanego w paragrafie 3.8.2.

Stężenie zaimmobilizowanego enzymu oraz jego teoretyczną aktywność obliczono analogicznie jak to opisano w paragrafie 3.6.1.

### 3.9 Immobilizacja lakkazy

#### 3.9.1 „Ssanie” na nośnikach TH8 i T8

Do immobilizacji użyto ekstraktu z grzybów *Cerrena unicolor* oczyszczonego na celulozowej membranie mikrofiltracyjnej (Millipore). Na 20 cm<sup>3</sup> nośnika dawano po 19 cm<sup>3</sup> roztworu lakkazy.

Przed immobilizacją wszystkie nośniki zostały umieszczone w termostatowanych reaktorach i były inkubowane w temperaturze 50°C (temperatura powyżej VPTT nośników). Roztwór lakkazy inkubowano w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie dodano do skurczonych nośników.

Proces immobilizacji prowadzono w temperaturze 50°C przez 15 minut, a następnie wszystkie reaktory ochłodzono i dalej immobilizację prowadzono w temperaturze 4°C przez 1 godzinę. Po skończonej reakcji wszystkie nośniki podzielono na cztery części i odessano roztwór enzymu.

Kolejnym etapem było sieciowanie aldehydem glutarowym. Przygotowano roztwory aldehydu 0,5; 1,0 i 2,5% w 0,1M buforze fosforanowym, pH 7,0. Następnie do trzech części każdego nośnika dodano odpowiednie roztwory aldehydu, a do czwartej części dodano 0,1M bufor fosforanowy o pH 7,0. Po 15 minutach reakcji wszystkie nośniki przemyto trzykrotnie 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,0. Aby zapobiec dalszemu sieciowaniu wszystkie nośniki zawieszono w 0,5M buforze Tris-HCl o pH 8,0. Tak przygotowane nośniki przechowywano w temperaturze 4°C.



## 4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

### 4.1 Charakterystyka jonitów

Jonity otrzymano podczas polimeryzacji suspensyjnej N-izopropylakryloamidu z 2-metakryloilo(oksyetylo) fosforanem ze średnią wydajnością 83%, wielkość ziaren otrzymanych polimerów była zawarta w przedziale 0,15-0,30 mm. Zastosowano następujące środki sieciujące: dimetakrylan glikolu etylenowego (TP8, TP12), dimetakrylan glikolu trietylenowego (TPT\*, TPT) oraz trimetakrylan 2-etylo-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiolu (TP3F) w ilości 4,0% molowych (TPT\*), 5,9% molowych (TP8, TPT, TP3F) lub 8,0% molowych grup winylowych (TP12). Dla każdej żywicy wyznaczono chłonność, pojemność kwasową, zawartość azotu i fosforu. Otrzymane wyniki zebrano w tabeli 6.

**Tabela 6** Charakterystyka termoczulych jonitów

Nośnik	<i>W</i> (25°C)	<i>W</i> (47°C)	% polimeru w żelu	$Z_N$	$Z_P$	<i>Z</i>	Wydajność polimeryzacji [%]
TP8	5,35	4,70	15,75	4,02	0,83	2,27	89
TP12	4,36	3,84	18,66	3,58	1,27	1,69	87
TPT*	3,78	2,05	20,92	3,24	1,33	2,25	75
TPT	7,38	4,24	11,93	3,27	1,30	3,37	80
TP3F	5,08	4,60	16,15	3,64	1,33	1,89	85

gdzie: *W* – chłonność w 25°C lub 47°C [g H<sub>2</sub>O/g suchego polimeru];  $Z_N$  – zawartość azotu [mmol/g];  $Z_P$  – zawartość fosforu [mmol/g]; *Z* – pojemność kwasowa [mmol/g]

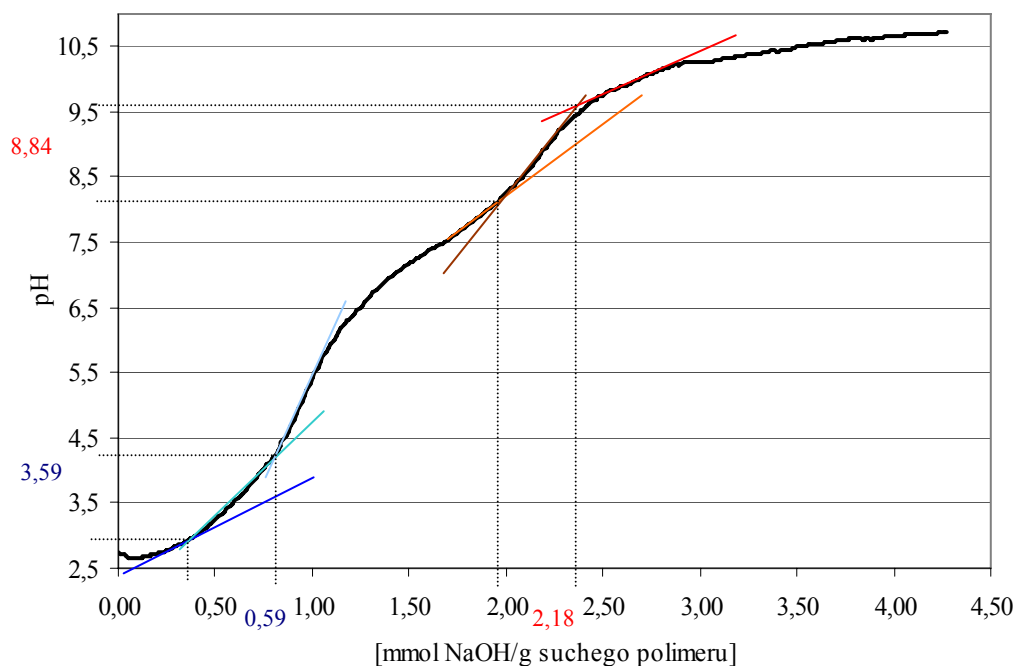
Zawartość azotu i fosforu wyznaczoną eksperymentalnie porównano z teoretyczną zawartością obliczoną na podstawie składu fazy organicznej i stwierdzono, że monomer NIPAAm został włączony do polimeru z wydajnością 95% w przypadku jonitu TP8, 90% (TP12, TP3F) i 80% (TPT\*, TPT). Z kolei wydajność włączenia monomeru MEP wynosiła 40% w przypadku jonitu TP8 i 60% dla pozostałych żywic. Wydajność polimeryzacji termoczulych jonitów była nieco mniejsza w porównaniu z wydajnością polimeryzacji suspensyjnej na

przykład styrenu i diwinylobenzenu, która wynosiła blisko 100% [8,10]. Dodatek 5% chlorku wapnia do fazy wodnej zmniejszył rozpuszczalność hydrofilowych monomerów tylko w pewnym stopniu, część monomerów fazy organicznej rozpuściła się w wodzie. W publikacji [8] opisano syntezę kopolimerów styrenu i metakryloamidu usieciowanych diwinylobenzenem, wydajność była zawarta w granicach 60-80% w zależności od składu.

Chłonność wody wyznaczono w dwóch temperaturach 25 i 47°C, odpowiednio poniżej i powyżej temperatury objętościowej przemiany fazowej (VPTT) jonitów. Porównując otrzymane wartości stwierdzono, że największą zmianą chłonności powyżej VPTT charakteryzują się jonity usieciowane TEGDMA. Chłonność wody zmniejsza się o 43 i 46% odpowiednio dla TPT\* i TPT. W przypadku jonitów TP8 i TP12 chłonność wody powyżej VPTT zmniejsza się o 12%, a w przypadku jonitu TP3F o 9%.

W celu wyznaczenia pK grup fosforanowych jonit TP8 poddano miareczkowaniu pH-metrycznemu, otrzymane wyniki przedstawiono w postaci wykresu na rysunku 27. Wyznaczone metodą geometryczną wartości pK grup fosforanowych wynoszą:  $pK_1=3,59$ ;  $pK_2=8,84$  przy stężeniach wodorotlenku sodu odpowiednio 0,59 i 2,18 [mmol/g]. Stężenie NaOH odpowiadające  $pK_1$  jest nieco mniejsze niż zawartość grup fosforanowych w polimerze. Może to sugerować, że nie wszystkie grupy fosforanowe są jednakowo dostępne w środowisku wodnym. Stężenie NaOH odpowiadające  $pK_2$  jest niewiele mniejsze od pojemności kwasowej jonitu. Wartość ta jest jednak nieco większa niż wynikałoby to z zawartości fosforu w próbce. Prawdopodobnie podczas polimeryzacji doszło do hydrolizy wiązań estrowych dimetakrylanu glikolu etylenowego z utworzeniem grup karboksylowych lub rozpadu wiązania amidowego w N-izopropylakryloamidzie, również z odtworzeniem grup karboksylowych, co w rezultacie spowodowało zwiększoną pojemność kwasową jonitu. Wartości pK grup fosforanowych znalezione w literaturze [107] dla kopolimeru NIPAAm i MEP wynoszą odpowiednio 6,92 i 10,80; natomiast dla monomeru MEP 2,15 i 6,80. Wartości otrzymane dla kopolimeru znacznie odbiegają od wartości otrzymanych dla monomeru 2-metakryloilo(oksyetylo) fosforanu. W publikacji [107] nie podano dokładnych warunków, w jakich badano pK grup fosforanowych polimeru, co powoduje, że dane z tej publikacji należy traktować z dużą ostrożnością, zwłaszcza że w pracy [165] otrzymane wartości

$pK_1$  i  $pK_2$  grup etylo aminofosfonowych wynoszą odpowiednio 0,53 i 5,33. Możliwe, że długość pojedynczego cyklu, w którym dodawano NaOH była niewystarczająca do osiągnięcia stanu równowagi i nastąpiło przesunięcie  $pK_1$  i  $pK_2$  w kierunku wyższych wartości. Wartości  $pK_1$  i  $pK_2$  kwasu fosforowego wynoszą odpowiednio 2,12 i 7,21 [166].

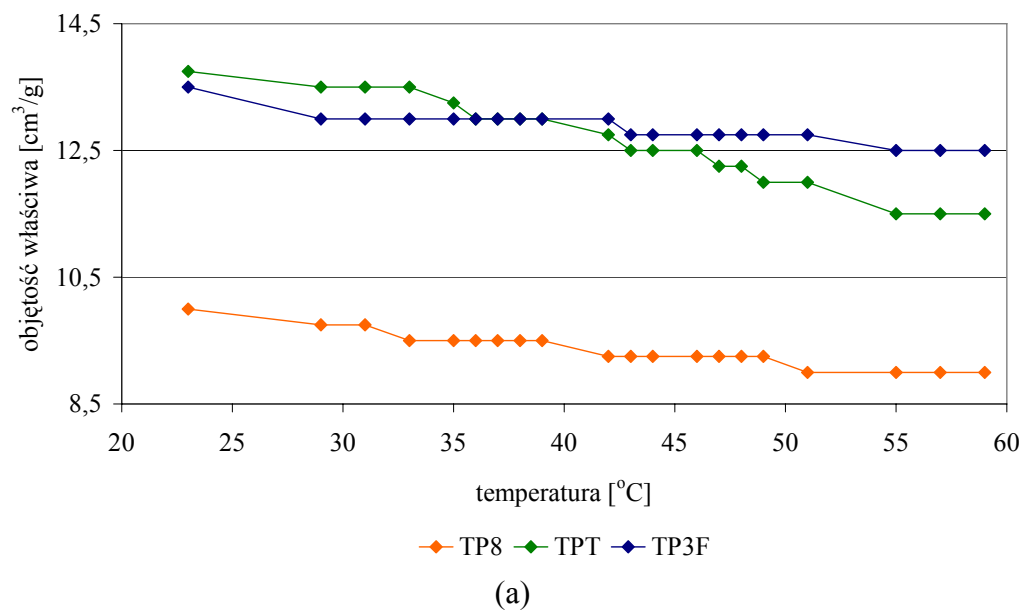


Rysunek 27 Miareczkowanie pH-metryczne kopolimeru NIPAAm i MEP usieciowanego EGDMA

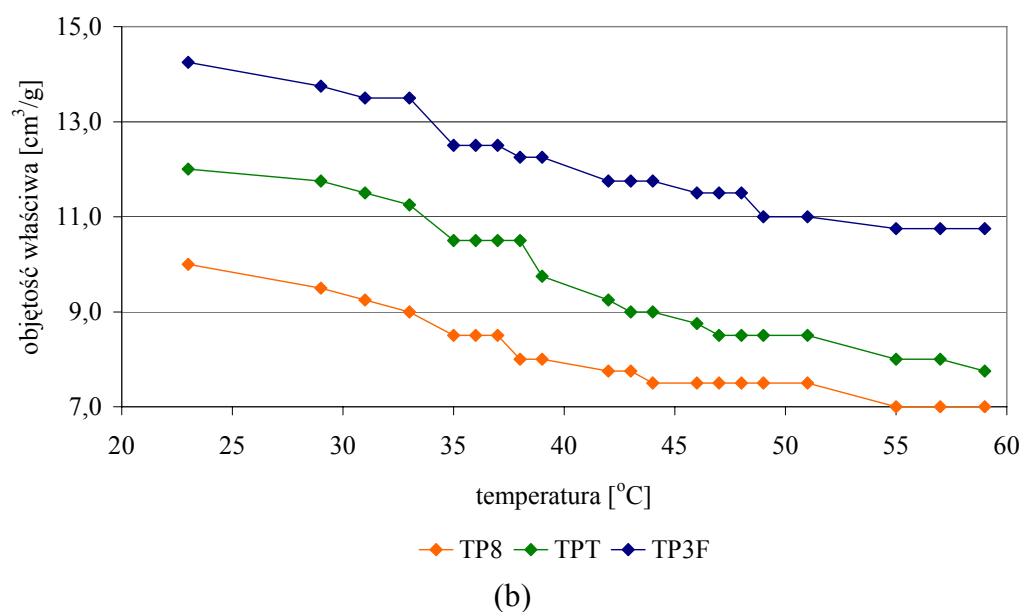
#### 4.1.1 Wpływ rodzaju środka sieciującego na zmiany objętości jonitów

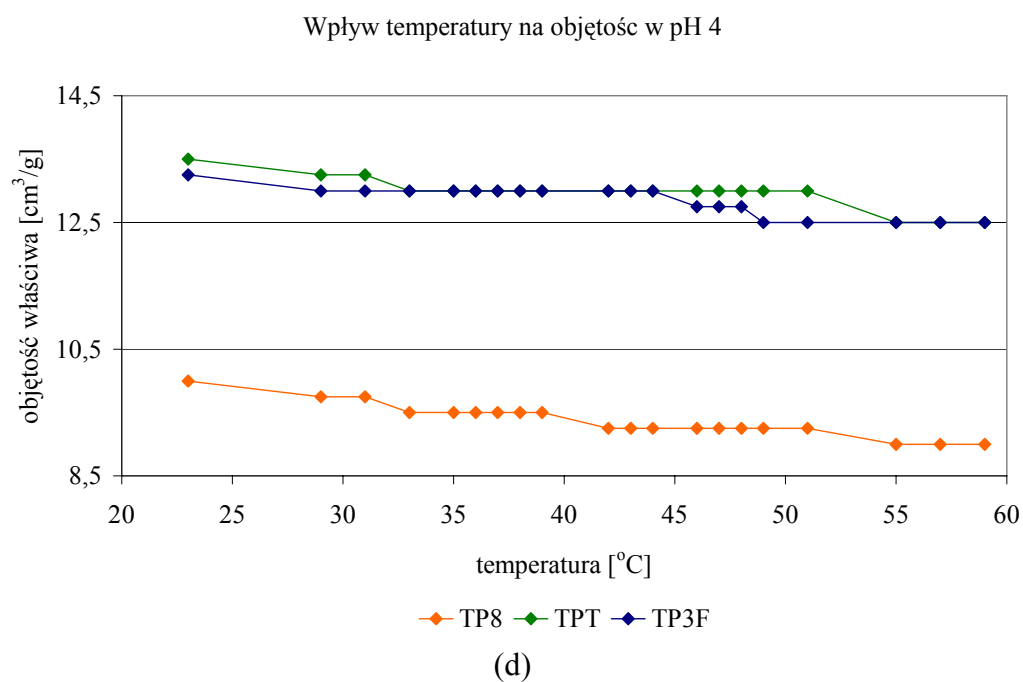
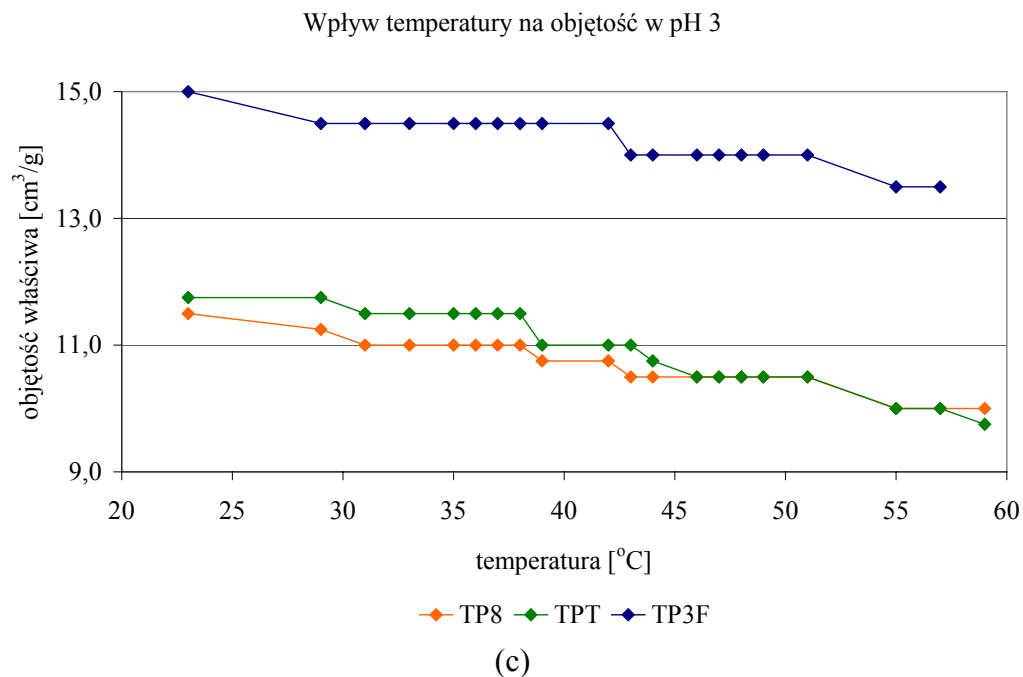
Jonity usieciowano trzema środkami sieciującymi w celu zbadania wpływu struktury takiego środka na zachowanie się jonitów w temperaturze poniżej i powyżej VPTT oraz ze względu na obecność grup jonoczynnych, w roztworach o pH w zakresie 2-4.

Wpływ temperatury na objętość w wodzie



Wpływ temperatury na objętość w pH 2





**Rysunek 28** Objętość właściwa jonitów w funkcji temperatury i pH roztworu

Na wykresach (rysunek 28) przedstawiono wpływ temperatury na objętość właściwą jonitów w zależności od pH roztworu. Kurczenie jonitów w wodzie (rysunek 28 a) i w roztworze kwasu azotowego o pH 4 (rysunek 28 d) jest podobne. W tym roztworze kwasu grupy fosforanowe są zdysocjowane (pH 4 jest powyżej  $pK_1$  grup jonoczynnych). Temperatura VPTT w przypadku wody i roztworu pH 4 jest bardzo wysoka dla wszystkich jonitów, co jest spowodowane

dużą polarnością zdysocjowanych grup fosforanowych. W roztworze kwasu azotowego o pH 2 (rysunek 28 b) obserwujemy największą zmianę objętości właściwej i najniższą temperaturę VPTT. Maksymalną zmianę objętości i temperaturę VPTT dla jonitów przedstawiono w tabeli 7.

**Tabela 7 Wpływ pH roztworu na zmianę objętości i VPTT jonitów**

<i>Roztwór</i>	<i>Jonit</i>	<i>Maksymalna zmiana objętości właściwej [cm<sup>3</sup>/g suchego jonitu]</i>	<i>VPTT [°C]</i>
Woda	TP8	1,0	42
	TPT	2,3	43
	TP3F	1,0	43
pH 2	TP8	3,3	38
	TPT	5,8	39
	TP3F	4,8	42
pH 3	TP8	1,5	43
	TPT	2,3	46
	TP3F	1,5	43
pH 4	TP8	1,0	42
	TPT	1,0	55
	TP3F	0,8	46

Analizując maksymalną zmianę objętości jonitów możemy zauważyć, że dla żywicy usieciowanej TEGDMA jest ona największa w wodzie i w roztworach kwasu azotowego o pH 2 i 3. W wodzie objętość TPT zmniejsza się o 16%, podczas gdy objętości TP8 i TP3F zmniejszają się odpowiednio o 10 i 7%, w roztworach kwasu azotowego o pH 2 i 3 obserwujemy podobną zależność. Objętość jonitów TP8, TPT i TP3F zmniejsza się odpowiednio o 30, 36 i 25% w pH 2 oraz o 13, 17 i 10% w pH 3. Jedynie w pH 4 największą zmianę objętości zaobserwowano zarówno dla jonitu usieciowanego EGDMA, jak i TEGDMA. Objętości poszczególnych jonitów zmniejszają się odpowiednio o 10, 7 i 6%.

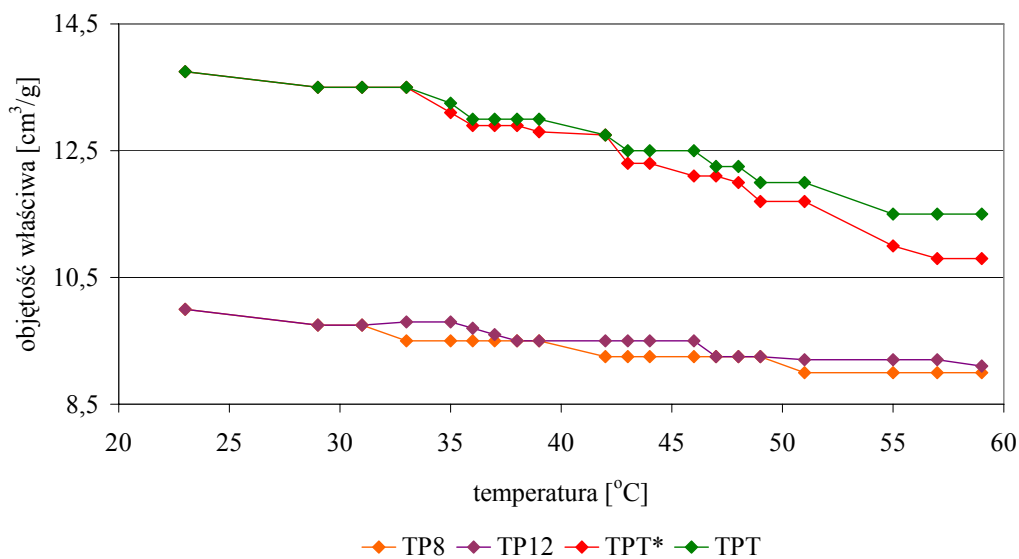
Zarówno EGDMA, jak i TEGDMA są liniowymi dwufunkcyjnymi środkami sieciującymi, przy czym TEGDMA charakteryzuje się dłuższym łańcuchem (rysunek 22), wpływa to na strukturę jonitu usieciowanego TEGDMA. Jonit jest bardziej elastyczny w porównaniu z polimerami usieciowanym EGDMA oraz TMPMA i przekłada się to na maksymalną zmianę objętości w temperaturze VPTT.

Podobną zależność zaobserwowano dla chłonności (tabela 6), której wartość w temperaturze 25°C jest dużo większa dla jonitu TPT w porównaniu z jonitami TP8 i TP3F. W temperaturze powyżej VPTT, w której jonity są skurczone i cząsteczki wody hydratującej łańcuchy polimerowe są wypychane na zewnątrz, jonit TPT charakteryzuje się najmniejszą chłonnością wody w porównaniu z pozostałymi jonitami i jednocześnie wartość chłonności maleje o 43%, podczas gdy chłonność jonitu TP8 powyżej VPTT zmniejsza się o 12%, a jonitu TP3F o 9%.

#### 4.1.2 Wpływ ilości środka sieciującego na zmiany objętości jonitów

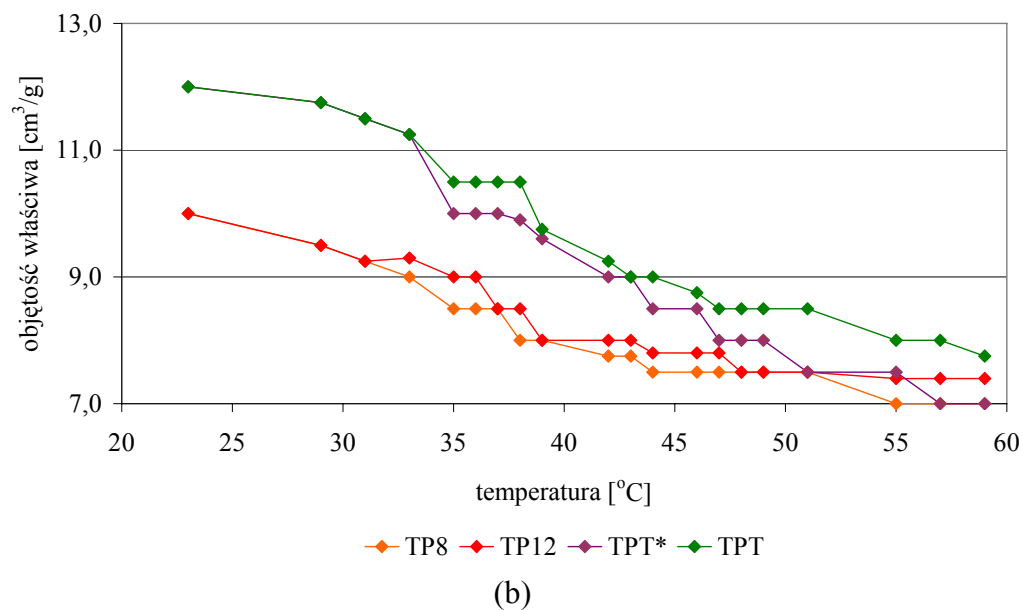
Oprócz wpływu rodzaju środka sieciującego, zbadano także wpływ jego ilości na zachowanie się jonitów w temperaturach poniżej i powyżej VPTT oraz w roztworach o różnym pH. Otrzymane wyniki przedstawiono na wykresach na rysunku 29.

Wpływ temperatury na objętość w wodzie

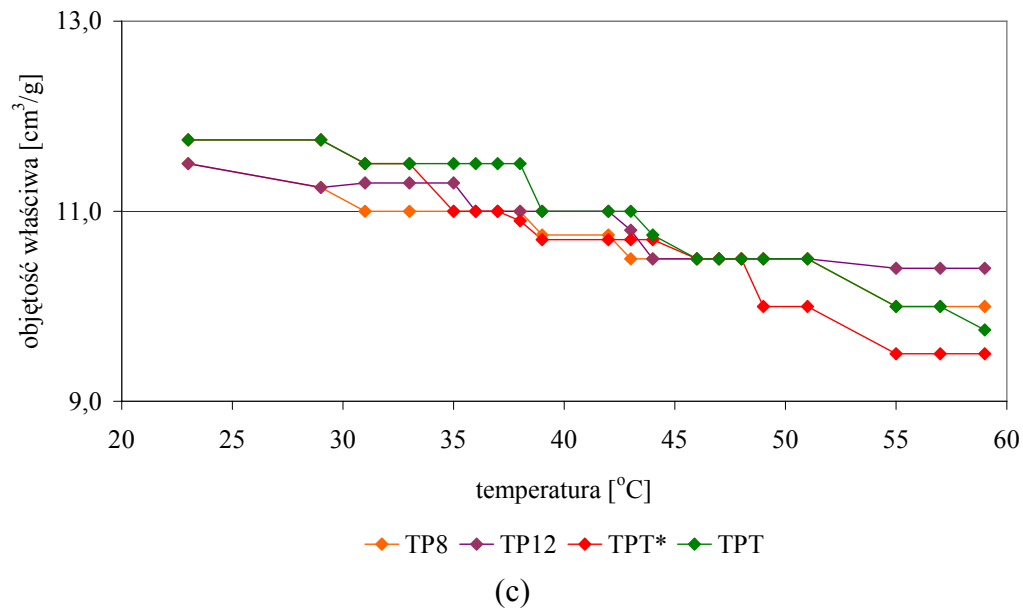


(a)

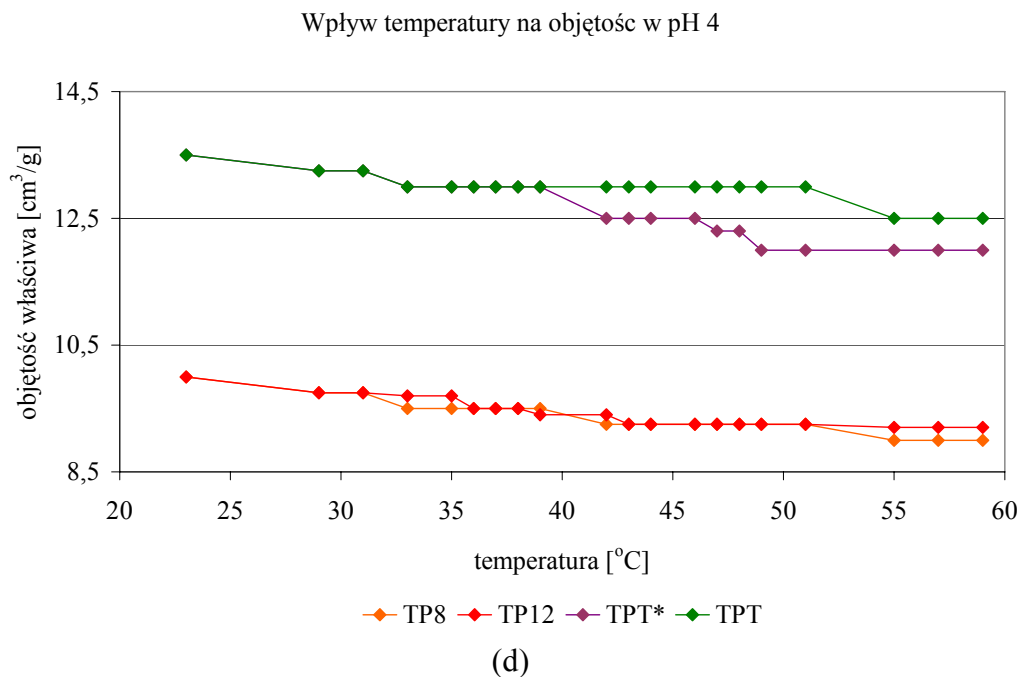
Wpływ temperatury na objętość w pH 2



Wpływ temperatury na objętość w pH 3







**Rysunek 29** Objętość właściwa jonitów w funkcji temperatury i pH roztworu

Jonity TP8 i TP12 usieciowano EGDMA, a TPT\* i TPT – TEGDMA. Zawartość środka sieciującego wynosiła odpowiednio 5,9 i 8,0% molowych grup winylowych dla EGDMA i 4,0 i 5,9% molowych grup winylowych dla TEGDMA. Zwiększenie stężenia środka sieciującego powinno mieć wpływ na strukturę polimeru, co w przypadku termoczułych kopolimerów przekłada się na zmiany objętości właściwej w temperaturze powyżej VPTT. Dla jonitów TP8 i TP12 wartości objętości właściwej w wodzie (rysunek 29 a) oraz w roztworach o pH 2 (rysunek 29 b) i 4 (rysunek 29 d) są praktycznie takie same. Różnice można zaobserwować w roztworze o pH 3 (rysunek 29 c), jonit TP8 w temperaturze powyżej VPTT jest bardziej skurczony w porównaniu z jonitem TP12. Dla jonitów TPT\* i TPT zmiany objętości właściwej można zaobserwować zarówno w wodzie, jak i w roztworach o pH 2, 3 i 4. We wszystkich przypadkach jonit TPT\* jest bardziej skurczony w temperaturze powyżej VPTT w porównaniu z jonitem TPT. Z powyższych obserwacji wynika, że jonity o mniejszym stopniu usieciowania są bardziej elastyczne, co uwidacznia się w temperaturze powyżej VPTT większą zmianą objętości właściwej danego jonitu. Na podstawie wykresów wyznaczono maksymalną zmianę objętości

i temperaturę VPTT dla poszczególnych jonitów, wyniki zaprezentowano w tabeli 8.

**Tabela 8** Wpływ pH roztworu na zmianę objętości i VPTT jonitów

<i>Roztwór</i>	<i>Jonit</i>	<i>Maksymalna zmiana objętości właściwej [cm<sup>3</sup>/g suchego jonitu]</i>	<i>VPTT [°C]</i>
Woda	TP8	1,0	42
	TP12	0,9	46
	TPT*	3,0	43
	TPT	2,3	43
pH 2	TP8	3,3	38
	TP12	2,6	39
	TPT*	6,2	39
	TPT	5,8	39
pH 3	TP8	1,5	43
	TP12	0,6	44
	TPT*	2,5	44
	TPT	2,3	46
pH 4	TP8	1,0	42
	TP12	0,6	42
	TPT*	1,5	49
	TPT	1,0	55

Analizując wyniki zebrane w tabeli 8 możemy zauważyć wpływ ilości użytego środka sieciującego na maksymalną zmianę objętości jonitów. Jak wspomniano wcześniej, jonity o mniejszej zawartości środka sieciującego charakteryzują się większą zmianą objętości w porównaniu z jonitami o większej zawartości środka sieciującego. Dla jonitów TP8 i TP12 objętość powyżej VPTT zmniejsza się odpowiednio o 10 i 9% w wodzie, 30 i 26% w pH 2, 13 i 5%

w pH 3 oraz 10 i 6% w pH 4. Dla jonitów TPT\* i TPT objętość powyżej VPTT zmniejsza się odpowiednio o 22 i 16% w wodzie, 47 i 36% w pH 2, 21 i 17% w pH 3 oraz 11 i 7% w pH 4. Porównując chłonność wody (tabela 6) dla jonitów usieciowanych EGDMA, stwierdzono, że jej wartość zmniejsza się ze zwiększaniem zawartości środka sieciującego. W temperaturze powyżej VPTT chłonność zmniejsza się o 12% dla obydwu jonitów. Dla jonitów usieciowanych TEGDMA zaobserwowano odwrotną zależność, to znaczy, chłonność wody zwiększa się wraz ze zwiększaniem zawartości środka sieciującego, natomiast w temperaturze powyżej VPTT chłonność zmniejsza się o 46% w przypadku jonitu o mniejszej zawartości TEGDMA i o 43% w przypadku jonitu o większym stopniu usieciowania. Różnice w pęcznieniu i objętości właściwej są w pewnym stopniu spowodowane różną zawartością grup fosforanowych dla poszczególnych jonitów. Otrzymanie polimerów suspensyjnych o zbliżonej zawartości grup funkcyjnych było trudne ze względu na hydrofilowość monomeru z grupami jonoczynnymi i związaną z tym jego rozpuszczalnością w fazie wodnej mieszaniny reakcyjnej.

## 4.2 Charakterystyka nośników do immobilizacji enzymów

Termoczule nośniki do immobilizacji enzymów otrzymano podczas polimeryzacji suspensyjnej N-izopropylakryloamidu z monomerami funkcjonalnymi: metakrylanem 2-hydroksyetylu (TH8, THN), metakrylanem glicydydu (TG8), kwasem metakrylowym (TMA) i metakrylanem 2-aminoetylu (TAEMA) ze średnią wydajnością 80%. Wielkości ziaren nośników: TH8, THN i TG8 były zawarte w przedziale 0,15-0,30 mm, natomiast wielkości ziaren nośników: TMA i TAEMA były zawarte w zakresie 0,08-0,15 mm. Nośnik T8 jest kopolimerem N-izopropylakryloamidu i dimetakrylanu glikolu etylenowego. Nośniki usieciowano dimetakrylanem glikolu etylenowego, za wyjątkiem nośnika THN, który został usieciowany dimetakrylanem glikolu trietylenowego. Zawartość środka sieciującego odpowiadała 5,9% molowym grup winylowych. Dla każdej żywicy wyznaczono chłonność, zawartość azotu i grup funkcyjnych. Otrzymane wyniki zebrano w tabeli 9.

**Tabela 9** Charakterystyka termoczulych nośników do immobilizacji

Nośnik	$W$ (25°C)	% polimeru w żelu	$Z_N$	$Z_{GF}$	Wydajność polimeryzacji [%]
TH8	1,35	42,43	4,44	2,57	85
THN	2,85	25,97	4,60	2,35	87
TG8	1,17	46,08	4,78	1,36	85
TMA	2,71	26,95	4,74	2,94	70
TAEMA	2,21	31,15	7,67	1,10	65
T8	2,40	29,40	7,57	-	90

gdzie:  $W$  – chłonność w 25°C [g H<sub>2</sub>O/g suchego polimeru];  $Z_N$  – zawartość azotu [mmol/g];  $Z_{GF}$  – zawartość grup funkcyjnych [mmol/g]

Zawartość azotu i grup funkcyjnych wyznaczoną eksperymentalnie porównano z teoretyczną zawartością obliczoną na podstawie składu fazy organicznej i stwierdzono, że monomer NIPAAm został włączony do polimeru

z wydajnością 95% w przypadku nośników TG8 i T8, 90% (TH8, THN, TAEMA) i 80% (TMA). Z kolei wydajność włączenia monomeru funkcjonalnego wynosiła 31% w przypadku nośnika TH8, 55% w przypadku nośników THN, TG8 i TAEMA oraz 61% w przypadku nośnika TMA. Wydajność polimeryzacji termoczułych nośników była mniejsza w porównaniu z wydajnością polimeryzacji suspensyjnej jonitów, za wyjątkiem wydajności syntezy nośnika T8. Nośniki TMA i TAEMA otrzymano z najmniejszą wydajnością, chociaż ze względu na hydrofilowość monomerów do fazy dodano 50% chlorek wapnia. Rozpuszczalność monomerów w wodzie nie była jedyną przyczyną małej wydajności polimeryzacji. Podczas syntezy TMA i TAEMA szybkość obrotów mieszadła utrzymywano na poziomie 500 obrotów na minutę. W rezultacie otrzymano polimery suspensyjne o znacznie mniejszej średnicy ziarna w porównaniu z pozostałymi nośnikami, co powodowało między innymi duże trudności w oczyszczaniu otrzymanych nośników (polimery oczyszczano przez dekantację), a w konsekwencji straty były spowodowane bardzo wolną sedymentacją. Wydajność polimeryzacji pozostałych nośników była porównywalna z danymi literaturowymi. Przykładowo w pracy [18] opisano syntezę kopolimerów NIPAAm i HEMA usieciowanych MBA o różnym składzie metodą odwróconej polimeryzacji suspensyjnej z wydajnościami zawartymi w zakresie 71-81%. Natomiast w publikacji [167] opisano syntezę kopolimeru HEMA i EGDMA metodą polimeryzacji suspensyjnej z wydajnością 85%. Wydajność polimeryzacji nośników TH8 i THN otrzymanych w ramach tej pracy doktorskiej wynosiła odpowiednio 85 i 87%. Z kolei w publikacji [168] opisano syntezę szeregu kopolimerów styrenu i metakrylanu glicydyli o różnym stopniu usieciowania. Wydajność polimeryzacji zwiększała się ze wzrostem zawartości diwinylobenzenu i wynosiła 83-91%. Nośnik z grupami epoksydowymi (TG8) otrzymano z wydajnością 85%.

Chłonność wody otrzymanych termoczułych nośników do immobilizacji enzymów jest zawarta w przedziale 1,17 – 2,85 g H<sub>2</sub>O/g i wartości te są mniejsze w porównaniu z wartościami chłonności termoczułych jonitów.

W wyniku modyfikacji etylenodiaminą do nośników zostały wprowadzone grupy aminowe. Dzięki temu nośniki stały się bardziej hydrofilowe, co przekłada się zarówno na większe wartości chłonności, jak i na wyższą temperaturę VPTT (tabela 10). Wartość chłonności zmodyfikowanych nośników zwiększa się o 35%

w przypadku TH8-NH<sub>2</sub> i 40% w przypadku TG8-NH<sub>2</sub>. W obydwu przypadkach temperatura VPTT zmodyfikowanych nośników jest o 10°C wyższa w porównaniu z niezmodyfikowanymi nośnikami. Jednocześnie zmodyfikowane nośniki charakteryzują się mniejszą zmianą objętości w temperaturze powyżej VPTT.

**Tabela 10** Wpływ modyfikacji etylenodiaminą na chłonność i VPTT nośników

Nośnik	$W$ (25°C)	$Z_N$	$Z_{NH_2}$	% objętości początkowej w temperaturze powyżej VPTT	VPTT [°C] w wodzie
TH8	1.35	4.44	-	33.3	33
TH8-NH <sub>2</sub>	1.83	4.57	0.20	27.0	43
TG8	1.17	4.78	-	30.8	36
TG8-NH <sub>2</sub>	1.64	6.11	1.91	26.2	46

gdzie:  $W$  – chłonność w 25°C [g H<sub>2</sub>O/g suchego polimeru];  $Z_N$  – zawartość azotu [mmol/g];  $Z_{NH_2}$  – zawartość grup aminowych [mmol/g]

W rozdziałach 3.6-3.9 została opisana immobilizacja enzymów metodą „ssania”, która polega na zasysaniu cząsteczek białka z roztworu podczas rozkurczania się odpowiednio przygotowanych nośników, a następnie na sieciowaniu tych nośników aldehydem glutarowym.

Procedura immobilizacji metodą „ssania”:

#### 1. Adsorpcja

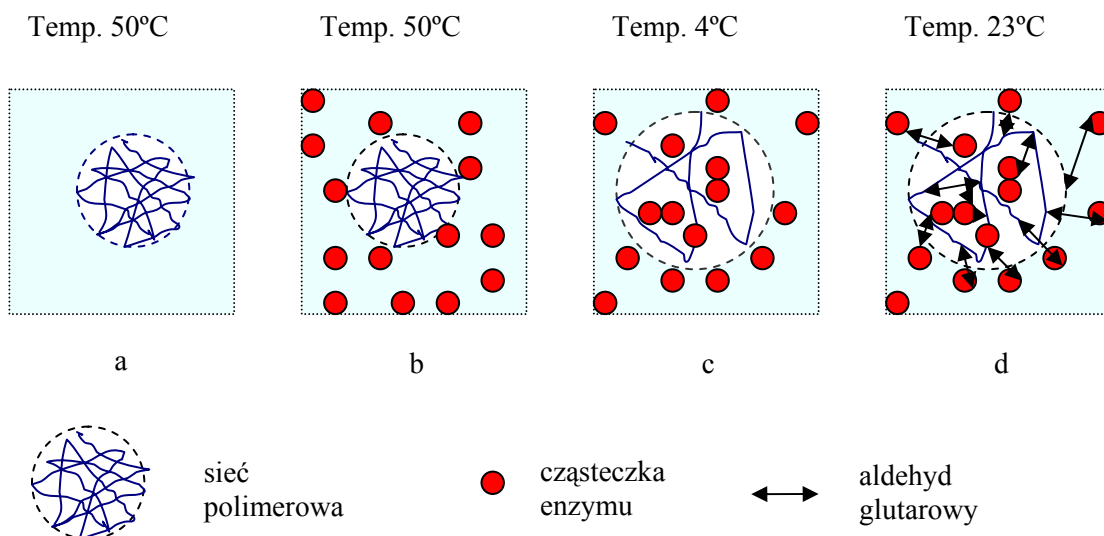
Jest to pierwszy etap każdej immobilizacji enzymu na nierozpuszczalnym nośniku. Z uwagi na to, że oddziaływania hydrofobowe zwiększają adsorpcję, nośnik należy ogrzać powyżej jego temperatury VPTT. W rezultacie nośnik będzie skurczony, a jego powierzchnia stanie się hydrofobowa (rysunek 30 a). Następnym krokiem jest dodanie ogrzanego roztworu enzymu (rysunek 30 b).

#### 2. „Ssanie”

Kolejnym etapem jest gwałtowne obniżenie temperatury układu poniżej VPTT nośnika. Następuje wówczas szybkie rozkurczanie nośnika, podczas którego cząsteczki białka są „zasysane” w głąb sieci polimerowej (rysunek 30 c).

#### 3. Sieciowanie

Ostatni etap to sieciowanie aldehydem glutarowym (rysunek 30 d), aby zminimalizować ubytek enzymu z preparatu na skutek wypłukania.



Rysunek 30 Schemat immobilizacji metodą „ssania”

Zbadano wpływ aldehydu glutarowego na zachowanie się preparatów z immobilizowanym enzymem w temperaturze powyżej VPTT, wyniki przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11 Wpływ aldehydu glutarowego na kurczenie się nośników w temperaturze powyżej VPTT

Nośnik	Zmiana objętości nośnika w temperaturze powyżej VPTT, w 50°C [%] (przed modyfikacją aldehydem glutarowym)	Zmiana objętości nośnika w temperaturze powyżej VPTT, w 50°C [%] (po modyfikacji aldehydem glutarowym)
TH8-B	33.1	33.3
TH8-0.5		31.0
TH8-1		28.6
TH8-2.5		27.3
TH8-NH <sub>2</sub> -B	25.2	27.00
TH8-NH <sub>2</sub> -0.5		24.21
TH8-NH <sub>2</sub> -1		21.00
TH8-NH <sub>2</sub> -2.5		17.30
TG8-NH <sub>2</sub> -B	29.5	26.19
TG8-NH <sub>2</sub> -0.5		22.96
TG8-NH <sub>2</sub> -1		21.42
TG8-NH <sub>2</sub> -2.5		15.00

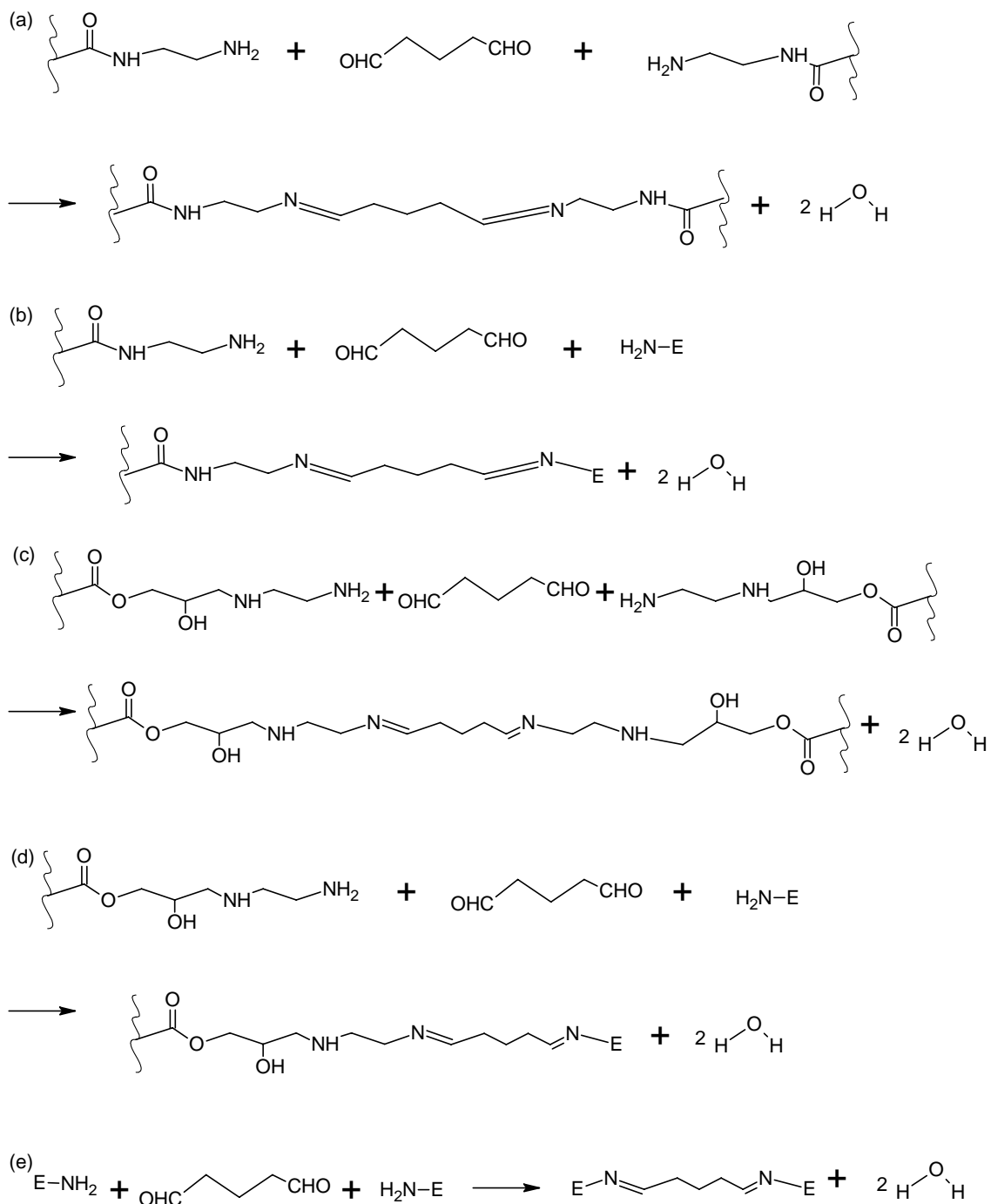
(B-bufor, 0.5-0.5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1.0% roztwór aldehydu glutarowego, 2.5-2.5% roztwór aldehydu glutarowego)

Niezmodyfikowany nośnik TH8 jest bardziej elastyczny, co można zaobserwować jako większą zmianę objętości powyżej VPTT nawet w przypadku próbek usieciowanych aldehydem glutarowym w porównaniu z nośnikami niezmodyfikowanymi etylenodiaminą. W przypadku niezmodyfikowanego nośnika TH8 różnice w zmianach objętości nieusieciowanych i usieciowanych próbek są niewielkie. Aldehyd glutarowy może reagować w tym wypadku jedynie z grupami aminowymi enzymu.

Nośnik modyfikowane etylenodiaminą są bardziej sztywne, zmiana objętości powyżej VPTT jest mniejsza. Zaznacza się tu również wpływ aldehydu glutarowego. Im większe stężenie środka sieciującego, tym mniejsza zmiana objętości powyżej VPTT. Aldehyd glutarowy będzie mógł w tym przypadku reagować z grupami aminowymi zarówno enzymu, jak i nośników, co dodatkowo może usztywniać polimery.

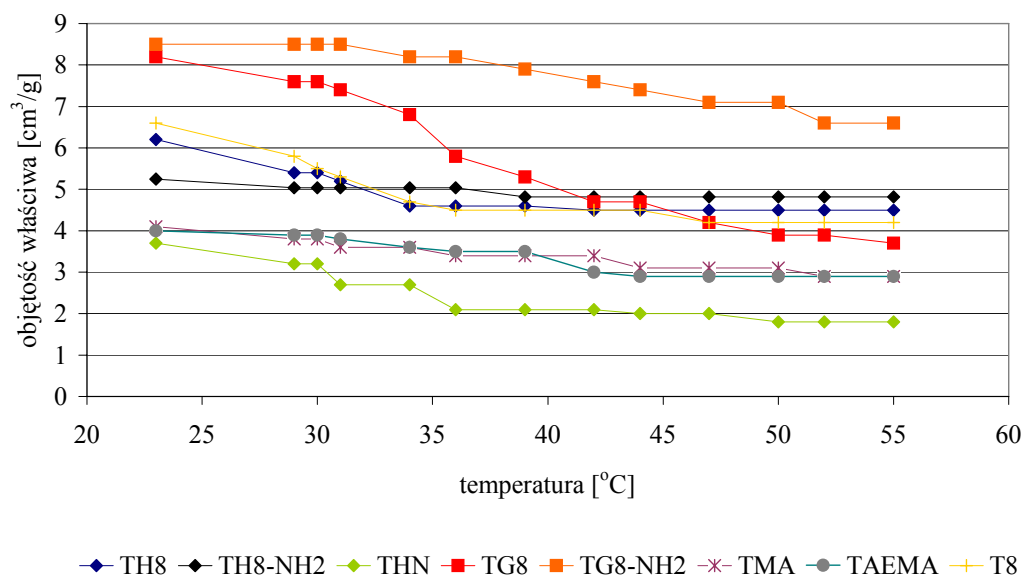
Na rysunku 31 przedstawiono schematycznie reakcje, z udziałem nośników TH8 i TG8 modyfikowanych etylenodiaminą, zachodzące podczas sieciowania. Sieciowanie aldehydem glutarowym prowadzono w łagodnych warunkach, w temperaturze pokojowej i w obojętnym środowisku. W oparciu o publikację [136] w takich warunkach pierwszorzędowe grupy aminowe nośnika i grupy aminowe enzymu powinny być zaktywowane tylko jedną cząsteczką aldehydu glutarowego. Reakcje „a” i „c” dotyczą oddziaływań pomiędzy nośnikiem a aldehydem glutarowym. Reakcje „b” i „d” to oddziaływania pomiędzy nośnikiem, enzymem i aldehydem glutarowym, a reakcja „e” przedstawia oddziaływania pomiędzy dwiema cząsteczkami enzymu i aldehydem glutarowym.





Rysunek 31 Reakcje, jakie mogą zachodzić pomiędzy nośnikiem, enzymem i aldehydem glutarowym

## 4.2.1 Zmiany objętości nośników w funkcji temperatury



Rysunek 32 Zmiany objętości nośników w funkcji temperatury w wodzie

Na podstawie wykresu przedstawionego na rysunku 32 wyznaczono maksymalną zmianę objętości w temperaturze powyżej VPTT oraz temperatury VPTT dla poszczególnych nośników do immobilizacji enzymów. Wyniki zebrano w tabeli 12.

Tabela 12 Temperatura VPTT nośników do immobilizacji

Nośnik	Maksymalna zmiana objętości właściwej [cm <sup>3</sup> /g suchego nośnika]	Temperatura VPTT [°C]
TH8	1,7	33
TH8-NH <sub>2</sub>	0,4	43
THN	1,9	36
TG8	4,5	36
TG8-NH <sub>2</sub>	1,9	46
TMA	1,2	42
TAEMA	1,1	42
T8	2,4	31

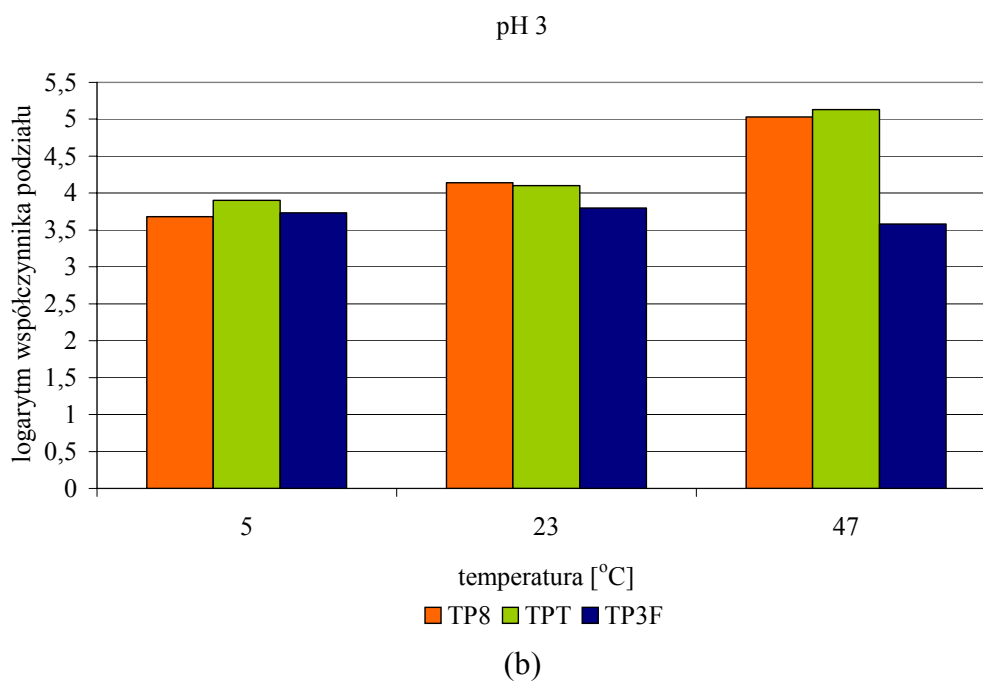
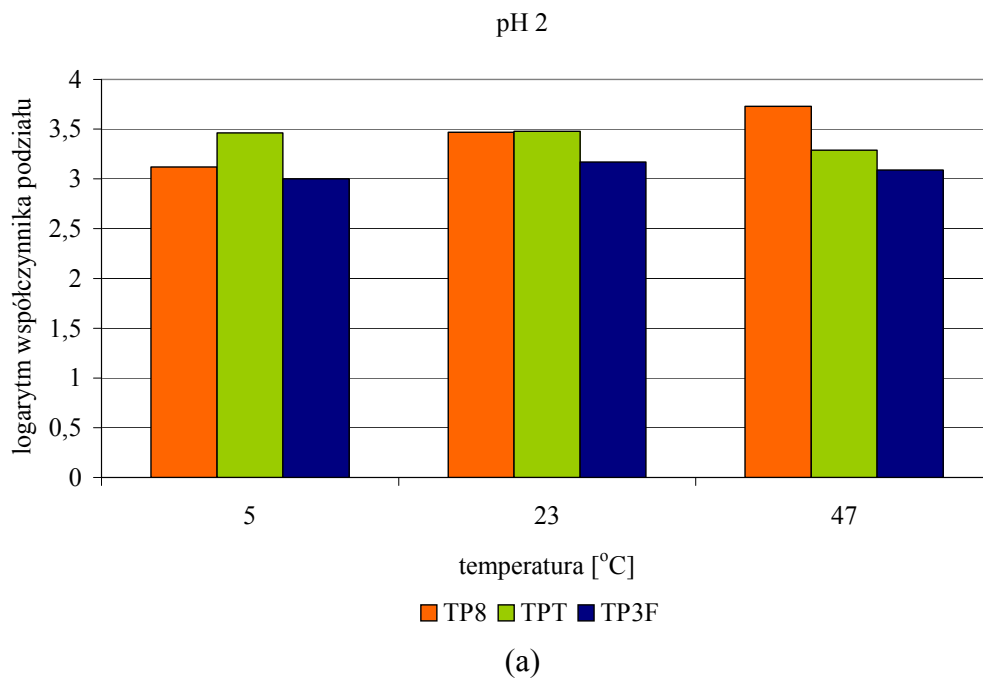
Nośnik THN usieciowano TEGDMA, natomiast pozostałe nośniki usieciowano EGDMA. We wszystkich przypadkach zawartość środka sieciującego odpowiadała 5,9% molowym grup winylowych. Porównując nośniki TH8 i THN, a więc nośniki z grupami hydroksylowymi różniące się rodzajem użytego środka sieciującego możemy zauważyć, że maksymalna zmiana objętości jest większa dla THN. Objętość THN powyżej VPTT zmniejsza się o 51%, natomiast objętość nośnika TH8 zmniejsza się o 27%. Długość użytego środka sieciującego wpływa również na temperaturę VPTT, dla nośnika THN jest ona wyższa w porównaniu z nośnikiem TH8. Jak wspomniano wcześniej modyfikacja nośnika za pomocą etylenodiaminy powoduje zwiększenie jego hydrofilowości, co przejawia się między innymi zwiększeniem temperatury VPTT, jak również zmniejszeniem wrażliwości na zmiany temperatury. Dla nośników TH8 i TH8-NH<sub>2</sub> objętość powyżej VPTT zmniejsza się odpowiednio o 27 i 8%, a dla nośników TG8 i TG8-NH<sub>2</sub> objętość zmniejsza się o 55 i 22%. Objętość nośników TMA, TAEMA i T8 zmniejsza się powyżej VPTT o 29, 28 i 36%.

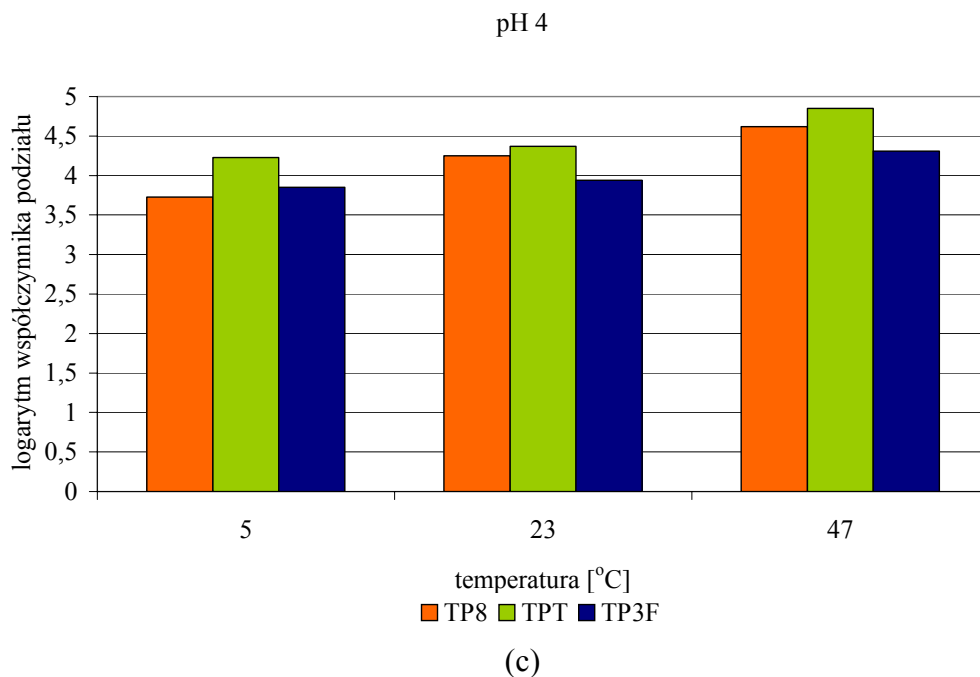
### 4.3 Sorpcja na termoczulych jonitach

Do sorpcji wybrano następujące jony metali o różnej wartościowości: europ (III), miedź (II) i potas (I). Ze względu na wrażliwość jonitów na temperaturę i związane z tym zmniejszanie objętości w temperaturze powyżej VPTT, wartościowość metalu powinna mieć wpływ na sorpcję. W skurczonym jonicie odległość pomiędzy sąsiadującymi grupami fosforanowymi zmniejsza się, powinno to ułatwiać tworzenie kompleksów i/lub wymianę wielowartościowych jonów.

Proces sorpcji prowadzono w trzech temperaturach, poniżej (5, 23°C) i powyżej (47°C) temperatury VPTT żywic. Zbadano również wpływ pH roztworu na sorpcję metali w zakresie pH 2-4, który wybrano w oparciu o wyniki miareczkowania pH-metrycznego (rysunek 27). W roztworze o pH 2 grupy fosforanowe nie są zdysocjowane i metale mogą być koordynowane przez fosforylowy atom tlenu grup funkcyjnych jonitów. W roztworach o pH 3 część grup fosforanowych jest już zdysocjowana, ponieważ  $pK_1$  wynosi 3,59, oznacza to, że oprócz koordynacji może następować również wymiana jonów metali. W roztworach o pH 4 grupy fosforanowe są zdysocjowane, co oznacza, że metale są sorbowane na drodze wymiany jonowej. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów logarytmów współczynnika podziału w funkcji temperatury podczas sorpcji z roztworów o różnym pH.

Na rysunku 33 przedstawiono wartości logarytmu współczynnika podziału w funkcji temperatury i pH roztworu uzyskane podczas sorpcji europu na jonitach usieciowanych różnymi środkami sieciującymi.





**Rysunek 33 Wyniki sorpcji jonów europu na termoczułych jonitach usieciowanych EGDMA, TEGDMA i TMPMA**

W całym badanym zakresie pH uzyskano bardzo dobre wyniki, przy czym sorpcja z roztworów o pH 3 (rysunek 33 b) i 4 (rysunek 33 c) była nieco większa niż z roztworu o pH 2 (rysunek 33 a). Dla roztworów o pH 2 ilość zaadsorbowanego metalu wynosiła dla TP8: 65 i 89% odpowiednio w temperaturze 5 i 47°C, dla TPT: 74 i 66% oraz dla TP3F: 51 i 55%. Z kolei ilość zaadsorbowanego metalu z roztworów o pH 3 i 4 była porównywalna dla jonitów usieciowanych liniowymi środkami sieciującymi i wynosiła dla TP8: 88 i 99% odpowiednio w temperaturze 5 i 47°C, a dla TPT: 90 i 99%. Dla jonitu TP3F w pH 3 ilość zaadsorbowanego metalu wynosiła 80% w obydwu temperaturach, natomiast w pH 4 w temperaturze 5°C jonit zaadsorbował 88% europu, a w temperaturze 47°C – 95%.

Wartości logarytmu współczynnika podziału są nieco większe dla jonitu usieciowanego TEGDMA. Dłuższy łańcuch, w porównaniu z EGDMA, może powodować większą dostępność grup jonowymiennych. Ponadto w przypadku liniowych środków sieciujących obserwujemy także zwiększenie logarytmu współczynnika podziału wraz ze zwiększeniem temperatury. Podczas sorpcji z roztworów o pH 3 można zaobserwować wyraźną różnicę wartości logarytmów współczynników podziału w temperaturach poniżej (5, 23°C) i powyżej (47°C)

VPTT. Dla jonitu TP8 wynoszą one odpowiednio 3,68; 4,14 oraz 5,03; natomiast dla jonitu TPT odpowiednio 3,90, 4,10 oraz 5,13. Pomimo mniejszych wartości logarytmów współczynników podziału dla jonitu usieciowanego EGDMA, zwiększenie wartości logarytmów w temperaturze powyżej VPTT jest większe w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla jonitu usieciowanego TEGDMA. Zwiększenie wartości logarytmu współczynnika podziału w pH 2, 3 i 4 wynosi odpowiednio dla TP8: 16, 27 i 19%, a dla TPT: 0, 24 i 13%. W temperaturze powyżej VPTT jonity są skurczone i odległość pomiędzy grupami jonoczynnymi dla jonitu usieciowanego krótszym liniowym środkiem sieciującym może być optymalna.

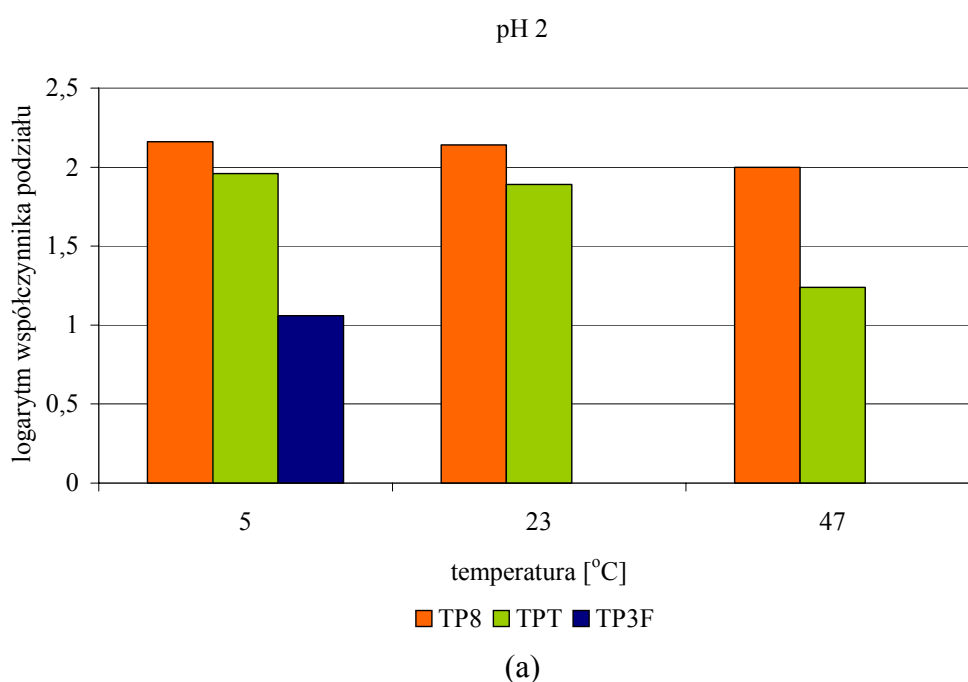
Dla żywicy usieciowanej trójfunkcyjnym środkiem sieciującym nie obserwujemy zwiększenia logarytmu współczynnika podziału w temperaturze powyżej VPTT żelu podczas sorpcji z roztworów o pH 2 i 3 (zwiększenie wartości logarytmu współczynnika podziału wynosi odpowiednio 3 i 0%). Jedynie podczas sorpcji z roztworów o pH 4 możemy zaobserwować niewielkie zwiększenie wartości logarytmów współczynników podziału, które wynoszą 3,85 i 3,94 w temperaturach poniżej VPTT oraz 4,31 w temperaturze powyżej VPTT jonitu, co odpowiada zwiększeniu wartości o 11% w skali logarytmicznej, przekłada się to na około dwukrotny wzrost sorpcji. TMPMA usztywnia strukturę jonitu powodując, że jest on mniej wrażliwy na zmiany temperatury i w temperaturze powyżej VPTT nie zmniejsza gwałtownie objętości.

Na kopolimerach NIPAAm i MEP opisanych w [102,107] nie sorbowano europu. Sorpcję europu opisano w pracy [113]. Badanym jonitem był jednak terpolimer kwasu n-oktylofosfinowego, N,N-dietyloakryloamidu i dimetakrylanu glikolu tetraetylenowego. W temperaturze 30°C otrzymano następujące wyniki sorpcji europu: 0,1; 0,14 i 0,17 mmol/g z roztworów o pH odpowiednio 3,5, 5,0 i 6,5. Wartości sorpcji na jonitach TP8, TPT i TP3F, będących przedmiotem tej pracy doktorskiej są nieco mniejsze. Dla jonitu TP8 otrzymano następujące wyniki sorpcji w temperaturze 47°C: 0,058, 0,078 i 0,074 mmol/g z roztworów o pH odpowiednio 2, 3 i 4. Dla jonitu TPT: 0,068, 0,088 i 0,089 mmol/g, a dla jonitu TP3F: 0,057, 0,087 i 0,098 mmol/g.

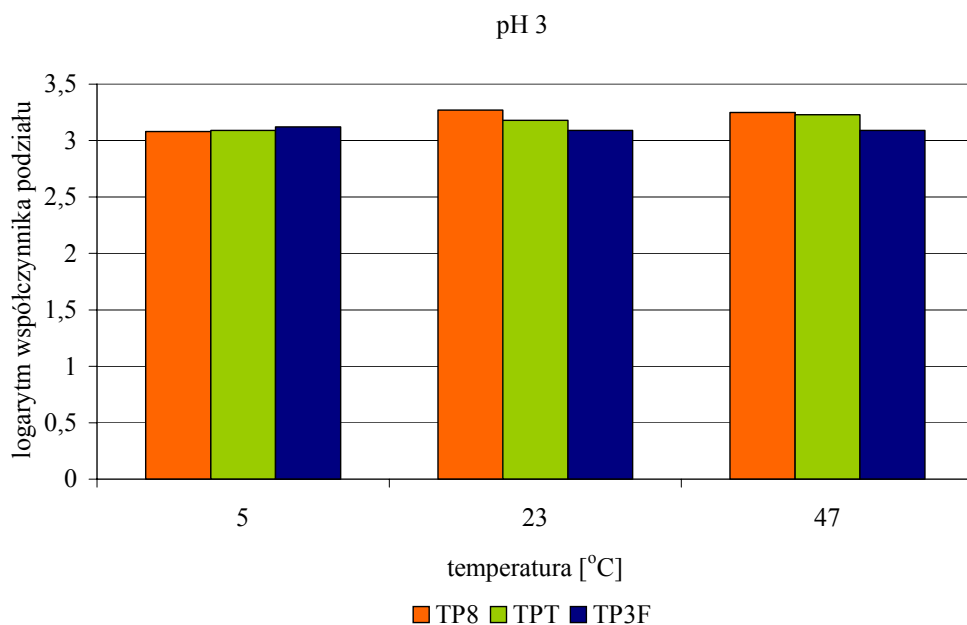
W publikacji [102] właściwości sorpcyjne termoczułego jonitu z grupami fosforanowymi (kopolimer NIPAAm i MEP usieciowany MBA) badano w obecności trójwartościowych jonów lantanu, w temperaturze 3-60°C oraz

w zakresie pH 0,5-3,5. Dla jonitu, w którym stosunek molowy komonomerów wynosił 1:1, otrzymano wartości logarytmów współczynników podziału w zakresie 1,95 – 2,48. Dla jonitu o większej zawartości monomeru NIPAAm (stosunek molowy NIPAAm:MEP wynosił 3:1), otrzymano wartości logarytmów współczynników podziału w zakresie 1,70 – 2,28.

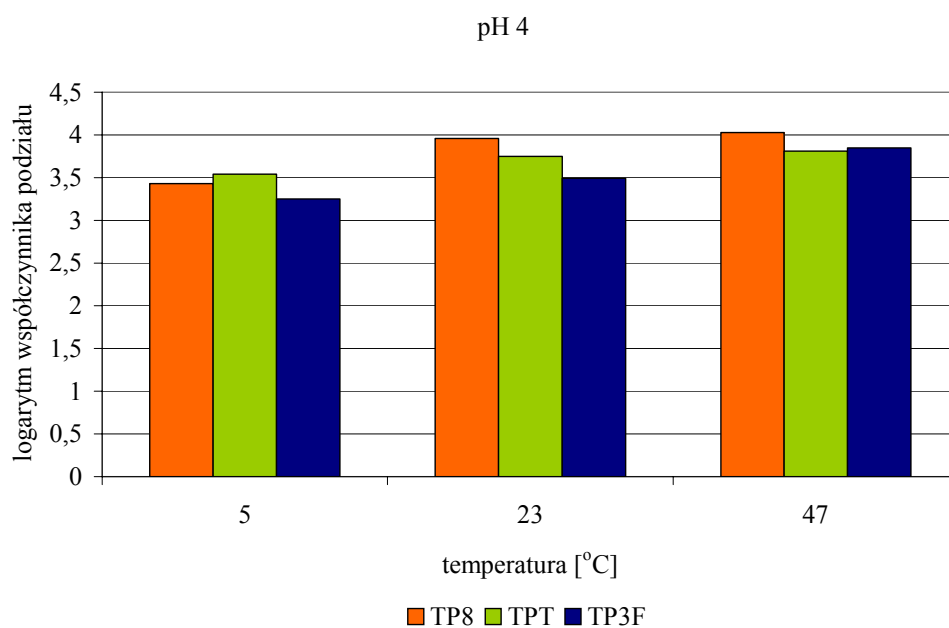
Na rysunku 34 przedstawiono wartości logarytmu współczynnika podziału w funkcji temperatury i pH roztworu uzyskane podczas sorpcji miedzi na jonitach usieciowanych różnymi środkami sieciującymi.







(b)



(c)

**Rysunek 34** Wyniki sorpcji jonów miedzi na termoczułych jonitach usieciowanych EGDMA, TEGDMA i TMPMA

W środowisku silnie kwasowym (rysunek 34 a), w którym mamy do czynienia jedynie z koordynacją kationów, sorpcja miedzi była niewielka. Można zauważyć również, że jonit usieciowany trójfunkcyjnym środkiem sieciującym praktycznie nie sorbuje miedzi w tak małym pH. Ilość zaadsorbowanego metalu

z roztworów o pH 2 wynosiła dla TP8: 15 i 13%, odpowiednio w temperaturze 5 i 47°C, dla TPT: 10 i 2%, natomiast dla TP3F praktycznie 0% w obydwu temperaturach. Ilość zaadsorbowanego metalu zwiększała się ze zwiększaniem się pH roztworu i dla pH 4 wynosiła dla TP8: 76 i 93%, odpowiednio w temperaturze 5 i 47°C, dla TPT: 79 i 88%, natomiast dla TP3F: 63 i 87%.

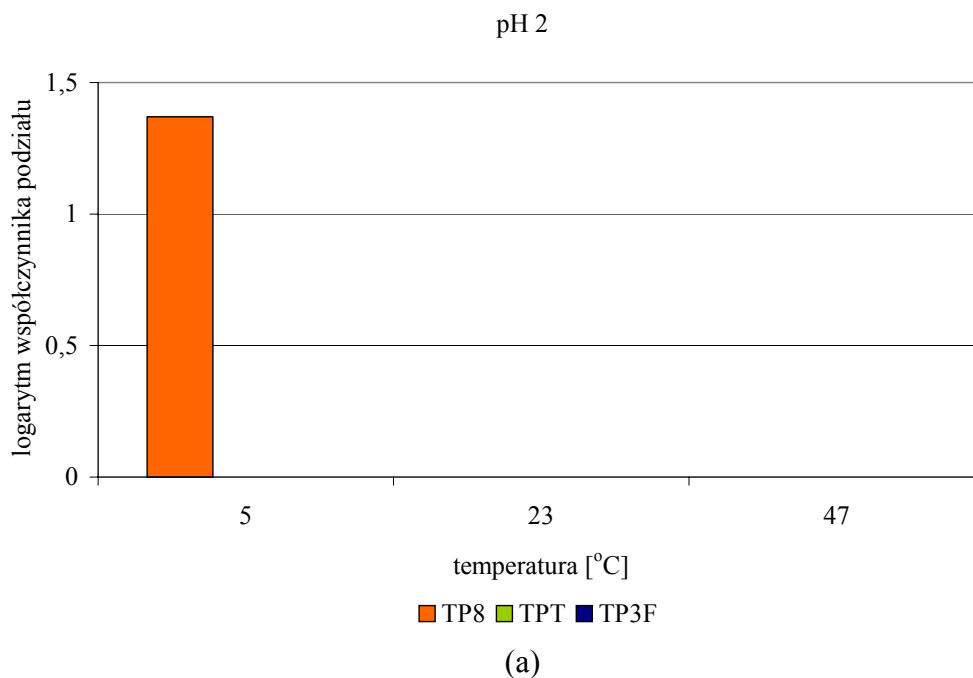
W przypadku jonitów usieciowanych liniowymi środkami sieciującymi zaobserwowano niewielkie zwiększenie wartości logarytmu współczynnika podziału w temperaturze powyżej VPTT jonitów. W roztworach o pH 3 (rysunek 34 b) wartości logarytmów współczynników podziału w temperaturach 5, 23 i 47°C wynoszą odpowiednio dla jonitu TP8: 3,08, 3,27, 3,25 (zwiększenie wartości o 5%), dla jonitu TPT: 3,09, 3,18, 3,23 (zwiększenie wartości o 4%) i dla jonitu TP3F: 3,12, 3,09, 3,09. W tym ostatnim przypadku brak jest zależności logarytmu współczynnika podziału od temperatury roztworu. Podczas sorpcji z roztworów o pH 4 (rysunek 34 c) uzyskane wartości logarytmów współczynników podziału w poszczególnych temperaturach wynoszą odpowiednio dla jonitu TP8: 3,43, 3,96; 4,03 (zwiększenie wartości o 15%), dla jonitu TPT: 3,54, 3,75, 3,81 (zwiększenie wartości o 7%) i dla jonitu TP3F: 3,25, 3,49, 3,85 (zwiększenie wartości o 15%).

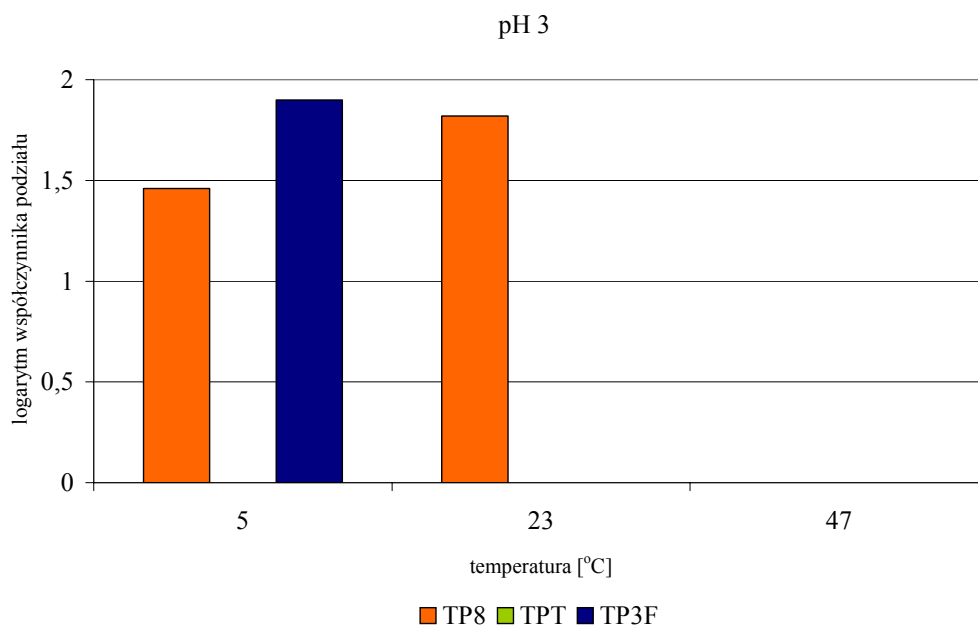
Jedynie w przypadku jonitu usieciowanego trójfunkcyjnym środkiem sieciującym, wzrost temperatury powyżej VPTT powoduje zwiększenie sorpcji. Rodzaj użytego środka sieciującego nie wpływa w sposób znaczący na wyniki sorpcji.

W pracy [36] opisano sorpcję miedzi (II) na kopolimerze NIPAAm z kwasem akryloilo(oksypropylo) fosfinowym w zakresie pH 3-6, a otrzymane wyniki były w zakresie 0,3–0,65 mmol/g. Ponadto stwierdzono, że wzrost temperatury powyżej VPTT nie spowodował zwiększenia sorpcji dwuwartościowej miedzi, w zakresie temperatury 25-40°C otrzymane wartości sorpcji wynosiły odpowiednio 0,3-0,27 mmol/g. W pracy [97] opisano sorpcję miedzi (II) na kopolimerach NIPAAm z 1-winyloimidazolem, kwasem akrylowym lub kwasem akrylowym zmodyfikowanym etylenodiaminą i karbodiimidem w celu uzyskania grup iminodioctowych. Jonity z grupami karboksylowymi adsorbowały 90% metalu, natomiast w pozostałych przypadkach ilość zaadsorbowanego metalu wynosiła blisko 100%. Jedynie w pracy [107] badanym kopolimerem był NIPAAm-co-MEP usieciowany

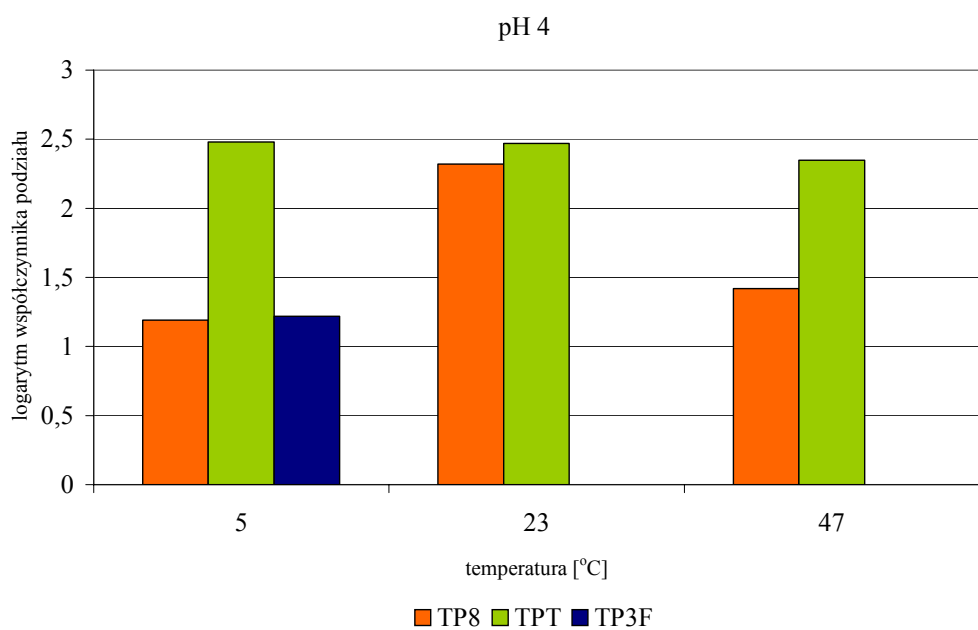
N,N-metylenobisakryloamidem. Sorpcję miedzi (II) badano w zakresie temperatur 5-60°C w pH 5. Dla temperatury w zakresie 5-30°C zawartość miedzi w polimerze wynosiła 0,016 [mmol/g], natomiast w zakresie temperatur 40-60°C uzyskana wartość była niewiele większa i wynosiła 0,022 mmol/g. Porównując uzyskane wyniki z danymi literaturowymi [107] stwierdzono, że uzyskano większe wartości sorpcji miedzi (II) we wszystkich badanych polimerach w temperaturach 5, 23 i 47°C pH 4 i wynosiły one odpowiednio: 0,065, 0,068 i 0,073 dla TP8, 0,072, 0,077 i 0,082 dla TP12, 0,078, 0,077 i 0,087 dla TPT\*, 0,073, 0,079 i 0,080 dla TPT oraz 0,067, 0,080 i 0,093 dla TP3F mmol/g.

Na rysunku 35 przedstawiono wartości logarytmu współczynnika podziału w funkcji temperatury i pH roztworu uzyskane podczas sorpcji potasu na jonitach usieciowanych różnymi środkami sieciującymi.





(b)



(c)

**Rysunek 35** Wyniki sorpcji jonów potasu na termoczułych jonitach usieciowanych EGDMA, TEGDMA i TMPMA

Jonity usieciowane liniowymi środkami sieciującymi mają niewielkie powinowactwo do jonów potasu, natomiast na jonicie usieciowanym trójfunkcyjnym środkiem sieciującym potas praktycznie nie jest sorbowany, ilość zaadsorbowanego metalu wynosi 2% jedynie w pH 3 (rysunek 35 b)

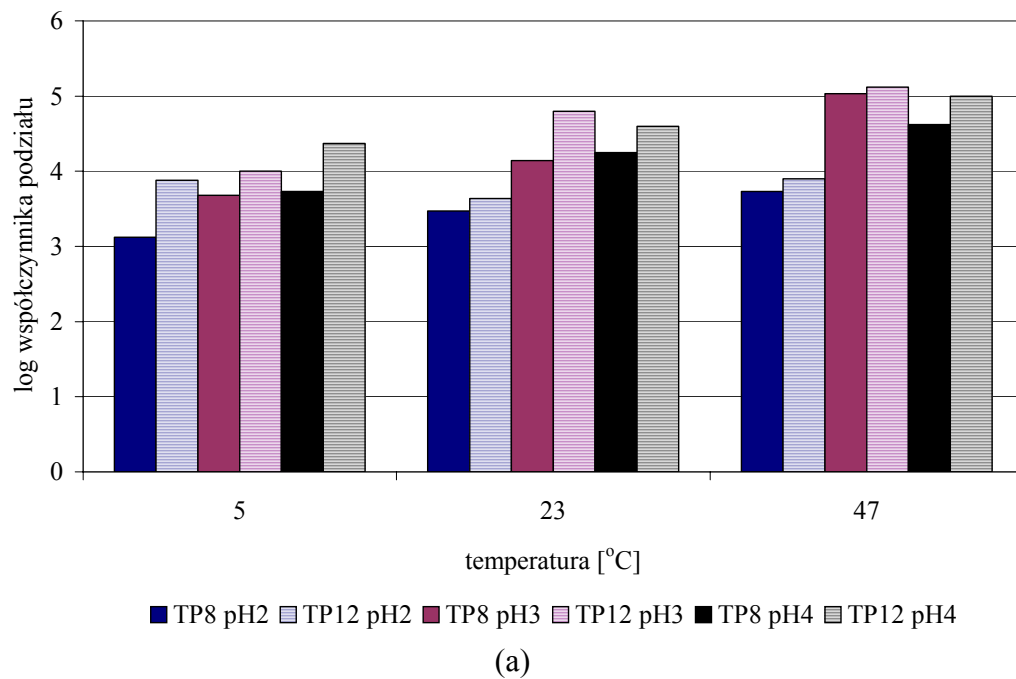
w temperaturze 5°C. W pH 2 (rysunek 35 a) sorpcję potasu zaobserwowano jedynie w przypadku jonitu TP8, ilość zaadsorbowanego metalu wynosi 3% w temperaturze 5°C. Potas ze względu na zapełnioną powłokę walencyjną nie ulega koordynacji, co tłumaczy praktycznie zerową sorpcję z roztworów o pH 2.

Ze wzrostem pH zwiększa się nieco sorpcja potasu. Największe wartości obserwujemy w pH 4 (rysunek 35 c), co jest spowodowane najsilniejszymi oddziaływaniami elektrostatycznymi. Ilość zaadsorbowanego metalu dla TP8 wynosi 2, 21 i 3% w temperaturze odpowiednio 5, 23 i 47°C, a dla TPT: 9, 10 i 7%.

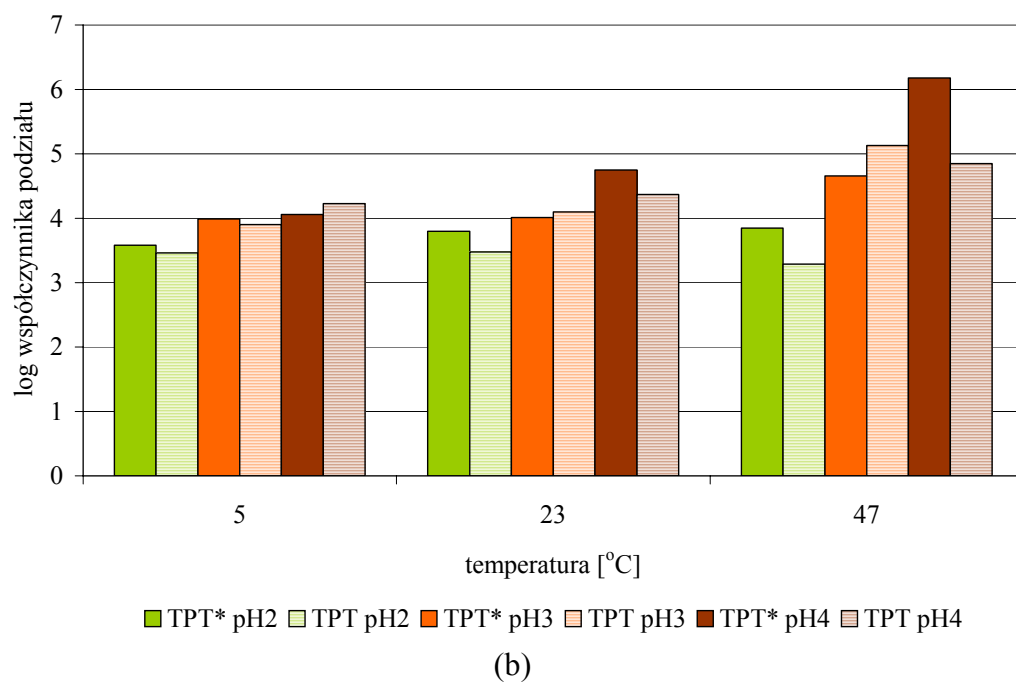
Zmiany struktury jonitów usieciowanych TEGDMA i TMPMA nie wpływają na proces sorbowania się potasu, natomiast w przypadku jonitu usieciowanego EGDMA podczas sorpcji potasu z roztworów o pH 4 możemy zaobserwować prawie dwukrotne zwiększenie wartości logarytmu współczynnika podziału w temperaturze 23°C (wzrost o 49%), a w temperaturze 47°C wartość logarytmu współczynnika podziału zwiększa się o 16%. Wartości logarytmu współczynnika podziału są jednak niewielkie w porównaniu z wynikami uzyskanymi podczas sorpcji miedzi i europu i wynoszą: 1,19, 2,32 i 1,42 w temperaturze odpowiednio 5, 23 i 47°C.

Na kopolimerach NIPAAm i MEP opisanych w [102,107] nie sorbowano potasu, nie znaleziono też innych prac na temat sorpcji tego pierwiastka na jonitach z grupami fosforanowymi.

Na rysunku 36 przedstawiono wykresy zależności logarytmu współczynnika podziału od temperatury podczas sorpcji europu z roztworów w zakresie pH 2-4 na jonitach usieciowanych dimetakrylanem glikolu etylenowego (TP8, TP12) lub dimetakrylanem glikolu trietylenowego (TPT\*, TPT) różniących się stopniem usieciowania.



(a)



(b)

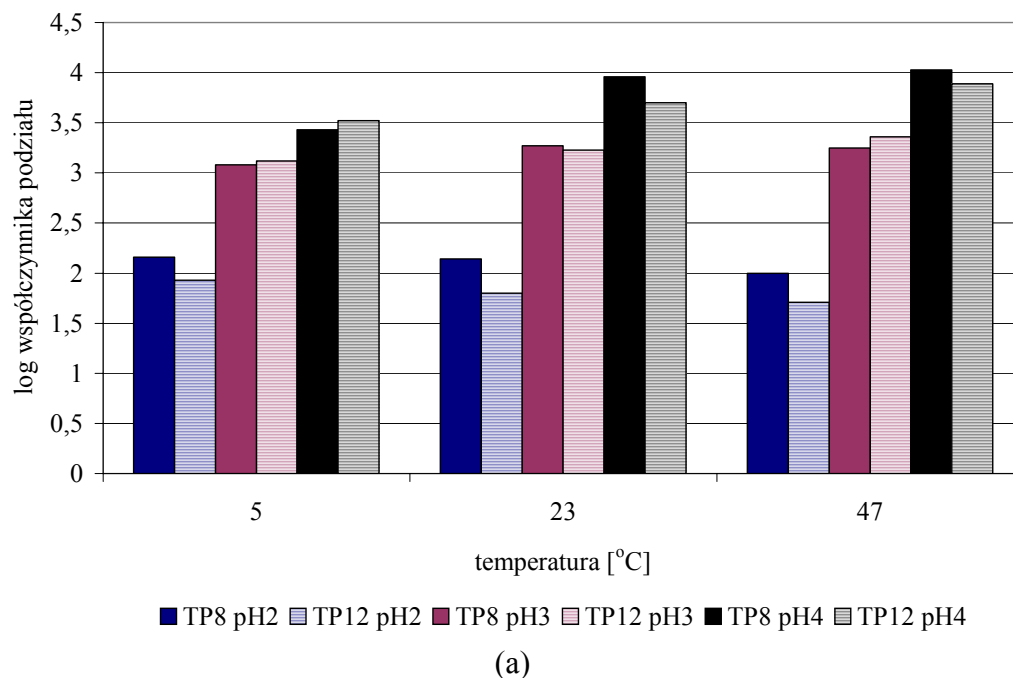
Rysunek 36 Wyniki sorpcji jonów europu na termoczułych jonitach usieciowanych EGDMA i TEGDMA

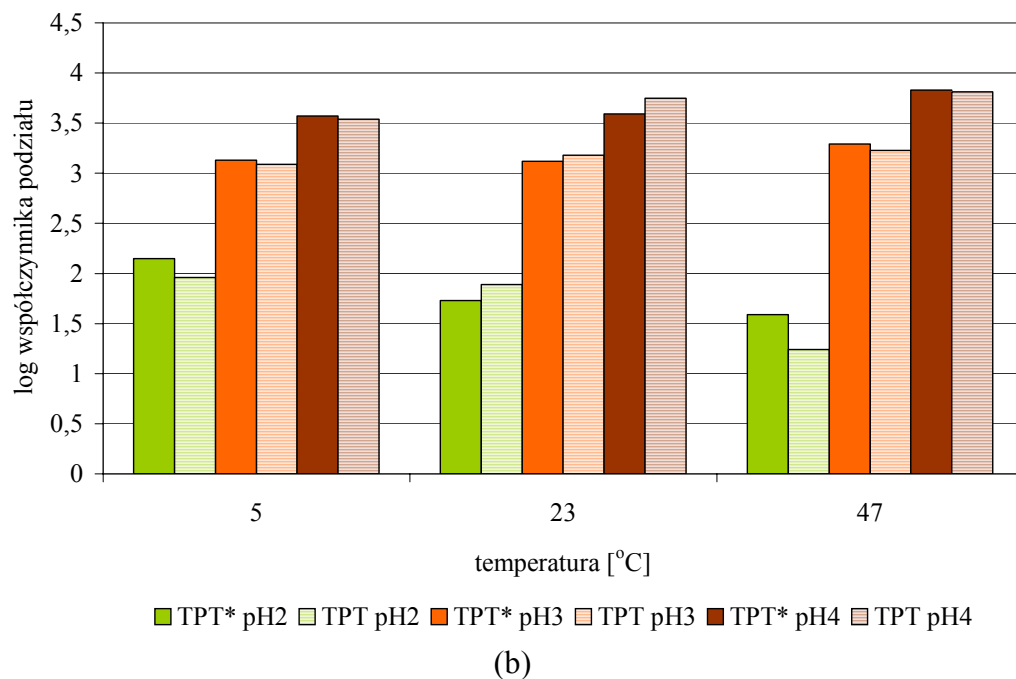
Analizując dane przedstawione na wykresach (rysunek 36 a) możemy zaobserwować, że w całym zakresie pH wartości logarytmu współczynnika podziału są większe dla jonitu TP12. Zaznacza się również wpływ temperatury na sorpcję europu, przy czym dla jonitu TP8 większe wartości logarytmu współczynnika podziału można zaobserwować dla wszystkich roztworów, a dla

jonitu TP12 większe wartości uzyskano podczas sorpcji z roztworów o pH 3 i 4. W obydwu przypadkach wpływ temperatury najsilniej zaznacza się podczas sorpcji z roztworów o pH 3.

Dla jonitów TPT\* i TPT (rysunek 36 b) wpływ stężenia środka sieciującego zaznacza się jedynie podczas sorpcji z roztworów o pH 4 w temperaturach 23 i 47°C. W pozostałych przypadkach wartości logarytmu współczynnika podziału są porównywalne. Wpływ temperatury możemy zaobserwować podczas sorpcji z roztworów o pH 3 i 4 dla obydwu jonitów, przy czym najsilniej zaznacza się on podczas sorpcji z roztworów o pH 4 zarówno dla TPT\*, jak i TPT.

Na rysunku 37 przedstawiono wykresy zależności logarytmu współczynnika podziału od temperatury podczas sorpcji miedzi z roztworów w zakresie pH 2-4 na jonitach usieciowanych dimetakrylanem glikolu etylenowego (TP8, TP12) i dimetakrylanem glikolu trietylenowego (TPT\*, TPT) różniących się stopniem usieciowania.





**Rysunek 37** Wyniki sorpcji jonów miedzi na termoczułych jonitach usieciowanych EGDMA i TEGDMA

Dla jonitów TP8 i TP12 (rysunek 37 a) wpływ ilości użytego środka sieciującego najsilniej zaznacza się podczas sorpcji z roztworów o pH 2. Wartości logarytmu współczynnika podziału są wówczas większe dla jonitu TP8. Podczas sorpcji z roztworów o pH 3 nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy obydwoma jonitami, a w pH 4 w temperaturze 5°C wartości logarytmu współczynnika podziału są nieco większe dla jonitu TP12, natomiast w temperaturach 23 i 47°C można zaobserwować odwrotną zależność.

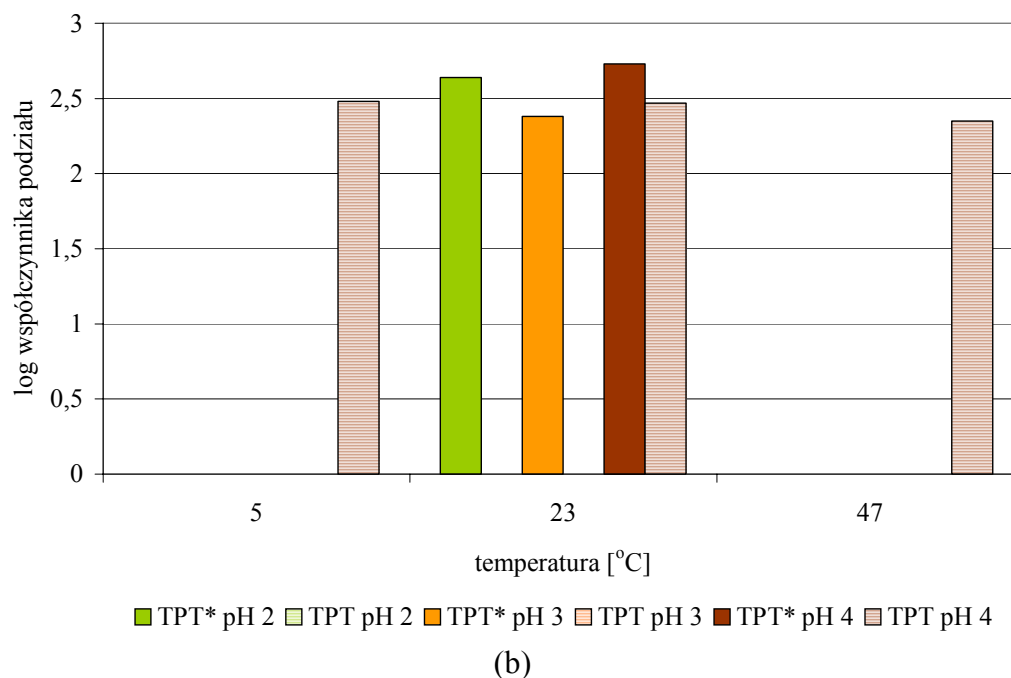
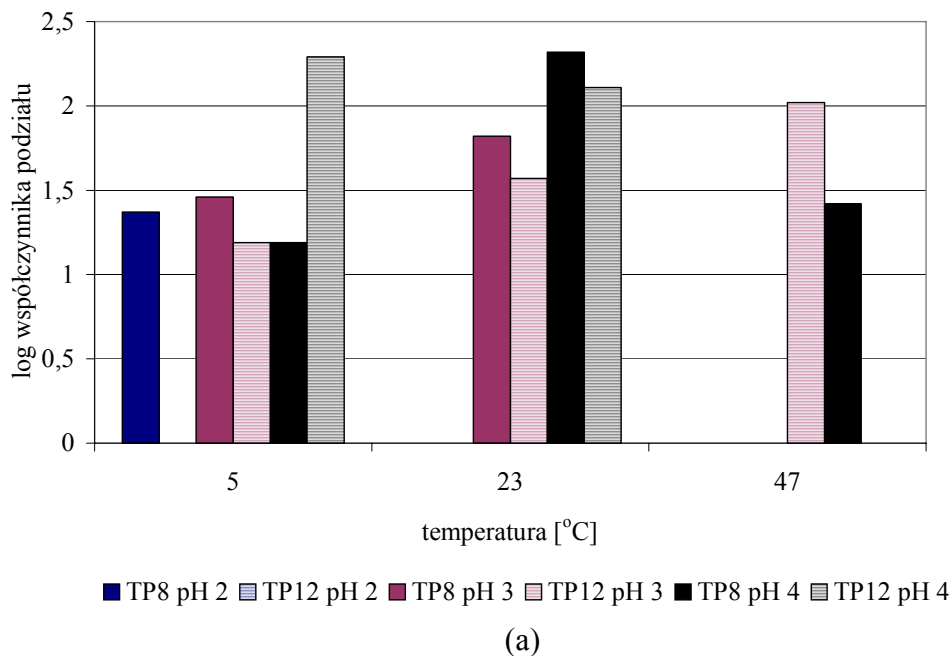
Dla jonitów TPT\* i TPT (rysunek 37 b) wpływ ilości środka sieciującego jest widoczny w pH 2, przy czym w temperaturach 5 i 47°C wartości logarytmu współczynnika podziału są nieco większe dla jonitu TPT\*, natomiast w temperaturze 23°C można zaobserwować odwrotną zależność.

Nie zaobserwowano wpływu temperatury na sorpcję miedzi, zarówno dla nośników usieciowanych EGDMA i TEGDMA.

Na rysunku 38 przedstawiono wykresy zależności logarytmu współczynnika podziału od temperatury podczas sorpcji potasu z roztworów w zakresie pH 2-4 na jonitach usieciowanych dimetakrylanem glikolu



etylenowego (TP8, TP12) i dimetakrylanem glikolu trietylenowego (TPT\*, TPT) różniących się stopniem usieciowania.



Rysunek 38 Wyniki sorpcji jonów potasu na termoczułych jonitach usieciowanych EGDMA i TEGDMA

Jak wspomniano wcześniej jonity usieciowane liniowymi środkami sieciującymi mają niewielkie powinowactwo do jonów potasu. Potas ze względu na zapełnioną powłokę walencyjną nie ulega koordynacji, co tłumaczy praktycznie zerową sorpcję z roztworów o pH 2 (rysunek 38 a), niewielkie ilości zostały zaadsorbowane na jonicie TP8, ale tylko w temperaturze 5°C, kiedy to mamy do czynienia ze spęcznionym polimerem.

Ze wzrostem pH rośnie nieco sorpcja potasu. Najwyższe wartości obserwujemy w pH 4, co może być spowodowane najsilniejszymi oddziaływaniami elektrostatycznymi. Nieco większe wartości logarytmu współczynnika podziału otrzymano dla TP8.

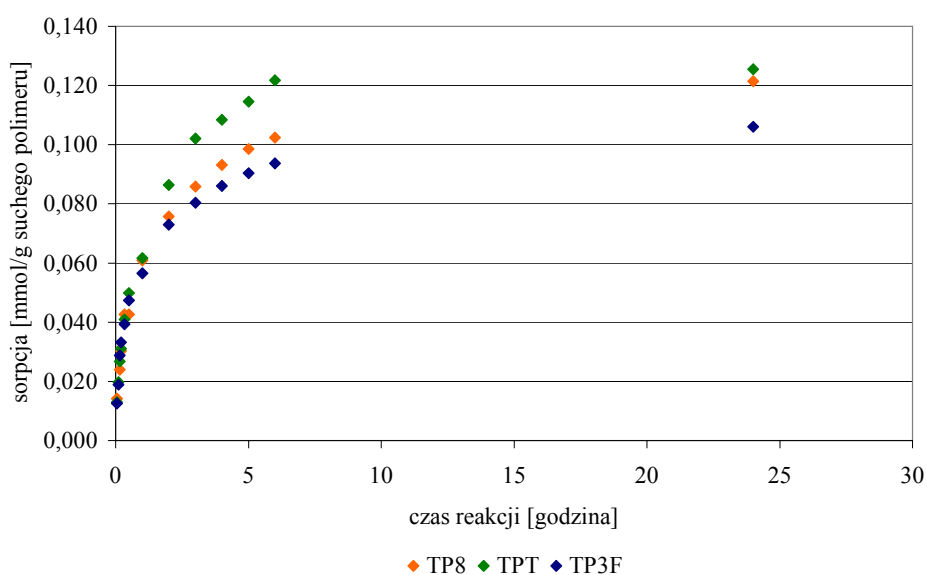
W temperaturze 23°C można zaobserwować największe wartości logarytmu współczynnika podziału.

Jonity usieciowane TEGDMA (rysunek 38 b) również nie sorbuje potasu z roztworów o pH 2. Z roztworów o pH 3 potas sorbuje się tylko w niewielkim stopniu i tylko na jonicie z mniejszą zawartością środka sieciującego – TPT\*. W przypadku sorpcji potasu z roztworów o pH 4 można zaobserwować większe wartości logarytmu współczynnika podziału dla TPT w całym zakresie temperatury.

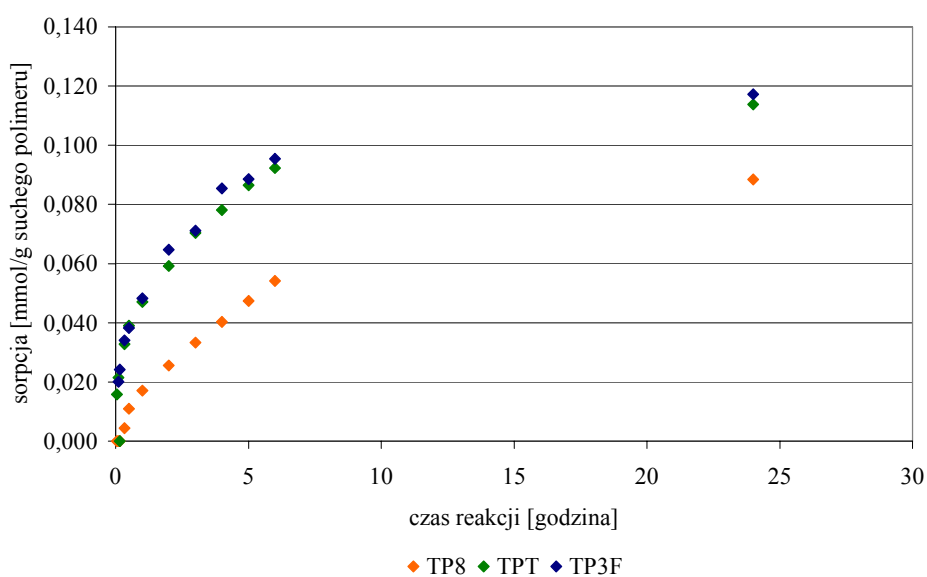
Nie zaobserwowano zwiększenia się sorpcji potasu na badanych jonitach w temperaturze powyżej VPTT.

#### 4.4 Kinetyka sorpcji jonów europu i miedzi

Dla jonitów różniących się środkiem sieciującym – TP8, TPT i TP3F- zbadano kinetykę sorpcji jonów europu i miedzi. W oparciu o uzyskane wyniki sorpcji europu i miedzi oraz stwierdzonym wpływie temperatury jedynie na sorpcję jonów europu, badanie kinetyki sorpcji dla europu przeprowadzono w temperaturze poniżej ( $5^{\circ}\text{C}$ ) i powyżej ( $47^{\circ}\text{C}$ ) VPTT, natomiast dla miedzi jedynie w temperaturze powyżej VPTT. Wykresy zależności sorpcji od czasu kontaktu jonitu z roztworem jonów metalu przedstawiono na rysunkach 39-41.



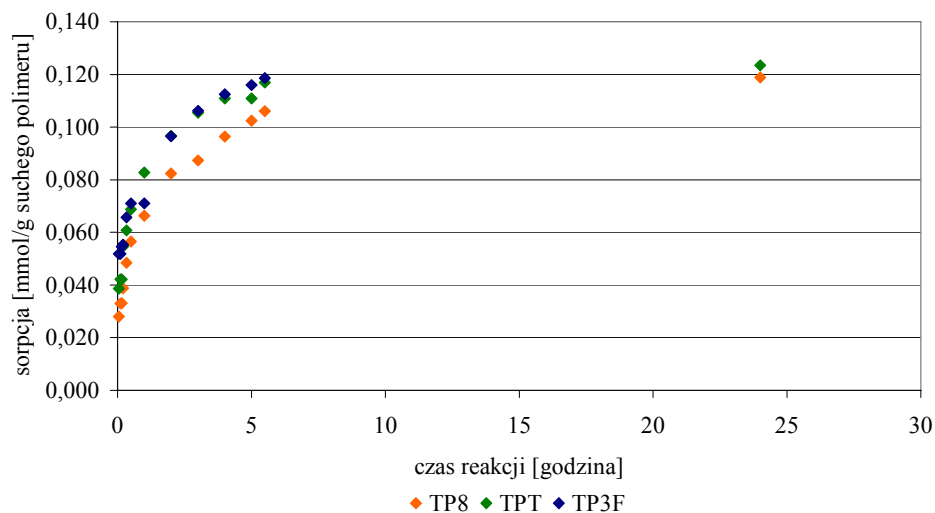
Rysunek 39 Kinetyka sorpcji jonów europu w temperaturze  $47^{\circ}\text{C}$



Rysunek 40 Kinetyka sorpcji jonów europu w temperaturze  $5^{\circ}\text{C}$

Analizując wykres kinetyki sorpcji europu w temperaturze powyżej VPTT jonitów - 47°C (rysunek 39), stwierdzono, że jonit TP3F usieciowany TMPMA już po 30 minutach osiąga 50% obsadzenie jonami metalu, podczas gdy jonity TP8, usieciowany EGDMA i TPT, usieciowany TEGDMA osiągają stan połowicznego obsadzenia po godzinie od rozpoczęcia procesu. W temperaturze poniżej VPTT - 5°C (rysunek 40), uzyskane różnice w czasie, w jakim następuje 50% obsadzenie jonitu metalem są jeszcze większe. Najkrótszy czas uzyskano ponownie dla żywicy TP3F i wynosi on w tym przypadku 1,5 godziny, jonit TPT potrzebuje 2 godzin, a TP8 - 5 godzin, aby osiągnąć stan połowicznego obsadzenia. W temperaturze 47°C europ znacznie szybciej jest sorbowany przez jonity, w skurczonym jonicie odległości pomiędzy sąsiednimi grupami  $-OP(O)(OH)_2$  są mniejsze, co ułatwia kompleksowanie wielowartościowych jonów. Dzięki pomiarom kinetyki w dwóch temperaturach można wywnioskować, że zmiana struktury jonitu powyżej temperatury VPTT powinna mieć największy wpływ na sorpcję europu na jonicie TP8, ze względu na największą różnicę w czasie dochodzenia do stanu połowicznego obsadzenia jonami metalu w obydwu temperaturach. Porównując wartości sorpcji po 24 godzinach w obydwu temperaturach obliczono o ile procent wzrosło stężenie europu w jonicie w temperaturze powyżej VPTT i najlepszy wynik uzyskano dla jonitu TP8, dla którego sorpcja wzrosła o 27%. Dla jonitu TPT sorpcja wzrosła o 9,5%, natomiast w przypadku jonitu TP3F nie zaobserwowano zwiększenia wartości stężenia europu w jonicie. Uzyskane wyniki są zbieżne z wcześniej opisanymi wynikami sorpcji na badanych jonitach (rozdział 4.3). W literaturze nie znaleziono danych dotyczących kinetyki sorpcji europu na jonitach z grupami fosforanowymi. W pracy [169] badano kinetykę sorpcji europu z roztworów  $5 \times 10^{-4} M$  w  $0,1 M HNO_3$  i stan połowicznego obsadzenia na żywicy XAD-7 napełnionej ekstrahentem z grupami fosfonowymi osiągnięto po 60 minutach. W pracy [170] opisano kinetykę sorpcji europu z roztworów o stężeniu  $10^{-4} M$  lub  $2,5 \times 10^{-3} M$  w  $0,05 M HNO_3$  na antymonianie uranu. Przy mniejszym stężeniu wyjściowego roztworu metalu praktycznie po 5 minutach następowało całkowite obsadzenie jonami metalu, natomiast przy większym stężeniu połowiczne obsadzenie jonami metalu następowało po 10 minutach.

Na rysunku 41 przedstawiono kinetykę sorpcji miedzi w temperaturze powyżej VPTT jonitów. Analizując wyniki, stwierdzono, że wszystkie trzy jonity osiągają stan połowicznego obsadzenia jonami miedzi po 30 minutach od czasu rozpoczęcia procesu. Ponadto wartości sorpcji po 24 godzinach dla TP8, TPT i TP12 są praktycznie jednakowe i wynoszą odpowiednio: 0,60, 0,62 i 0,63 mmol/g.



Rysunek 41 Kinetyka sorpcji jonów miedzi w temperaturze 47°C

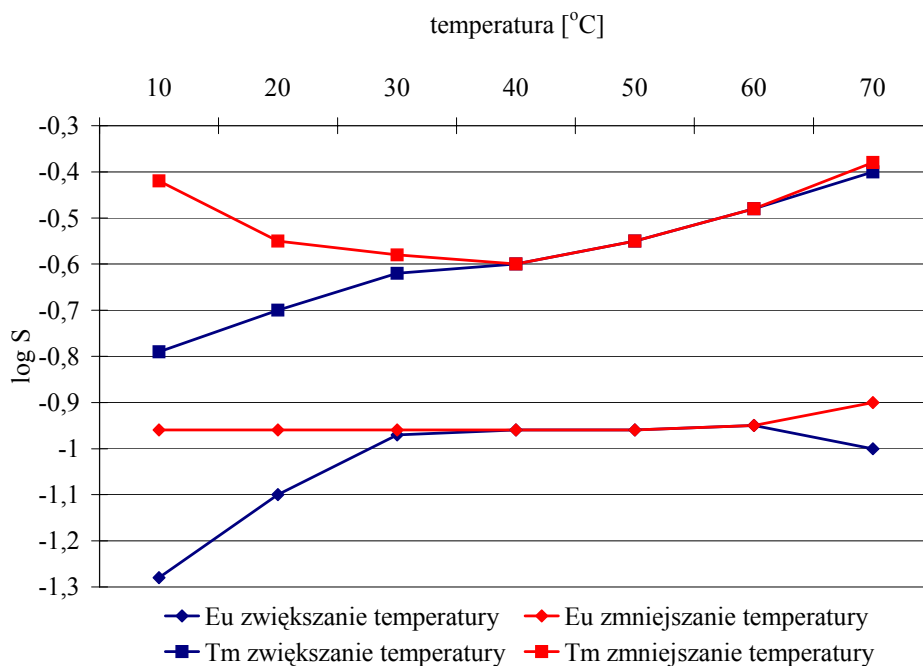
W pracy [171] opisano kinetykę sorpcji miedzi na żywicy Amberlite XAD2 napełnionej ekstrahentem z grupami kwasu fosforowego. Proces prowadzono z roztworów o stężeniu metalu  $10^{-4}\text{M}$ , stan połowicznego obsadzenia osiągnęto po 30 minutach.

Na podstawie przedstawionych danych literaturowych można stwierdzić, że szybkość obsadzenia jonami europu i miedzi termoczulych jonitów w temperaturze powyżej VPTT jest porównywalna z szybkością obsadzenia żywic XAD napełnionych ekstrahentami, a więc z szybkością dyfuzji w cieczy.

#### 4.5 Rozdział lantanowców

Na termoczułym jonicie TP8 zbadano sorpcję następujących metali: ceru (III), europu (III), terbu (III), tulu (III), kobaltu (II), baru (II) i cezu (I). Wyniki przedstawiono w postaci wykresów logarytmów współczynników selektywności wybranych par jonów w funkcji temperatury na rysunkach 42-44. Sorpcję prowadzono metodą ciągłą zwiększając temperaturę w zakresie 10-70°C, a następnie obniżając w zakresie 70-10°C.

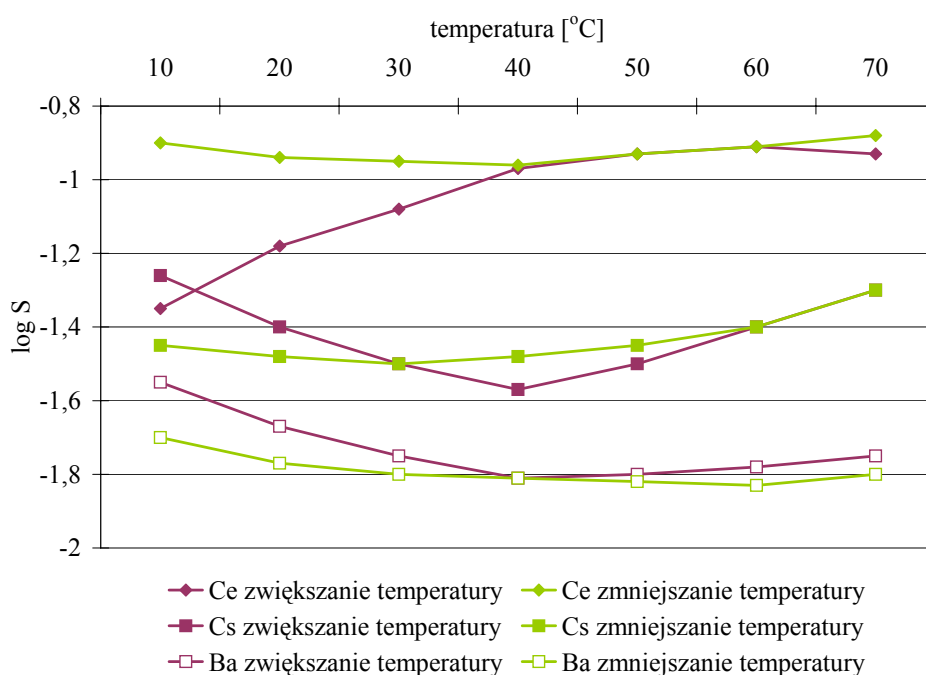
Na rysunku 42 przedstawiono zależność logarytmu współczynników selektywności w funkcji temperatury dla trójwartościowych jonów europu i tulu. Podczas zwiększania temperatury logarytmy współczynników selektywności zwiększają się dla obydwu pierwiastków, przy czym dla tulu zwiększają się o 50%, a dla europu o 26%. Można ponadto zauważyć, że jonit TP8 wykazuje większe powinowactwo do jonów tulu.



Rysunek 42 Logarytm współczynnika selektywności w funkcji temperatury dla jonów europu i tulu

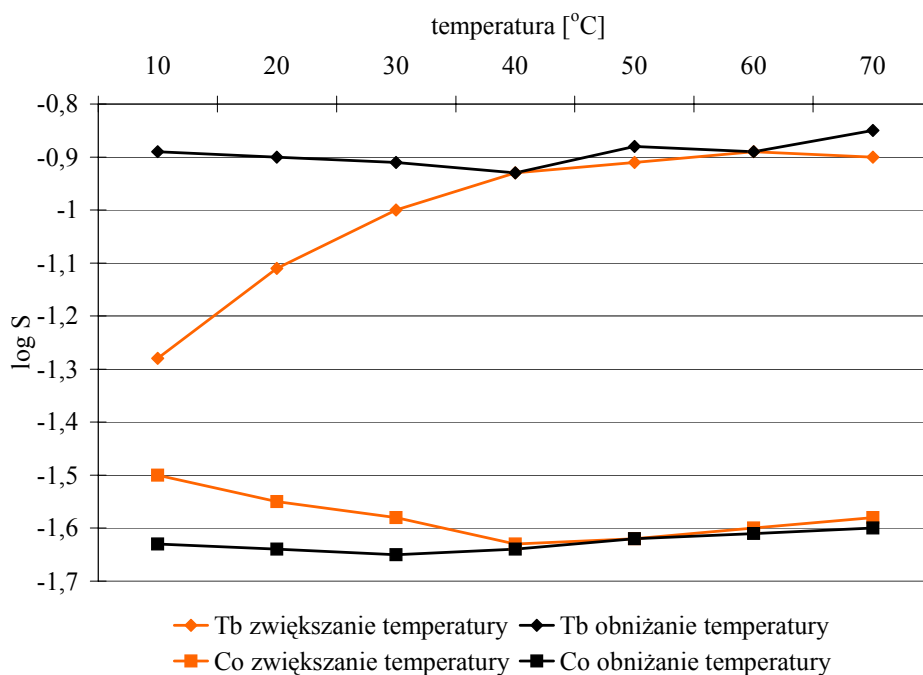
Na rysunku 43 przedstawiono zależność logarytmu współczynników selektywności w funkcji temperatury dla trójwartościowych jonów ceru,

dwuwartościowych jonów baru i jednowartościowych jonów cezu. Wartości logarytmu współczynnika selektywności wyraźnie zwiększają się (o 33%) ze zwiększaniem temperatury jedynie w przypadku trójwartościowego ceru. W przypadku dwuwartościowych jonów baru zwiększenie temperatury nie powoduje zwiększenia wartości  $\log k$ , natomiast w przypadku jednowartościowego cezu logarytm współczynnika selektywności zmniejsza się w zakresie temperatury 10-40°C o 20% i zwiększają się w zakresie temperatury 40-70°C o 24%. Selektywność jonitu TP8 przedstawia się następująco:  $Ce^{3+} > Cs^+ > Ba^{2+}$ .



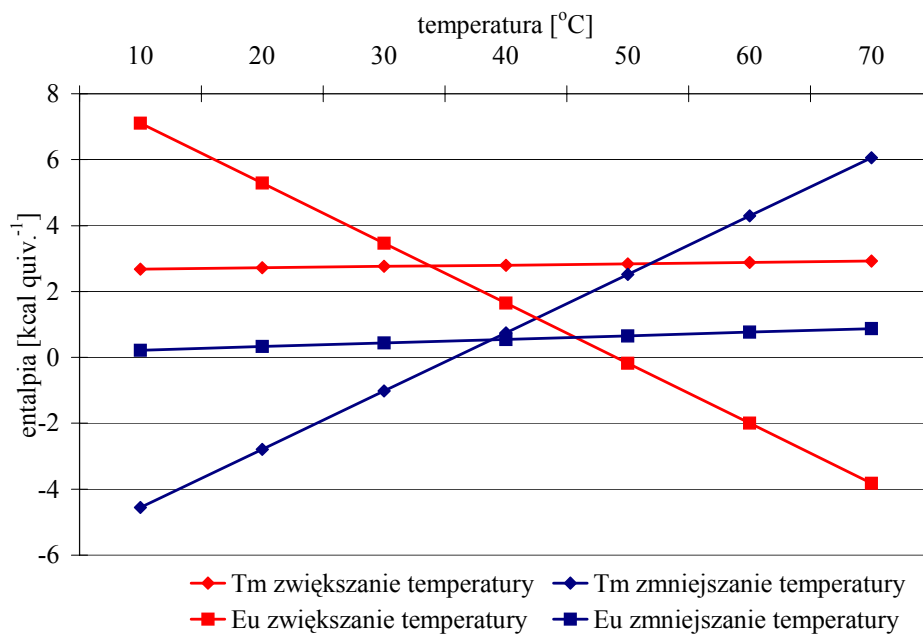
**Rysunek 43** Logarytm współczynnika selektywności w funkcji temperatury dla jonów ceru, cezu i baru

Na rysunku 44 przedstawiono zależność logarytmu współczynników selektywności w funkcji temperatury dla trójwartościowych jonów terbu i dwuwartościowych jonów kobaltu. Zmiany struktury jonitu spowodowane zwiększaniem temperatury wpływają na sorpcję trójwartościowych jonów terbu, logarytm współczynników selektywności zwiększa się o 30% powyżej VPTT. Jonit ma większe powinowactwo do jonów terbu w porównaniu z dwuwartościowymi jonami kobaltu.



Rysunek 44 Logarytm współczynnika selektywności w funkcji temperatury dla jonów terbu i kobaltu

Na rysunkach 45 i 46 przedstawiono zależność entalpii i entalpii swobodnej w funkcji temperatury dla wybranych jonów. Dla jonów europu i terbu entalpia jest funkcją temperatury (rysunek 45).

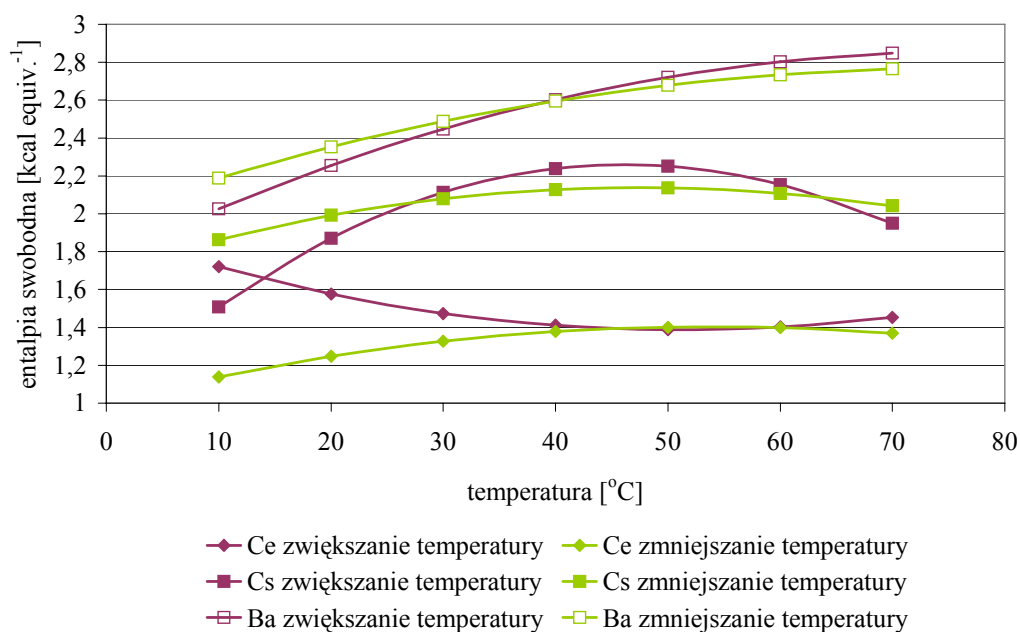


Rysunek 45 Zmiana entalpii w funkcji temperatury dla jonów europu i terbu



Ponadto wartość entalpii przekracza wartość 3 kcal/equiv. dla europu podczas zwiększania temperatury w zakresie 10-30°C, a dla tulu podczas obniżania temperatury w zakresie 70-60°C i wynoszą dla europu odpowiednio 7,11-3,47 kcal/equiv. oraz dla tulu 6,06-4,29 kcal/equiv.. Sugeruje to, że wiązanie pomiędzy jonem metalu a grupami funkcyjnymi jonitu nie jest jonowe, a przeważa koordynacja poprzez tlen grupy fosforanowej.

Na rysunku 46 przedstawiono zmianę entalpii swobodnej w funkcji temperatury dla ceru, baru i cezu. Analizując wyniki stwierdzono, że dla cezu krzywa posiada ekstremum w zakresie temperatury 40-60°C, co wyjaśniałoby zwiększanie się logarytmu współczynników selektywności cezu powyżej temperatury 40°C (rysunek 43). Im mniejsza wartość entalpii swobodnej, tym silniejsze kompleksy tworzy dany metal z grupami funkcyjnymi jonitu. Otrzymane wyniki są zbieżne z wyznaczonym na podstawie rysunku 43 szeregiem selektywności. Najmniejsze wartości entalpii swobodnej otrzymano dla ceru, a największe dla baru.



Rysunek 46 Zmiana entalpii swobodnej w funkcji temperatury dla jonów ceru, cezu i baru

## 4.6 Immobilizacja inwertazy

### 4.6.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH<sub>2</sub> i TG8-NH<sub>2</sub>

Inwertazę immobilizowano metodą „ssania” na nośniku z grupami hydroksylowymi (TH8) oraz aminowymi (TH8-NH<sub>2</sub> i TG8-NH<sub>2</sub>), wyniki przedstawiono w tabeli 13. Grupy aminowe, wprowadzone na powierzchnię podczas modyfikacji etylenodiaminą, mają istotne znaczenie podczas sieciowania nośników z immobilizowanym enzymem za pomocą aldehydu glutarowego. Oprócz łączenia się cząsteczek enzymu pomiędzy sobą może następować wiązanie z powierzchnią nośnika.

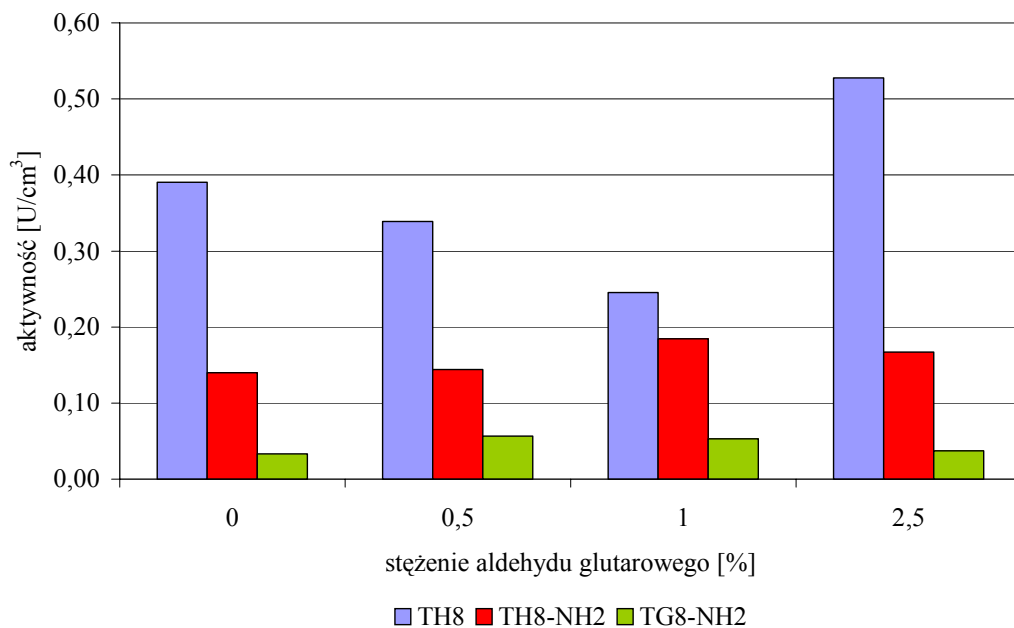
Nowa metoda immobilizacji opiera się na termoczulych właściwościach kopolimerów NIPAAm. Nośniki takie działają jak pompy – „zasysają” cząsteczki białka podczas rozkurczania i uwalniają je podczas kurczenia. W publikacji [172] opisano badania dotyczące uwalniania biocząsteczek z termoczułego żelu w temperaturze 37°C, przy czym cząsteczki nie były uprzednio „zasysane” podczas rozkurczania żelu. Immobilizacja następowała w wyniku dyfuzji do spęcznionego żelu w temperaturze 4°C, proces prowadzono przez 15 dni. Najważniejszym etapem immobilizacji metodą opracowaną w ramach tej pracy doktorskiej jest ogrzanie nośnika powyżej jego temperatury VPTT, a następnie, po dodaniu roztworu enzymu, szybkie obniżenie temperatury poniżej VPTT nośnika tak, aby nośnik podczas gwałtownego rozkurczania „zasysał” cząsteczki enzymu w głąb sieci polimerowej. Aby zapobiec uwalnianiu enzymu podczas „pracy nośnika” w temperaturze powyżej VPTT, użyto aldehydu glutarowego jako czynnika sieciującego. Aldehyd glutarowy jest powszechnie stosowanym środkiem sieciującym podczas immobilizacji enzymów i komórek [132-134]. Otrzymano w rezultacie wzajemnie przenikające się sieci: sieć termoczułego polimeru odpowiedzialnego za dostępność enzymu dla substratu oraz usieciowany enzym.

**Tabela 13 Wyniki uzyskane dla preparatów z immobilizowaną inwertazą w obecności sacharozy**  
 Aktywność specyficzna inwertazy natywnej: 3123,5 [U/mg]

Nośnik		Białko związane [mg/cm <sup>3</sup> ]	Aktywność [U/cm <sup>3</sup> ]	Wydajność immobilizacji [%]		Aktywność specyficzna [U/mg]	Stabilność [%]
				Białko	Aktywność		
TH8	B	0,112	0,390	22,22	0,03	3,486	31,3
	0,5		0,339		0,02	3,028	21,5
	1		0,246		0,02	2,193	34,4
	2,5		0,528		0,03	4,713	11,0
TH8-NH <sub>2</sub>	B	0,118	0,140	23,41	0,01	1,185	50,1
	0,5		0,144		0,01	1,221	65,2
	1		0,185		0,01	1,564	58,8
	2,5		0,167		0,01	1,417	65,2
TG8-NH <sub>2</sub>	B	0,070	0,033	13,89	0,00	0,473	43,5
	0,5		0,057		0,00	0,811	44,7
	1		0,053		0,00	0,757	49,3
	2,5		0,037		0,00	0,533	59,3

(B-bufor, 0,5-0,5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1,0% roztwór aldehydu glutarowego, 2,5-2,5% roztwór aldehydu glutarowego)

Wykres na rysunku 47 przedstawia aktywność preparatów w obecności sacharozy oznaczoną po immobilizacji.



Rysunek 47 Aktywność nośników w obecności sacharozy

W przypadku immobilizowanych enzymów, ilość związanego białka oraz jego aktywność zależą od chemicznej i fizycznej struktury nośnika [173].

Do immobilizacji użyto nośników z grupami hydroksylowymi oraz nośników, w których grupy hydroksylowe i epoksydowe zmodyfikowano przy pomocy etylenodiaminy. Ich właściwości opisano w rozdziale 4.2. Obecność grup aminowych na powierzchni jest istotna podczas sieciowania preparatów aldehydem glutarowym. Istnieje wówczas możliwość utworzenia dodatkowych wiązań kowalencyjnych pomiędzy cząsteczkami enzymu a nośnikiem. Niezmodyfikowane nośniki TH8 i TG8 charakteryzują się stosunkowo dużą hydrofobowością, co przekłada się na małą chłonność wody (tabela 10). Chłonność zmodyfikowanych kopolimerów jest większa. Grupy aminowe powodują, że kopolimery są bardziej hydrofilowe. Modyfikacja wpływa również na temperaturę VPTT nośników, która przed modyfikacją jest niższa. Świadczy to również o zwiększeniu hydrofilowości nośników po modyfikacji.

Zawartość grup aminowych na nośniku jest prawie dziesięciokrotnie większa dla TG8 w porównaniu z TH8. Nośnik TG8 jest bardziej podatny na aminolizę ze względu na obecność wysoce reaktywnych grup epoksydowych.

Do immobilizacji użyto enzymu technicznego, co oznacza, że oprócz białka katalitycznego obecne były również białka balastowe. Konieczność użycia takiego enzymu, który jest termostabilny, wynikała z warunków prowadzenia procesu immobilizacji – początkowego ogrzania nośników i enzymu do temperatury 50°C, a następnie gwałtownego ochłodzenia układu enzym-nośnik do temperatury 4°C.

Dla nośnika TG8-NH<sub>2</sub> uzyskano praktycznie jednakową aktywność dla wszystkich preparatów. Aktywność ta była mała, przy czym nieco większe wartości uzyskano dla preparatów usieciowanych 0,5 i 1,0% aldehydem glutarowym, wynosiły one odpowiednio 0,057 i 0,053 [U/cm<sup>3</sup>], natomiast dla preparatów nieusieciowanego i usieciowanego 2,5% aldehydem glutarowym uzyskane wartości wynosiły odpowiednio 0,033 i 0,037 [U/cm<sup>3</sup>].

Nośniki TH8 i TH8-NH<sub>2</sub> były bardziej aktywne, w szczególności preparaty usieciowane 1 i 2,5% aldehydem glutarowym.

Nośniki zmodyfikowane przed immobilizacją etylenodiaminą są bardziej stabilne niż nośnik niezmodyfikowany. Istotne znaczenie mogą tu mieć grupy aminowe, które podczas sieciowania preparatów aldehydem glutarowym mogły brać udział w tworzeniu dodatkowych wiązań kowalencyjnych pomiędzy nośnikiem a enzymem, zapobiegając w ten sposób wymywaniu białka z preparatu [174,175]. Ponadto preparaty usieciowane aldehydem glutarowym są nieco bardziej stabilne niż preparaty nieusieciowane.

Aktywność preparatów TH8-NH<sub>2</sub> w buforze i usieciowanych 0,5 aldehydem glutarowym praktycznie nie różni się. Dla próbki usieciowanej 2,5% aldehydem glutarowym zaobserwowano gwałtowne zmniejszenie aktywności. Może to być spowodowane dalszym sieciowaniem preparatu po immobilizacji i w rezultacie tak dużym usztywnieniem sieci polimerowej, które znacząco zmniejsza dostępność enzymu dla substratu. Ponadto tak duże stężenie użytego środka sieciującego mogło również spowodować wielopunktowe związanie cząsteczek białka, co może uniemożliwiać zmiany konformacji enzymu i w rezultacie zmniejszać jego aktywność katalityczną.

Aktywność specyficzna natywnego enzymu jest dużo większa od aktywności specyficznej enzymu immobilizowanego. Oddziaływanie enzymu z hydrofobowym nośnikiem może powodować deformację cząsteczek białka. Białka mogą posiadać wewnątrz cząsteczki „hydrofobowe kieszenie”, które

w drastycznych warunkach reakcji, na przykład w bardzo wysokiej temperaturze, są eksponowane do środowiska reakcji powodując adsorpcję na nośniku oraz jednocześnie zniekształcenie centrum aktywnego [136]. Nie zaobserwowano znaczących różnic w aktywności specyficznej nośników nie- i usieciowanych aldehydem glutarowym, co sugeruje, że na aktywność mają wpływ jeszcze inne czynniki. Jednym z nich może być zbyt gęste upakowanie cząsteczek enzymu na powierzchni nośnika, co powoduje utrudnienia w dyfuzji substratu.

Wydajność immobilizacji dla aktywności jest praktycznie równa zero. Przykładowo immobilizacja inwertazy w żelu alginianu sodu przebiega z wydajnością 30% [176], a nawet 87% [130]. Prawdopodobnie stężenie enzymu użytego do immobilizacji było zbyt wysokie, co spowodowało, że białko przyłączyło się warstwami, jedno na drugim. W takiej sytuacji początkowo jedynie zewnętrzna warstwa przejawia aktywność i dopiero po jej denaturacji „ujawniają” się kolejne (tzw. efekt Zulu) [177]. Nie znaleziono w literaturze przykładów immobilizacji inwertazy w termoczułym żelu metodą zasysania enzymu w trakcie rozkurczania nośnika.

#### 4.6.2 „Ssanie” na nośniku T8

Inwertazę immobilizowano metodą „ssania” na kopolimerze N-izopropylakryloamidu i dimetakrylanu glikolu etylenowego. Aktywność otrzymanych preparatów oznaczono w obecności 6% sacharozy i uzyskano następujące wyniki przedstawione w tabeli 14.

**Tabela 14 Aktywność preparatu z immobilizowanym enzymem**

<i>Nośnik</i>	<i>Aktywność [U/cm<sup>3</sup>]</i>
T8-B	0,048
T8-0,5	0,032
T8-1,0	0,040
T8-2,5	0,036

(B-bufor, 0,5-0,5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1,0% roztwór aldehydu glutarowego, 2,5-2,5% roztwór aldehydu glutarowego)

Nośniki T8 z immobilizowaną inwertazą charakteryzują się małą aktywnością w obecności sacharozy. Dla nośnika nieusieciowanego aldehydem glutarowym aktywność jest nieco większa w porównaniu z nośnikami usieciowanymi. Stężenie użytego aldehydu glutarowego nie wpływa na wartość aktywności preparatów enzymatycznych.

Z uwagi na małą aktywność nie wyznaczono stabilności nośnika i nie został on wykorzystany do dalszych badań.

#### **4.6.3 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach: TAEMA, TH8-NH<sub>2</sub>, TG8-NH<sub>2</sub>, TH8, TMA i TG8**

Inwertazę immobilizowano kowalencyjnie na nośnikach z grupami aminowymi (TAEMA, TH8-NH<sub>2</sub>, TG8-NH<sub>2</sub>), hydroksylowymi (TH8), karboksylowymi (TMA) i epoksydowymi (TG8). Proces prowadzono w różnych warunkach w zależności od rodzaju grup funkcyjnych nośnika i z tego względu aktywność specyficzną białka natywnego oznaczono w roztworach o pH 5, 7 i 8. Immobilizację na nośniku z grupami karboksylowymi prowadzono w pH 5, nośnik został zaktywowany karbodiimidem. Grupy aminowe zaktywowano aldehydem glutarowym, proces unieruchamiania przebiegał w pH 7. Natomiast w pH 8 immobilizowano inwertazę na nośniku z grupami epoksydowymi oraz hydroksylowymi, które zostały zaktywowane diwinylosulfonem. W tabeli 15 zebrano uzyskane wyniki.

**Tabela 15 Aktywność preparatów w obecności sacharozy**

Aktywność specyficzna inwertazy natywnej: 1350,4 (pH 5), 1212,3 (pH 7), 1079,9 (pH 8) [U/mg]

Nośnik	Białko związane [mg/cm <sup>3</sup> ]	Aktywność [U/cm <sup>3</sup> ]	Wydajność immobilizacji [%]		Aktywność specyficzna [U/mg]	Stabilność [%]
			Białko	Aktywność		
TAEMA	0,865	0,888	72,1	0,03	1,03	88,3
TG8-NH <sub>2</sub>	0,888	0,395	74,1	0,02	0,45	54,2
TH8-NH <sub>2</sub>	0,802	0,658	66,9	0,03	0,82	67,6
TG8	0,880	0,395	71,2	0,02	0,45	63,0
TH8	0,741	0,592	60,0	0,03	0,80	42,1
TMA	0,627	0,395	55,7	0,02	0,63	36,2

Analizując uzyskane wyniki dotyczące wydajności immobilizacji stwierdzono, że wydajność immobilizacji białka jest bardzo duża, co oznacza, że większość natywnego białka związała się z nośnikiem. Największe wartości uzyskano podczas immobilizacji inwertazy na nośnikach z grupami aminowymi, czyli TAEMA, TG8-NH<sub>2</sub> i TH8-NH<sub>2</sub>. Zależność ta jest szczególnie wyraźna, jeżeli porównamy wartości uzyskane dla TG8 i TH8 oraz ich zmodyfikowanych etylenodiaminą odpowiedników. Najmniejszą wartość wydajności immobilizacji dla białka uzyskano dla nośnika z grupami karboksylowymi - TMA.

Pomimo dużego stężenia związanego białka, wydajność immobilizacji dla aktywności jest bardzo mała dla wszystkich nośników. Taka sytuacja może być spowodowana wielopunktowym wiązaniem enzymu z nośnikiem, które powoduje usztywnienie struktury białka i w rezultacie zmniejsza jego aktywność. Termoczule nośniki są dość hydrofobowe, może to powodować dodatkową adsorpcję białka, powodującą zniekształcenie centrum aktywnego [136]. Mała wydajność immobilizacji dla aktywności może być też spowodowana przeładowaniem nośnika. Użycie enzymu wyjściowego o zbyt dużym stężeniu powoduje, że białko immobilizuje się warstwami, jedno na drugim, powodując, że początkowo jedynie zewnętrzna warstwa przejawia aktywność i dopiero po jej denaturacji „ujawniają” się kolejne (tzw. efekt Zulu) [177]. W literaturze



znaleziono przykłady immobilizacji glukoamylazy na membranach poli(HEMA-co-GMA) z 40% wydajnością [178] oraz na suspensyjnych kopolimerach metakrylanu glicydylu i metakrylanu metylu szczepionymi polietylenoiminą z wydajnością 66% [179].

Aktywność w obecności substratu, sacharozy, jest największa dla nośnika TAEMA. Pozostałe dwa nośniki z grupami aminowymi są dość aktywne, ale uzyskane wyniki są porównywalne z wynikami uzyskanymi dla ich niezmodyfikowanych odpowiedników oraz TMA. Przepuszczalnie warunki, w których prowadzony był proces immobilizacji wpłynęły na aktywność uzyskanych preparatów. Immobilizację prowadzono w temperaturze pokojowej, gdy nośniki były rozkurczone, natomiast aktywność badano w temperaturze 50°C, czyli powyżej VPTT nośników. W tej sytuacji cząsteczki enzymu mogły być schowane wewnątrz sieci polimerowej, przez co dostęp substratu do centrum aktywnego enzymu był utrudniony.

Nośniki z grupami aminowymi oraz epoksydowymi są najbardziej stabilne, nośnik TAEMA zachowuje blisko 90% aktywności początkowej po miesiącu przechowywania. Inwertaza immobilizowana na nośnikach z grupami hydroksylowymi i karboksylowymi zachowuje po miesiącu przechowywania odpowiednio 42 i 36% aktywności początkowej.

## 4.7 Immobilizacja glukoamylazy

### 4.7.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH<sub>2</sub> i TG8-NH<sub>2</sub>

Glukoamylazę immobilizowano metodą „ssania” opisaną w paragrafie 4.6.1.

W tabelach 16 i 17 przedstawiono uzyskane wyniki.

**Tabela 16 Wyniki uzyskane dla preparatów z immobilizowaną glukoamylazą w obecności skrobi**  
Aktywność specyficzna glukoamylazy natywnej: 9,24 [U/mg])

Nośnik		Białko związane [mg/cm <sup>3</sup> ]	Aktywność [U cm <sup>3</sup> ]	Wydajność immobilizacji [%]		Aktywność specyficzna [U/mg]	Stabilność [%]
				Białko	Aktywność		
TH8	B	18,76	2,025	38,68	1,23	0,108	9,0
	0,5		1,603		0,98	0,085	56,1
	1		1,433		0,87	0,076	75,0
	2,5		1,627		0,99	0,087	78,1
TH8-NH <sub>2</sub>	B	14,18	1,907	29,24	1,28	0,135	23,6
	0,5		3,381		2,27	0,239	58,8
	1		3,403		2,28	0,240	84,1
	2,5		3,627		2,43	0,256	100,0
TG8-NH <sub>2</sub>	B	15,71	0,387	32,39	0,25	0,025	16,2
	0,5		1,747		1,14	0,111	10,2
	1		0,627		0,41	0,040	35,5
	2,5		0,567		0,37	0,036	39,9

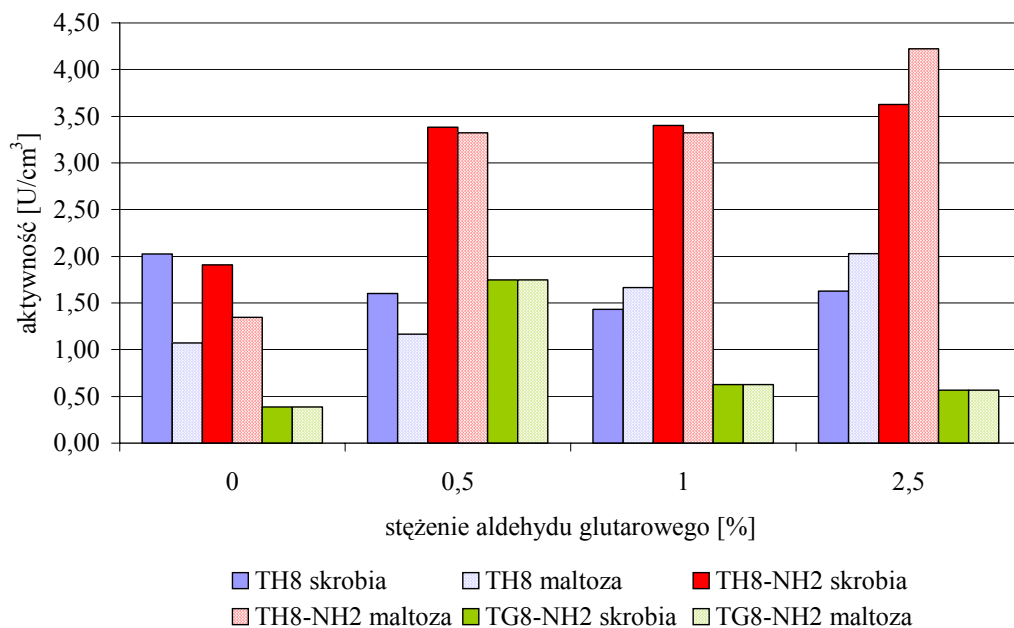
(B-bufor, 0,5-0,5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1,0% roztwór aldehydu glutarowego, 2,5-2,5% roztwór aldehydu glutarowego)

Tabela 17 Wyniki uzyskane dla preparatów z immobilizowaną glukoamylazą w obecności maltozy

Aktywność specyficzna glukoamylazy natywnej: 5,69 [U/mg])

Nośnik		Białko związane [mg/cm <sup>3</sup> ]	Aktywność [U/cm <sup>3</sup> ]	Wydajność immobilizacji [%]		Aktywność specyficzna [U/mg]	Stabilność [%]
				Białko	Aktywność		
TH8	B	18,76	1,071	38,68	0,91	0,057	23,4
	0,5		1,166		0,99	0,062	85,9
	1		1,666		1,41	0,089	69,5
	2,5		2,028		1,72	0,108	68,1
TH8-NH <sub>2</sub>	B	14,18	1,345	29,24	1,47	0,095	61,3
	0,5		3,324		3,64	0,234	69,1
	1		3,322		3,64	0,234	89,1
	2,5		4,223		4,63	0,298	76,0
TG8-NH <sub>2</sub>	B	15,71	0,274	32,39	0,29	0,017	69,0
	0,5		1,129		1,18	0,072	25,9
	1		0,767		0,80	0,049	45,5
	2,5		0,901		0,94	0,057	30,9

(B-bufor, 0,5-0,5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1,0% roztwór aldehydu glutarowego, 2,5-2,5% roztwór aldehydu glutarowego)



Rysunek 48 Aktywność nośników w obecności skrobi i maltozy

Użyteczność nośnika do immobilizacji określają następujące parametry:

- ilość związanego białka,
- aktywność enzymu,
- aktywność specyficzna enzymu immobilizowanego,
- stabilność.

Jak wspomniano wcześniej wiele białek zmienia swoją konformację w wyniku adsorpcji, powoduje to zmniejszenie lub utratę zdolności katalitycznych [136].

Modyfikacja nośników etylenodiaminą powoduje zwiększenie aktywności immobilizowanej glukoamylazy. Może być to spowodowane zwiększeniem hydrofilowości nośników. Dodatkowo część grup aldehydowych może reagować z grupami aminowymi nośnika, a nie enzymu powodując zmniejszenie prawdopodobieństwa wielopunktowego wiązania enzymu z nośnikiem. W rezultacie struktura enzymu nie jest bardzo usztywniona i dostęp do centrum aktywnego jest ułatwiony.

Aktywność nośników badano w obecności dwóch substratów: wielkocząsteczkowej skrobi i małocząsteczkowej maltozy. Największe wartości aktywności w obecności skrobi uzyskano dla nośnika TH8-NH<sub>2</sub>, wartości te zwiększały się wraz ze zwiększaniem stężenia aldehydu glutarowego.

W przypadku nośnika TH8 otrzymano odwrotną zależność: nieusieciowany preparat był bardziej aktywny, a ponadto zwiększanie stężenia aldehydu glutarowego nie wpłynęło w znaczący sposób na wartości aktywności preparatów. Sieciowanie niezmodyfikowanego etylenodiaminą nośnika powoduje, że tylko cząsteczki enzymu ulegają sieciowaniu pomiędzy sobą, tworzy się sieć, która może utrudniać dyfuzję wielkocząsteczkowego substratu do centrum aktywnego. Najmniejsze wartości aktywności uzyskano dla nośnika TG8-NH<sub>2</sub>, zarówno dla nieusieciowanego preparatu, jak i preparatów usieciowanych 1,0 i 2,5% aldehydem glutarowym. Dla preparatu usieciowanego 0,5% aldehydem glutarowym uzyskane wartości aktywności były znacznie większe. Zawartość grup aminowych na nośniku TG8-NH<sub>2</sub> jest prawie 10-krotnie większa w porównaniu z nośnikiem TH8-NH<sub>2</sub>. Prawdopodobnie aldehyd glutarowy w stężeniach wyższych od 0,5% powoduje zbyt gęste usieciowanie, prowadzące do znacznego zniekształcenia konformacji enzymu i w rezultacie do zmniejszenia jego aktywności katalitycznej.

Aktywność immobilizowanej glukoamylazy w obecności maltozy była największa dla nośnika TH8-NH<sub>2</sub>. Zależność od stężenia użytego aldehydu glutarowego była niemal identyczna jak w obecności skrobi, różnicę zaobserwowano dla preparatu usieciowanego 2,5% aldehydem, który charakteryzował się większą aktywnością w obecności maltozy. Przyczyną takiego stanu może być „rozmiar” substratu, maltoza jest związkiem małocząsteczkowym i większe usieciowanie nie powoduje ograniczenia dostępności enzymu. W przypadku nośnika TH8, wartości aktywności zwiększają się ze zwiększaniem stężenia aldehydu glutarowego, co potwierdza stwierdzenie, że małocząsteczkowa maltoza swobodnie dyfunduje do cząsteczki enzymu nawet w bardzo usieciowanych preparatach. Dla nośnika TG8-NH<sub>2</sub> uzyskano, podobnie jak w obecności skrobi, najmniejsze wartości aktywności.

Analizując wydajność immobilizacji dla aktywności w obecności skrobi i maltozy stwierdzono, że dla nośników TH8 i TG8-NH<sub>2</sub> uzyskano zbliżone wyniki. W przypadku TH8-NH<sub>2</sub> większe wartości aktywności zaobserwowano dla maltozy. Uzyskane wydajności immobilizacji były dużo mniejsze w porównaniu na przykład z immobilizacją glukoamylazy w alginianie sodu, gdzie wydajność wynosiła 22% [131]. Na wydajność aktywności po immobilizacji ma wpływ nie tylko zmniejszenie aktywności spowodowane samym procesem immobilizacji, ale

również zmniejszona dostępność enzymu dla substratu, spowodowana zamknięciem enzymu w sieci polimeru, a także wolna dyfuzja substratu w głąb sieci polimerowej spowodowana skurczeniem nośników w temperaturze 50°C, w której prowadzono reakcję enzymatyczną.

Najwięcej białka zaadsorbowało się na nośniku TH8. Obecność grup aminowych na TH8-NH<sub>2</sub> i TG8-NH<sub>2</sub> nie spowodowała zwiększenia adsorpcji białka. Może być to spowodowane blokującym działaniem grup aminowych na oddziaływania hydrofobowe, co w konsekwencji mogło zmniejszyć adsorpcję enzymu. Pomimo tego, że na nośniku TH8-NH<sub>2</sub> związało się najmniej białka, aktywność preparatów była największa. Prawdopodobnie w pozostałych przypadkach zbyt duże stężenie enzymu na nośniku powoduje, że białko adsorbuje się warstwami, co powoduje, że początkowo jedynie zewnętrzna warstwa przejawia aktywność i dopiero po jej denaturacji „ujawniają” się kolejne warstwy (tzw. efekt Zulu) [177].

Najbardziej stabilnym nośnikiem okazał się nośnik TH8-NH<sub>2</sub>. Stabilność zwiększa się ze zwiększaniem stężenia aldehydu glutarowego. Z kolei nośnik TG8-NH<sub>2</sub> nie jest odpowiedni do immobilizacji glukoamylazy. Prawdopodobnie dalsze procesy sieciowania po immobilizacji spowodowały znaczne usztywnienie struktury nośnika i w konsekwencji zmniejszenie dostępności enzymu dla substratu.

#### 4.7.2 „Ssanie” na nośniku THN

Glukoamylazę immobilizowano metodą „ssania” na nośniku będącym kopolimerem N-izopropylakryloamidu i metakrylanu 2-hydroksyetylu usieciowanym dimetakrylanem glikolu trietylenowego, którego zawartość odpowiadała 5,9% molowym grup winylowych. Nośnik ten wybrano w celu zbadania wpływu rodzaju środka sieciującego na aktywność immobilizowanej glukoamylazy. W tabelach 18 i 19 przedstawiono wyniki uzyskane w obecności dwóch substratów: skrobi i maltozy.

**Tabela 18** Aktywność preparatu (kopolimeru *N*-izopropylakryloamidu i metakrylanu 2-hydroksyetylu usieciowanego dimetakrylanem glikolu trietylenowego) w obecności skrobi

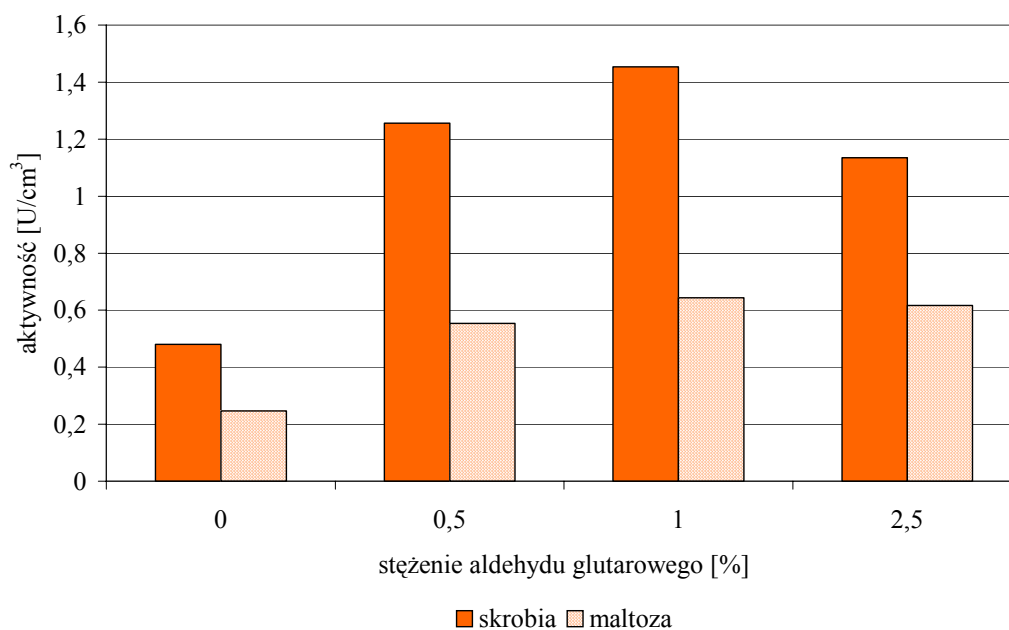
Próbka	Aktywność [U/cm <sup>3</sup> ]	Stabilność [%]
THN –B	0,480	45,4
THN-0,5	1,257	71,9
THN-1,0	1,454	63,0
THN-2,5	1,135	65,5

(B-bufor, 0,5-0,5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1,0% roztwór aldehydu glutarowego, 2,5-2,5% roztwór aldehydu glutarowego)

**Tabela 19** Aktywność preparatu (kopolimeru *N*-izopropylakryloamidu i metakrylanu 2-hydroksyetylu usieciowanego dimetakrylanem glikolu trietylenowego) w obecności maltozy

Próbka	Aktywność [U/cm <sup>3</sup> ]	Stabilność [%]
THN –B	0,247	41,5
THN-0,5	0,554	71,8
THN-1,0	0,643	74,1
THN-2,5	0,617	61,3

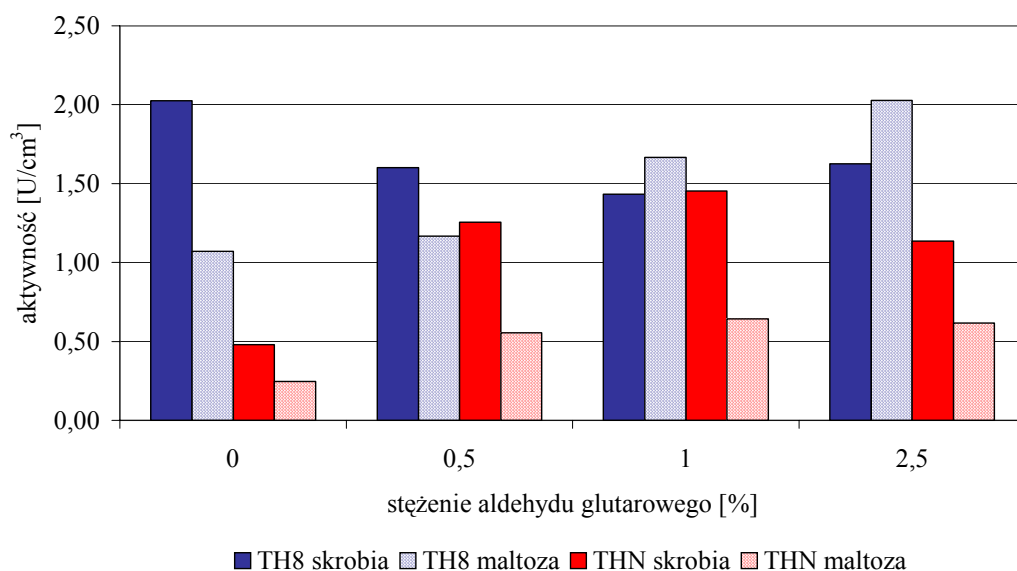
(B-bufor, 0,5-0,5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1,0% roztwór aldehydu glutarowego, 2,5-2,5% roztwór aldehydu glutarowego)



**Rysunek 49** Aktywność glukoamylazy w obecności skrobi i maltozy

Wykres na rysunku 49 przedstawia aktywność glukoamylazy dla uzyskanych preparatów bezpośrednio po immobilizacji. Możemy zaobserwować, że dla nośnika nieusieciowanego aktywność jest znacznie mniejsza w porównaniu z nośnikami usieciowanymi aldehydem glutarowym o różnym stężeniu. Aktywność preparatów sprawdzano w obecności dwóch substratów: wielkocząsteczkowej skrobi i małowcząsteczkowej maltozy. W przypadku maltozy stężenie aldehydu glutarowego nie ma wpływu na aktywność preparatu, natomiast w przypadku skrobi aktywność preparatu jest większa dla mniejszych stężeń czynnika sieciującego. Substrat wielkocząsteczkowy ma większe trudności w dotarciu do enzymu niż substrat małowcząsteczkowy.

Na podstawie wyznaczonej stabilności preparatów (tabela 18 i 19) największy spadek aktywności zaobserwowano dla preparatu nieusieciowanego, zachowuje on około 40% aktywności początkowej. Preparaty usieciowane aldehydem glutarowym zachowują około 80% aktywności początkowej, przy czym najbardziej stabilny okazał się preparat usieciowany 0,5% aldehydem glutarowym, tzn. zaobserwowano najmniejszy spadek aktywności dla obydwu substratów.



**Rysunek 50** Porównanie aktywności nośników usieciowanych różnymi środkami sieciującymi



Na wykresie (rysunek 50) przedstawiono aktywność nośników z immobilizowaną glukoamylazą w obecności skrobi i maltozy. Nośniki są kopolimerami NIPAAm i HEMA usieciowanymi EGDMA (TH8) lub TEGDMA (THN). Można zauważyć, że lepsze wyniki uzyskano dla nośnika usieciowanego dimetakrylanem glikolu etylenowego. Różnice w wartościach aktywności sięgają 80% w przypadku preparatów nieusieciowanych aldehydem glutarowym w obecności obydwu substratów.

#### 4.7.3 „Ssanie” na nośniku T8

Glukoamylazę immobilizowano metodą „ssania” na kopolimerze N-izopropylakryloamidu i dimetakrylanu glikolu etylenowego. Aktywność otrzymanych preparatów oznaczono w obecności 2,5% roztworu skrobi i uzyskano następujące wyniki przedstawione w tabeli 20.

**Tabela 20** Aktywność preparatu z immobilizowanym enzymem

Nośnik	Aktywność [ $U/cm^3$ ]
T8-B	0,143
T8-0,5	0,163
T8-1,0	0,205
T8-2,5	0,210

(B-bufor, 0,5-0,5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1,0% roztwór aldehydu glutarowego, 2,5-2,5% roztwór aldehydu glutarowego)

Nośniki z immobilizowaną glukoamylazą charakteryzują się stosunkowo małą aktywnością w obecności skrobi. Dla nośnika nieusieciowanego aldehydem glutarowym aktywność jest najmniejsza w porównaniu z nośnikami usieciowanymi. Stężenie użytego aldehydu glutarowego wpływa na wartości aktywności preparatów enzymatycznych, najlepsze wyniki uzyskano dla preparatów usieciowanych 1,0 i 2,5% aldehydem. Aktywność preparatu usieciowanego 0,5% aldehydem glutarowym jest zbliżona do wartości uzyskanej dla preparatu nieusieciowanego.

Glukoamylaza immobilizowana na nośniku T8 charakteryzuje się nieco większą aktywnością w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla inwertazy

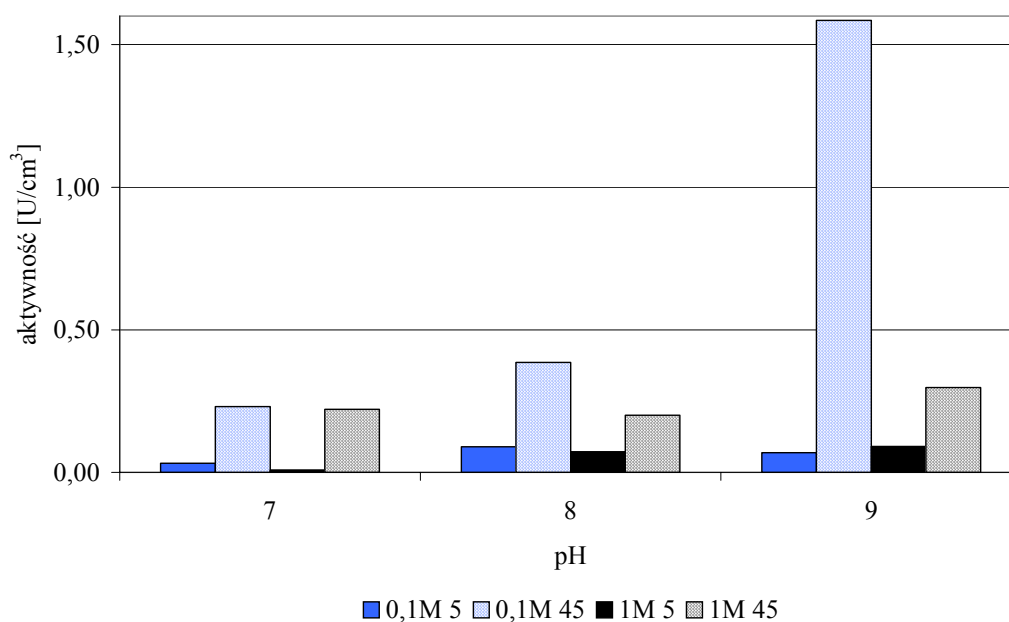
(paragraf 4.8.2). Jednakże wartości te są znacznie mniejsze w porównaniu z wartościami uzyskanymi podczas immobilizacji glukoamylazy na innych termoczulych nośnikach, dlatego też nie wyznaczono stabilności nośnika oraz nie wykorzystano go do dalszych badań.

#### 4.7.4 Immobilizacja kowalencyjna na nośniku TG8 - dobór warunków reakcji

W celu dobrania optymalnych warunków kowalencyjnej immobilizacji glukoamylazy na nośniku TG8 z grupami epoksydowymi (kopolimer N-izopropylakryloamidu z metakrylanem glicydyłu usieciowany dimetakrylanem glikolu etylenowego), proces prowadzono w dwóch temperaturach: poniżej (5°C) i powyżej (45°C) VPTT nośnika oraz w roztworach w zakresie pH 7-9. W tabeli 21 zebrano otrzymane wyniki.

**Tabela 21 Bilans aktywności preparatów z immobilizowaną glukoamylazą w obecności skrobi**

<i>Próbka bufor/pH/temperatura</i>	<i>Aktywność [U/cm<sup>3</sup>]</i>	<i>Aktywność oczekiwana [U/cm<sup>3</sup>]</i>	<i>Wydajność immobilizacji [%]</i>
0,1/7/5	0,031	7113	0
0,1/7/45	0,226	6065	0,004
1/7/5	0,009	7130	0
1/7/45	0,216	6208	0,003
0,1/8/5	0,088	5810	0,002
0,1/8/45	0,376	5933	0,006
1/8/5	0,071	5066	0,001
1/8/45	0,197	8608	0,002
0,1/9/5	0,068	6921	0,001
0,1/9/45	1,555	6949	0,022
1/9/5	0,089	5862	0,002
1/9/45	0,292	-	-



**Rysunek 51** Aktywność preparatów z immobilizowaną glukoamylazą w obecności skrobi

Wykres na rysunku 51 przedstawia aktywność glukoamylazy w obecności skrobi dla preparatów powstałych w trakcie immobilizacji przy różnej sile jonowej, pH oraz w dwóch temperaturach: poniżej i powyżej VPTT, odpowiednio 5 i 45°C.

Możemy zaobserwować, że największy wpływ na aktywność ma temperatura, w której prowadzono proces immobilizacji. W temperaturze poniżej VPTT aktywność ta jest znacznie mniejsza. Gdy nośnik jest rozkurczony, enzym może być zaimobilizowany głównie wewnątrz polimeru. Immobilizacja w temperaturze powyżej VPTT powoduje, że enzym przyłącza się głównie na powierzchni nośnika. Reakcję z substratem prowadzono w temperaturze powyżej VPTT, nośnik był więc skurczony. W tej sytuacji enzym unieruchomiony na powierzchni jest bardziej dostępny niż enzym uwięziony wewnątrz polimeru, co ma wpływ na aktywność preparatu.

Aktywność preparatu uzyskanego na drodze immobilizacji w temperaturze 45°C dla 0,1M buforu zwiększa się wyraźnie ze wzrostem pH podczas immobilizacji. Gdy do immobilizacji używano buforu 1M o pH 7 i 8, aktywność była porównywalna, natomiast gdy używano buforu 1M o pH 9, aktywność była nieznacznie większa. Sugeruje to, że immobilizację glukoamylazy

na TG8 najlepiej prowadzić w temperaturze powyżej VPTT, używając 0,1M buforu o pH 9.0. Jak wspomniano wcześniej immobilizacja w temperaturze powyżej VPTT powoduje, że enzym przyłącza się głównie na powierzchni nośnika, prowadząc reakcję z substratem również w temperaturze powyżej VPTT, uzyskujemy większą aktywność, ponieważ enzym jest bardziej dostępny.

#### **4.7.5 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach TAEMA, TH8-NH<sub>2</sub>, TG8-NH<sub>2</sub>, TH8, TMA i TG8**

Glukoamylazę immobilizowano kowalencyjnie na nośnikach z grupami aminowymi (TAEMA, TH8-NH<sub>2</sub>, TG8-NH<sub>2</sub>), hydroksylowymi (TH8), karboksylowymi (TMA) i epoksydowymi (TG8). Proces prowadzono w różnych warunkach w zależności od rodzaju grup funkcyjnych nośnika, tak jak to opisano w paragrafie 4.6.3.

W tabelach 22 i 23 przedstawiono wyniki uzyskane dla immobilizowanej glukoamylazy. Wydajność immobilizacji białka jest dość mała, z wyjątkiem nośnika TH8-NH<sub>2</sub>, dla którego wydajność immobilizacji wynosi blisko 64%. Wartości wydajności immobilizacji dla aktywności są praktycznie równe zero. Sugeruje to, że enzym stracił swoją aktywność katalityczną podczas immobilizacji. Przykładowo podczas kowalencyjnej immobilizacji glukoamylazy na kopolimerach metakrylanu glicydylu i kwasu metakrylowego usieciowanych diwinylobenzenem wydajność immobilizacji dla aktywności sięgała 78% [139], podczas gdy wydajność immobilizacji na termoczułym kopolimerze z grupami epoksydowymi (TG8) wynosiła zaledwie 18%.

Wartości aktywności preparatów w obecności skrobi są bardzo małe, natomiast w obecności maltozy nośniki są praktycznie nieaktywne. Śladowa aktywność preparatów w obecności skrobi może być spowodowana niedokładnym odmyciem preparatu.

Ze względu na bardzo małe wartości aktywności wszystkich preparatów z immobilizowaną kowalencyjnie glukoamylazą nie wyznaczono stabilności po miesiącu przechowywania.

**Tabela 22 Wyniki uzyskane dla preparatów z immobilizowaną glukoamylazą w obecności skrobi**  
 Aktywność specyficzna glukoamylazy natywnej: 35,3 (pH 5); 35,9 (pH 7); 35,1 (pH8) [U/mg]

Nośnik	Białko związane [mg/cm <sup>3</sup> ]	Aktywność [U/cm <sup>3</sup> ]	Wydajność immobilizacji [%]		Aktywność specyficzna [U/mg]
			Białko	Aktywność	
TAEMA	3,57	0,08	12,7	0,01	0,02
TG8-NH <sub>2</sub>	1,12	0,07	4,0	0,01	0,06
TH8-NH <sub>2</sub>	17,82	0,33	63,6	0,03	0,02
TG8	4,84	0,13	18,6	0,01	0,03
TH8	3,35	0,15	12,9	0,02	0,04
TMA	1,56	0,26	5,7	0,03	0,17

**Tabela 23 Wyniki uzyskane dla preparatów z immobilizowaną glukoamylazą w obecności maltozy**

Aktywność specyficzna glukoamylazy natywnej: 21,7 (pH 5); 22,1 (pH 7); 21,7 (pH 8) [U/mg]

Nośnik	Białko związane [mg/cm <sup>3</sup> ]	Aktywność [U/cm <sup>3</sup> ]	Wydajność immobilizacji [%]		Aktywność specyficzna [U/mg]
			Białko	Aktywność	
TAEMA	3,57	0,03	12,7	0,01	0,01
TG8-NH <sub>2</sub>	1,12	0,10	4,0	0,02	0,09
TH8-NH <sub>2</sub>	17,82	0,08	63,6	0,01	0
TG8	4,84	0,07	18,6	0,01	0,01
TH8	3,35	0,02	12,9	0	0,01
TMA	1,56	0,05	5,7	0,01	0,03

## 4.8 Immobilizacja trypsyny

### 4.8.1 „Ssanie” na nośnikach TH8, TH8-NH<sub>2</sub> i TG8-NH<sub>2</sub>

Trypsynę immobilizowano metodą „ssania” opisaną w paragrafie 4.6.1. W tabelach 24 i 25 przedstawiono uzyskane wyniki.

**Tabela 24 Wyniki uzyskane dla preparatów z immobilizowaną trypsyną w obecności BAPNA**

Aktywność specyficzna trypsyny natywnej dla BAPNA: 107,8 [U/mg]

Nośnik		Białko związane [mg/cm <sup>3</sup> ]	Aktywność [U/cm <sup>3</sup> ]	Wydajność immobilizacji [%]		Aktywność specyficzna [U/mg]	Stabilność [%]
				Białko	Aktywność		
TH8	B	0,342	0,256	49,14	0,586	0,747	100,0
	0,5		1,444		3,314	4,223	74,6
	1		1,777		4,075	5,194	51,1
	2,5		1,377		3,158	4,025	65,6
TH8-NH <sub>2</sub>	B	0,308	0,416	44,25	0,922	1,351	100,0
	0,5		8,422		18,658	27,345	7,1
	1		6,873		15,225	22,314	5,3
	2,5		5,346		11,842	17,356	9,8
TG8-NH <sub>2</sub>	B	0,163	0,032	23,42	0,099	0,194	100,0
	0,5		3,760		11,772	23,068	7,0
	1		3,720		11,647	22,822	4,0
	2,5		5,560		17,408	34,110	2,1

(B-bufor, 0,5-0,5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1,0% roztwór aldehydu glutarowego, 2,5-2,5% roztwór aldehydu glutarowego)

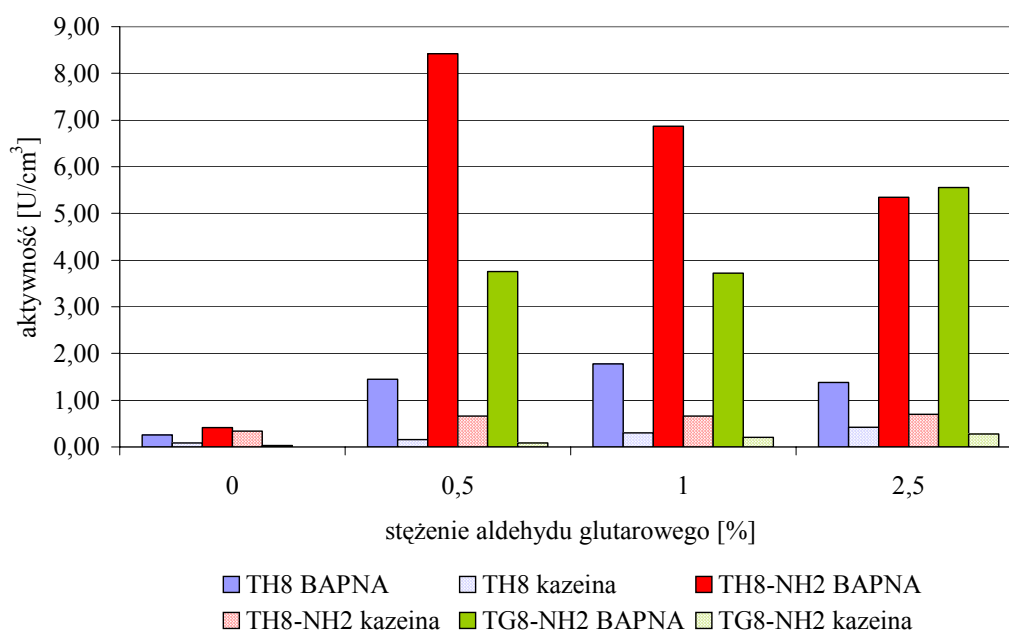
Tabela 25 Wyniki uzyskane dla preparatów z immobilizowaną trypsyną w obecności kazeiny

Aktywność specyficzna trypsyny natywnej dla kazeiny: 105,9 [U/mg]

Nośnik		Białko związane [mg/cm <sup>3</sup> ]	Aktywność [U/cm <sup>3</sup> ]	Wydajność immobilizacji [%]		Aktywność specyficzna [U/mg]
				Białko	Aktywność	
TH8	B	0,342	0,08	49,14	0,217	0,234
	0,5		0,16		0,435	0,468
	1		0,30		0,815	0,877
	2,5		0,42		1,141	1,228
TH8-NH <sub>2</sub>	B	0,308	0,34	44,25	0,702	1,104
	0,5		0,66		1,363	2,143
	1		0,66		1,363	2,143
	2,5		0,70		1,446	2,273
TG8-NH <sub>2</sub>	B	0,163	0,00	23,42	0,00	0,00
	0,5		0,08		0,243	0,491
	1		0,20		0,607	1,227
	2,5		0,28		0,850	1,718

(B-bufor, 0,5-0,5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1,0% roztwór aldehydu glutarowego, 2,5-2,5% roztwór aldehydu glutarowego)

Do oznaczenia aktywności uzyskanych preparatów enzymatycznych użyto dwóch substratów: małowcząsteczkowego BAPNA oraz wielkowcząsteczkowej kazeiny, wyniki przedstawiono na rysunku 52. W przypadku BAPNA jako substratu najlepszym nośnikiem okazał się TH8-NH<sub>2</sub>. Zaobserwowano ponadto wyraźną zależność aktywności od stężenia aldehydu glutarowego użytego do usieciowania nośników. Aktywność dla nośnika usieciowanego 0,5% aldehydem glutarowym była znacznie większa niż aktywność nośnika nieusieciowanego. Zwiększenie stężenia aldehydu glutarowego spowodowało zmniejszenie aktywności preparatów. Jest to prawdopodobnie spowodowane sieciowaniem cząsteczki enzymu powodującym jego wielopunktowe związanie z nośnikiem i w konsekwencji usztywnienie jego struktury.



Rysunek 52 Aktywność trypsyny w obecności BAPNA i kazeiny

Największe wartości wydajności immobilizacji obliczone na podstawie aktywności preparatów można zaobserwować dla TH8-NH<sub>2</sub>. Wpływ aldehydu glutarowego jest taki sam jak w przypadku aktywności nośników po immobilizacji. Porównując otrzymane wartości dla trypsyny z zerowymi wydajnościami otrzymanymi dla inwertazy (tabela 13) oraz z wydajnościami w zakresie 0,4-2,4 % (skrobia) i 0,3-4,6 % (maltoza) dla glukoamylazy (tabela 16 i 17) stwierdzono, że metoda „ssania” najlepiej sprawdza się w przypadku trypsyny. Trypsyna jest enzymem o znacznie mniejszej masie cząsteczkowej (23 kDa) [180] w porównaniu z inwertazą (75 kDa) [181] czy glukoamylazą (68 kDa) [182], co może mieć duże znaczenie podczas procesu immobilizacji.

Najbardziej stabilnym nośnikiem okazał się TH8. Z kolei nośnik TG8-NH<sub>2</sub>, zawierający najwięcej grup aminowych, nie jest odpowiedni do immobilizacji trypsyny. Prawdopodobnie dalsze procesy sieciowania po immobilizacji spowodowały znaczne usztywnienie struktury nośnika i w konsekwencji zmniejszenie dostępności enzymu dla substratu.

W obecności kazeiny, substratu o dużej masie cząsteczkowej, wszystkie nośniki wykazały się bardzo małą aktywnością, z tego powodu nie oznaczono w tym przypadku stabilności nośników.



Ilość związanego białka była największa dla nośnika TH8. Obecność grup aminowych na TH8-NH<sub>2</sub> i TG8-NH<sub>2</sub> nie spowodowała zwiększenia adsorpcji białka. Najmniej białka zaadsorbowało się na TG8-NH<sub>2</sub>, aktywność preparatu była praktycznie równa zero. Nieco lepsze wyniki uzyskano dla TH8-NH<sub>2</sub>, na którym związało się dwa razy więcej białka. TG8-NH<sub>2</sub> charakteryzuje się znacznie większą zawartością grup aminowych niż TH8-NH<sub>2</sub>. Grupy aminowe mogą osłabiać oddziaływania hydrofobowe podczas immobilizacji, co z kolei może zmniejszać adsorpcję białka na nośniku.

#### **4.8.2 Immobilizacja kowalencyjna na nośnikach: TAEMA, TH8-NH<sub>2</sub>, TG8-NH<sub>2</sub>, TH8, TMA i TG8**

Trypsynę immobilizowano kowalencyjnie na nośnikach z grupami aminowymi (TAEMA, TH8-NH<sub>2</sub>, TG8-NH<sub>2</sub>), hydroksylowymi (TH8), karboksylowymi (TMA) i epoksydowymi (TG8). Proces prowadzono w różnych warunkach w zależności od rodzaju grup funkcyjnych nośnika, jak to opisano w paragrafie 4.6.3. W tabelach 26 i 27 zebrano uzyskane wyniki.

**Tabela 26 Wyniki uzyskane dla preparatów z immobilizowaną trypsyną w obecności BAPNA**

Aktywność specyficzna trypsyny natywnej: 19,29 (pH 5); 18,86 (pH 7); 16,36 (pH 8) [U/mg]

Nośnik	Białko związane [mg/cm <sup>3</sup> ]	Aktywność [U/cm <sup>3</sup> ]	Wydajność immobilizacji [%]		Aktywność specyficzna [U/mg]	Stabilność [%]
			Białko	Aktywność		
TAEMA	1,27	2,45	29,6	15,0	1,93	90,0
TG8-NH <sub>2</sub>	4,00	6,37	93,1	4,2	1,59	71,4
TH8-NH <sub>2</sub>	4,04	26,21	94,0	16,9	6,49	77,4
TG8	3,69	1,96	93,0	1,7	0,53	91,1
TH8	0,97	37,91	24,5	82,2	39,08	99,3
TMA	4,22	15,44	99,3	9,7	3,66	88,9

**Tabela 27 Wyniki uzyskane dla preparatów z immobilizowaną trypsyną w obecności kazeiny**

Aktywność specyficzna trypsyny natywnej: 18,94 (pH 5); 18,52 (pH 7); 16,06 (pH 8) [U/mg]

Nośnik	Białko związane [mg/cm <sup>3</sup> ]	Aktywność [U/cm <sup>3</sup> ]	Wydajność immobilizacji [%]		Aktywność specyficzna [U/mg]	Stabilność [%]
			Białko	Aktywność		
TAEMA	1,27	0,94	29,6	5,9	0,74	56,4
TG8-NH <sub>2</sub>	4,00	1,18	93,1	0,8	0,30	100,0
TH8-NH <sub>2</sub>	4,04	5,07	94,0	3,3	1,26	-
TG8	3,69	0,82	93,0	0,7	0,22	74,4
TH8	0,97	0,94	24,5	2,1	0,97	75,0
TMA	4,22	1,30	99,3	0,8	0,31	57,7

W tabelach 26 i 27 przedstawiono wyniki uzyskane dla immobilizowanej trypsyny. Wydajność immobilizacji dla białka dla nośników TMA, TH8-NH<sub>2</sub>, TG8-NH<sub>2</sub> i TG8 jest równa prawie 100% ilości związanego białka. Wartości wydajności immobilizacji dla aktywności są również bardzo duże. Najlepsze

wyniki uzyskano dla nośnika TH8 w obecności BAPNA jako substratu – ponad 80% aktywnego białka w związanym, chociaż w przypadku tego nośnika wydajność immobilizacji dla białka była najmniejsza. Sugeruje to, że nośnik z grupami hydroksylowymi jest odpowiedni do immobilizacji kowalencyjnej trypsyny. Wyniki uzyskane dla nośników z grupami aminowymi (TAEMA i TH8-NH<sub>2</sub>) oraz nośnika z grupami karboksylowymi (TMA) są również bardzo dobre, zarówno w obecności BAPNA, jak i kazeiny jako substratu. Najmniejsze wartości wydajności immobilizacji dla aktywności uzyskano dla nośników TG8 i TG8-NH<sub>2</sub>, przy czym wartości wydajności immobilizacji dla białka były w tym przypadku największe. Przykładowo trypsyna immobilizowana na Eupergicie zachowuje 90% aktywności w obecności kazeiny [183].

Wartości aktywności nośników w obecności substratu są większe w przypadku BAPNA, w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla kazeiny. BAPNA jest substratem małocząsteczkowym, kazeina – wielkocząsteczkowym. Ponadto hydroliza BAPNA była prowadzona w temperaturze pokojowej, gdy nośniki były rozkurczone i dostęp substratu do centrum aktywnego enzymu był ułatwiony. Hydrolizę kazeiny prowadzono w temperaturze 37°C, nadal poniżej VPTT nośników, ale powodującej już w pewnym stopniu skurczenie nośników (rysunek 32). Wielkocząsteczkowy substrat mógł zatem mieć utrudniony dostęp do enzymu.

Porównując wartości aktywności specyficznej immobilizowanej i natywnej trypsyny stwierdzono, że enzym unieruchomiony na nośniku z grupami hydroksylowymi charakteryzował się znacznie większą aktywnością w obecności BAPNA niż enzym natywny. W przypadku pozostałych nośników aktywność immobilizowanej trypsyny w obecności BAPNA była mniejsza w porównaniu z aktywnością białka natywnego i zmniejszała się w szeregu: TH8-NH<sub>2</sub> (34% aktywności natywnego enzymu), TMA (19%), TAEMA i TG8-NH<sub>2</sub> (10%) oraz TG8 (3%). Aktywność specyficzna immobilizowanej trypsyny w obecności kazeiny była znacznie mniejsza w porównaniu z natywnym enzymem. Najlepszy nośnik – TH8-NH<sub>2</sub>, zachowywał zaledwie 18% aktywności natywnego białka. W przypadku pozostałych nośników aktywność specyficzna immobilizowanej trypsyny stanowiła 2-6% aktywności natywnego enzymu.

Stabilność preparatów oznaczona po miesiącu przechowywania jest większa w obecności BAPNA. Nośnik TH8 zachowuje praktycznie 100%

aktywności, nośniki TAEMA, TG8 oraz TMA – 90%, natomiast TH8-NH<sub>2</sub> i TG8-NH<sub>2</sub> odpowiednio 77 i 71% aktywności początkowej. W obecności kazeiny 100% aktywności zachowuje nośnik TG8-NH<sub>2</sub>, pozostałe preparaty zachowują aktywność w zakresie 60-75%. Ze względu na straty podczas oczyszczania nie oznaczono stabilności nośnika TH8-NH<sub>2</sub>.

## 4.9 Immobilizacja lakkazy

### 4.9.1 „Ssanie” na TH8 i T8

Lakkazę immobilizowano metodą „ssania” na kopolimerze N-izopropylakryloamidu i metakrylanu 2-hydroksyetylu usieciowanym dimetakrylanem glikolu etylenowego (TH8) oraz na kopolimerze N-izopropylakryloamidu i dimetakrylanu glikolu etylenowego (T8). Aktywność otrzymanych preparatów oznaczono w obecności gwajakolu i syringaldazyny. Uzyskano następujące wyniki przedstawione w tabelach 28 i 29.

**Tabela 28 Aktywność preparatu T8 w obecności syringaldazyny i gwajakolu**

Nośnik	Syringaldazyna	Gwajakol
	Aktywność [ $U/cm^3$ ]	Aktywność [ $U/cm^3$ ]
T8-B	0,007	0,008
T8-0,5	0,033	0
T8-1	0	0
T8-2,5	0	0

(B-bufor, 0,5-0,5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1,0% roztwór aldehydu glutarowego, 2,5-2,5% roztwór aldehydu glutarowego)

**Tabela 29 Aktywność preparatu TH8 w obecności syringaldazyny i gwajakolu**

Nośnik	Syringaldazyna	Gwajakol
	Aktywność [ $U/cm^3$ ]	Aktywność [ $U/cm^3$ ]
TH-B	0,012	0
TH-0,5	0,011	0
TH-1	0	0
TH-2,5	0,013	0

(B-bufor, 0,5-0,5% roztwór aldehydu glutarowego, 1-1,0% roztwór aldehydu glutarowego, 2,5-2,5% roztwór aldehydu glutarowego)

Analizując wyniki przedstawione w tabelach 28 i 29 można zaobserwować, że lakkaza immobilizowana na termoczulych nośnikach T8 i TH8 jest praktycznie nieaktywna, zarówno w stosunku do syringaldazyny, jak i gwajakolu.

## 5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Od lat 90 ubiegłego wieku termoczule polimery są przedmiotem coraz większego zainteresowania, głównie ze względu na możliwość ich zastosowania w medycynie jako nośników do kontrolowanego uwalniania substancji biologicznie czynnych. Do najczęściej badanych termoczulych polimerów należą hydrożele usieciowane głównie N,N'-metylenobisakryloamidem. Wykorzystanie wrażliwości na temperaturę w procesach sorpcji jonów metali jest stosunkowo nowym zagadnieniem w chemii polimerów. Jak to przedstawiono w przeglądzie literatury, zaledwie kilka prac tyczy termoczulych usieciowanych jonitów, przy czym jonity z grupami fosforanowymi zostały opisane w zaledwie dwóch publikacjach. Tymczasem właśnie reszty kwasów fosforowego i fosfonowego ( $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  i  $-\text{PO}(\text{OH})_2$ ) wydają się mieć, jako kwasy wielozasadowe, posiadające dodatkowo zdolność koordynowania wielu jonów za pomocą tlenu fosforylowego, najkorzystniejsze właściwości do wykorzystania w polimerach skokowo zmieniających objętość ze zmianą temperatury. Te właściwości to zachowywanie zdolności do wymiany jonowej w roztworach o umiarkowanej kwasowości i duża selektywność w stosunku do jonów wielowartościowych, w tym lantanowców i aktynowców. Grupa fosforanowa, jak już wspomniano powyżej, może tworzyć silniejsze kompleksy w roztworach kwasowych niż grupy karboksylowe. Wynika to z obecności trzeciego donorowego atomu tlenu oraz z polarnej natury wiązania  $\text{P}=\text{O}$ , dzięki któremu możliwa jest koordynacja metalu.

Istotną cechą termoczulęgo jonitu jest zmniejszona, na skutek oddziaływań hydrofobowych, chłonność wody i objętość polimeru w temperaturze powyżej VPTT. Pozwala to na jednoczesne oddziaływanie (wymianę jonową i/lub koordynację) pomiędzy sąsiednimi grupami fosforanowymi a wielowartościowymi jonami, znajdującymi się w roztworze zewnętrznym. Poniżej tej temperatury oddziaływania hydrofobowe są słabsze i umożliwiają znaczne pęcznienie materiału w roztworach wodnych. Pęcznienie to powoduje oddalenie się grup jonowymiennych/koordynujących od siebie i uniemożliwienie, ze względów sterycznych, wymiany jonowej i tworzenia kompleksów z jonami wielowartościowymi.

Immobilizacja enzymów w termoczulych żelach powoduje, że zmiany konformacji polimeru wywołane zmianami temperatury otoczenia mogą mieć wpływ na aktywność enzymu oraz na dostępność enzymu dla substratu. W przypadku nośników do immobilizacji enzymów istotne są zmiany objętości porów otrzymanych polimerów spowodowane zmianą temperatury. Przewiduje się, że proces ten może mieć wpływ na specyficzność substratową preparatu, tzn. w temperaturze powyżej VPTT, gdy nośnik jest skurczony i pory są małe, preferowany będzie substrat małocząsteczkowy, substrat wielkocząsteczkowy może mieć trudności w dotarciu do centrum aktywnego enzymu immobilizowanego na nośniku. W temperaturze poniżej VPTT, nośnik jest rozkurczony i pory są duże, centrum aktywne enzymu będzie zatem dostępne dla substratu wielkocząsteczkowego. W literaturze opisano enzymy szczepione bezpośrednio na termoczulych żelach lub poprzez ligandy podwodujące oddalenie cząsteczki białka od termoczulącej powierzchni, a także immobilizowane w trakcie procesu polimeryzacji. Nie znaleziono publikacji dotyczących bezpośredniego wykorzystania termoczulych właściwości nośników w procesie immobilizacji białka.

Celem pracy doktorskiej było otrzymanie termoczulych polimerów zawierających grupy funkcyjne i zastosowanie ich jako jonitów chelatujących do sorpcji metali oraz jako nośników do immobilizacji enzymów.

Opracowano metodę syntezy termoczulych kopolimerów usieciowanych z funkcjonalnych monomerów w dwufazowym układzie reakcyjnym, otrzymując produkty w formie perełek.

Określono właściwości sorpcyjne otrzymanych termoczulych jonitów w stosunku do jonów metali o różnej wartościowości – europu(III), miedzi(II) i potasu(I). Zbadano wpływ temperatury, pH, rodzaju i ilości środka sieciującego na sorpcję wybranych jonów metali. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że termodynamicznie faworyzowana jest sorpcja jonów metali o wartościowości większej niż 2. Ponadto więcej trójwartościowych jonów europu sorbowało się w temperaturze powyżej VPTT jonitów. Przeprowadzono również próby rozdziału lantanowców. Mieszaninę ceru(III), europu(III), terbu(III), tulu(III), kobaltu(II), baru(II) i cezu(I) sorbowano na termoczulym jonicie metodą ciągłą w zakresie temperatur 10-70°C. Uzyskane wyniki sugerują, że możliwy jest



---

rozdział mieszaniny wyżej wymienionych pierwiastków na termoczulym jonicie z grupami fosforanowymi sterowany zmianami temperatury.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej opracowano również nową metodę immobilizacji enzymów wykorzystującą bezpośrednio wrażliwość polimeru na temperaturę i polegającą na zaadsorbowaniu cząsteczek enzymu na powierzchni nośnika, a następnie uwięzieniu ich wewnątrz sieci polimerowej. Siłą napędową są zmiany charakteru powierzchni usieciowanego nośnika z hydrofobowej na hydrofilową (podczas obniżania temperatury), co w konsekwencji prowadzi do gwałtownego zwiększenia objętości nośnika i „zassania” do wewnątrz zaadsorbowanych na powierzchni cząsteczek białka. Metodą tą immobilizowano glukoamylazę, invertazę, trypsynę i lakkazę, przy czym najlepsze rezultaty uzyskano podczas immobilizacji trypsyny. Lakkaza immobilizowana na termoczulych nośnikach traci właściwości katalityczne. Aktywność preparatów z immobilizowaną glukoamylazą i trypsyną zbadano w obecności wielko- i małowcząsteczkowego substratu. Preparaty usieciowane aldehydem glutarowym o stężeniu większym od 1,0% wykazywały większą aktywność w obecności małowcząsteczkowych substratów, które ze względów sterycznych miały ułatwiony dostęp do centrum aktywnego enzymu.

Na podstawie zaprezentowanych wyników badań nad syntezą i wybranymi właściwościami termoczulych polimerów usieciowanych można wysunąć następujące wnioski:

1. Możliwe jest otrzymanie termoczulych usieciowanych polimerów będących kopolimerami N-izopropylakryloamidu z monomerami funkcjonalnymi metodą polimeryzacji suspensyjnej.
2. Jonity z grupami fosforanowymi wykazują największe powinowactwo do trójwartościowych jonów europu, przy czym wielkość sorpcji zależy od temperatury procesu i rodzaju środka sieciującego.
3. Sorpcja Cu(II) i K(I) nie zależy ani od temperatury, ani od rodzaju użytego środka sieciującego, w związku z tym na jonitach termoczulych możliwy jest rozdział metali o wartościowości większej niż 2.

4. Immobilizacja enzymów metodą „ssania” sprawdza się w przypadku trypsyny, dla której uzyskano najlepszą wydajność. Termoczule nośniki nie powinny być stosowane do immobilizacji enzymów o większych niż trypsyna masach cząsteczkowych.
5. Największą wydajność kowalencyjnej immobilizacji na termoczulych nośnikach uzyskano dla trypsyny. Najlepszym nośnikiem okazał się termoczulý kopolimer NIPAAm i HEMA usieciowany EGDMA.
6. Aktywność glukoamylazy i trypsyny immobilizowanych metodą „ssania” i kowalencyjnie na termoczulych nośnikach zależy od wielkości substratu, jest to potencjalna możliwość sterowania aktywnością tych preparatów za pomocą temperatury.

---

## 6. LITERATURA

1. "Syntheses and separations using functional polymers", pod red. D.C. Sherrington and P. Hodge, Wiley, New York, 1988
  2. Okay O., Prog. Polym. Sci., 25, 711-779, 2000
  3. „Chemia polimerów”, tom 3, Praca zbiorowa pod red. Z. Florjańczyka i S. Penczka, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1998
  4. „Chemia polimerów”, tom 1, Praca zbiorowa pod red. Z. Florjańczyka i S. Penczka, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2001
  5. Sherrington D.C., Chem. Commun., 2275-2286, 1998
  6. Vivaldo-Lima E., Wood P.E., Hamielec A.E., Ind. Eng. Chem. Res., 36, 939-965, 1997
  7. Macintyre F.S., Sherrington D.C., Macromolecules, 37, 7628-7636, 2004
  8. de Santa Maria L.C., Aguiar M.R.M.P., Guimaraes P.I.C., Amorim M.C.V., Costa M.A.S., Almeida R.S.M., Aguiar A.P., Oliveira A.J.B., Eur. Polym. J., 39, 291-296, 2003
  9. de Santa Maria L.C., Aguiar M.R.M.P., D'Elia P., Ferreira L.O., Wang S.H., Mater. Lett., 61, 160-164, 2007
  10. Durie S., Jerabek K., Mason C., Sherrington D.C., Macromolecules, 35, 9665-9672, 2002
  11. Roice M., Pillai V.N.R., J. Polym. Sci., Part A, 43, 4382-4392, 2005
  12. van Berkel P.M., Sherrington D.C., Polymer, 37, 1431-1435, 1996
  13. Kita R., Svec F., Frechet J.M.J., J. Comb. Chem., 3, 564-571, 2001
  14. Lewandowski K., Svec F., Frechet J.M.J., Chem. Mater., 10, 385-391, 1998
  15. Zhang L., Cheng G., Fu C., React. Funct. Polym., 56, 167-173, 2003
  16. Lai J.P., Lu X.Y., Lu C.Y., Ju H.F., He X.W., Anal. Chim. Acta, 442, 105-111, 2001
  17. Dowding P.J., Vincent B., Williams E., J. Colloid Interface Sci., 221, 268-272, 2000
  18. Ni C., Wang Z., Zhu X.X., J. Appl. Polym. Sci., 91, 1792-1797, 2004
-

19. Müller-Schulte D., Schmitz-Rode T., *J. Magnetism Magnet. Mat.*, 302, 267-271, 2006
20. Bones J., Thomas K., Nesterenko P.N., Paull B., *Talanta*, 70, 1117-1128, 2006
21. Ou J., Hu L., Hu L., Li X., Zou H., *Talanta*, 69, 1001-1006, 2006
22. Kurniawan T.A., Chan G.Y.S., Lo W.H., Babel S., *Chem. Eng. J.*, 118, 83-98, 2006
23. "Handbook of separation process technology", pod red. R.W. Rousseau, Georgia Institute of Technology, A Wiley-Interscience Publication, 1987
24. An B., Steinwinder T.R., Zhao D., *Water Research*, 39, 4993-5004, 2005
25. Cartier S., Tatoud L., Theoleyre M.A., Decloux M., *J. Food Eng.*, 32, 155-166, 1997
26. Lasanta C., Caro I., Perez L., *Chem. Eng. Sci.*, 60, 3477-3486, 2005
27. Horwitz E.P., Chiarizia R., Diamond H., Gatrone R.C., Alexandratos S.D., Trochimczuk A.W., Crick D.W., *Solv. Extr. Ion Exch.*, 11, 943-966, 1993
28. Chiarizia R., Horwitz E.P., Gatrone R.C., Alexandratos S.D., Trochimczuk A.W., Crick D.W., *Solv. Extr. Ion Exch.*, 11, 967-985, 1993
29. Alexandratos S.D., Trochimczuk A.W., Crick D.W., Horwitz E.P., Gatrone R.C., Chiarizia R., *Macromolecules*, 29, 1021-1026, 1996
30. Chiarizia R., Horwitz E.P., Alexandratos S.D., Gula M.J., *Sep. Sci. Technol.*, 32(1-4), 1-35, 1997
31. Nash K.L., *J. Alloys Comp.*, 249, 33-40, 1997
32. Trochimczuk A.W., *Eur. Polym. J.*, 34, 1047-1051, 1998
33. Alexandratos S.D., Shelley C.A., Horwitz E.P., Chiarizia R., *Solv. Extr. Ion Exch.*, 16, 951-966, 1998
34. Trochimczuk A.W., *Eur. Polym. J.*, 35, 1457-1464, 1999
35. Alexandratos S.D., Natesan S., *Eur. Polym. J.*, 35, 431-436, 1999
36. Nonaka T., Hanada Y., Watanabe T., Ogata T., Kurihara S., *J. Appl. Polym. Sci.*, 92, 116-125, 2004
37. Nonaka T., Hua L., Ogata T., Kurihara S., *J. Appl. Polym. Sci.*, 87, 386-393, 2003
38. Nonaka T., Li H., Makinose K., Ogata T., Kurihara S., *J. Appl. Polym. Sci.*, 90, 1139-1147, 2003

- 
39. Garg B.S., Sharma R.K., Bhojak N., Mittal S., *Microchem. J.*, 61, 94-114, 1999
  40. Jones P., Nesterenko P.N., *J. Chromatogr. A*, 789, 413-435, 1997
  41. Kralik M., Biffis A., *J. Mol. Catal. A*, 177, 113-138, 2001
  42. Wilchek M., Miron T., *React. Funct. Polym.*, 41, 263-268, 1999
  43. Kawaguchi H., *Prog. Polym. Sci.*, 25, 1171-1210, 2000
  44. Hoffman A.S., *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 43, 3-12, 2002
  45. Pelton R.H., Chibante P., *Colloids Surf.*, 20, 247-256, 1986
  46. Roy I., Gupta M.N., *Chem. Biol.*, 10, 1161-1171, 2003
  47. Galaev I.Y., Mattiasson B., *Tibtech*, 17, 335-340, 1999
  48. Jeong B., Gutowska A., *Trends in Biotech.*, 20, 305-311, 2002
  49. Gil E.S., Hudson S.M., *Prog. Polym. Sci.*, 29, 1173-1222, 2004
  50. Schild H.G., *Prog. Polym. Sci.*, 17, 163-249, 1992
  51. Qiu Y., Park K., *Adv. Drug. Del. Rev.*, 53, 321-339, 2001
  52. Aoyagi T., Ebara M., Sakai K., Sakurai Y., Okano T., *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 1, 101-110, 2000
  53. Gan L.H., Gan Y.Y., Deen G.R., *Macromolecules*, 33, 7893-7897, 2000
  54. Gan L.H., Deen G.R., Loh X.J., Gan Y.Y., *Polymer*, 42, 65-69, 2001
  55. Suwa K., Yamamoto K., Akashi M., Takano K., Tanaka N., Kunugi S., *Colloid Polym. Sci.*, 276, 529-533, 1998
  56. Maeda Y., *Langmuir*, 17, 1737-1742, 2001
  57. Aoki T., Muramatsu M., Torii T., Sanui K., Ogata N., *Macromolecules*, 34, 3118-3119, 2001
  58. Bromberg L.E., Ron E.S., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 31, 197-221, 1998
  59. Malmsten M., Lindman B., *Macromolecules*, 25, 5446-5450, 1992
  60. Kuijpers A.J., Engbers G.H.M., Feijen J., De Smedt S.C., Meyvis T.K.L., Demeester J., Krijgsveldt J., Zaat S.A.J., Dankert J., *Macromolecules*, 32, 3325-3333, 1999
  61. Ramzi M., Rochas C., Guenet J., *Macromolecules*, 31, 6106-6111, 1998
  62. Sprecht E.H., Newman A., Neher H.T., US Pat. 2 773 063, 1956, assigned to Rohm & Haas
  63. CIBA Ltd., British Pat. 746 747, 1956
  64. Sprecht E.H., Newman A., Neher H.T., British Pat. 772 196, 1956, assigned to Rohm & Haas

- 
65. Heskins M., Guillet J.E., *J. Macromol. Sci-Chem.*, A2, 1441-1455, 1968
  66. Dhara D., Chatterji P.R., *J. M. S. - Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C40, 51-68, 2000
  67. Hirokawa Y., Jinnai H., Nishikawa Y., Okamoto T., Hashimoto T., *Macromolecules*, 32, 7093-7099, 1999
  68. Ganapathy S., Rajamohanan P.R., Badiger M.V., Mandhare A.B., Mashelkar R.A., *Polymer*, 41, 4543-4547, 2000
  69. Sun P., Li B., Wang Y., Ma J., Ding D., He B., *Eur. Polym. J.*, 39, 1045-1050, 2003
  70. Pelton R., *Adv. Colloid Interface Sci.*, 85, 1-33, 2000
  71. Diez-Pena E., Quijada-Garrido I., Barrales-Rienda J.M., *Polymer Bull.*, 48, 83-91, 2002
  72. Xue W., Champ S., Huglin M.B., Jones T.G.J., *Eur. Polym. J.*, 40, 703-712, 2004
  73. Ni C., Zhu X.X., *Eur. Polym. J.*, 40, 1075-1081, 2004
  74. Cao Z., Liu W., Gao P., Yao K., Li H., Wang G., *Polymer*, 46, 5268-5277, 2005
  75. Zhang J., Pelton R., *Colloids Surf. A*, 156, 111- 122, 1999
  76. Makhaeva E.E., Tenhu H., Khokhlov A.R., *Macromolecules*, 35, 1870-1876, 2002
  77. Park T.G., Hoffman A.S., *Macromolecules*, 26, 5045-5048, 1993
  78. Eeckman F., Amighi K., Moës A.J., *Int. J. Pharm.*, 222, 259-270, 2001
  79. Dinarvand R., D'Emanuele A., *J. Control. Release*, 36, 221-227, 1995
  80. Park T.G., *Biomaterials*, 20, 517-521, 1999
  81. Kost J., Langer R., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46, 125-148, 2001
  82. Lin C.L., Chiu W.Y., Lee C.F., *J. Colloid Interface Sci.*, 290, 397-405, 2005
  83. Makino K., Hiyoshi J., Ohshima H., *Colloids Surf. B*, 20, 341-346, 2001
  84. Huang G., Gao J., Hu Z., John J.V., Ponder B.C., Moro D., *J. Control. Release*, 94, 303-311, 2004
  85. Yan Q., Hoffman A.S., *Polymer*, 36, 887-889, 1995
  86. Brazel C.S., Peppas N.A., *J. Control. Release*, 39, 57-64, 1996
  87. Eeckman F., Moës A.J., Amighi K., *Int. J. Pharm.*, 273, 109-119, 2004

- 
88. Chilkoti A., Dreher M.R., Meyer D.E., Raucher D., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 613-630, 2002
  89. Okahata Y., Noguchi H., Seki T., *Macromolecules*, 19, 493-494, 1986
  90. Jeong B., Kim S.W., Bae Y.H., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 37-51, 2002
  91. Uludag H., Norrie B., Kousinioris N., Gao T., *Biotech. Bioeng.*, 73, 510-521, 2001
  92. Wu J.Y., Liu S.Q., Heng P.W.S., Yang Y.Y., *J. Control. Release*, 102, 361-372, 2005
  93. Sassi A.P., Shaw A.J., Han S.M., Blanch H.W., Prausnitz J.M., *Polymer*, 37, 2151-2164, 1996
  94. Kanazawa H., Matsushima Y., Okano T., *Adv. Chromatogr.*, 41, 311-336, 2001
  95. Sakamoto C., Okada Y., Kanazawa H., Ayano E., Nishimura T., Ando M., Kikuchi A., Okano T., *J. Chromatogr. A*, 1030, 247-253, 2004
  96. Ayano E., Nambu K., Sakamoto C., Kanazawa H., Kikuchi A., Okano T., *J. Chromatogr. A*, 1119, 58-65, 2006
  97. Saitoh T., Satoh F., Hiraide M., *Talanta* 61, 811-817, 2003
  98. Alvarez-Lorenzo C., Guney O., Oya T., Sakai Y., Kobayashi M., Enoki T., Takeoka Y., Ishibashi T., Kuroda K., Tanaka K., Wang G.Q., Grosberg A.Y., Masamune S., Tanaka T., *J. Chem. Phys.*, 114, 2812-2816, 2001
  99. Alvarez-Lorenzo C., Hiratani H., Tanaka K., Stancil K., Grosberg A.Y., Tanaka T., *Langmuir*, 17, 3616-3622, 2001
  100. Watanabe T., Ito K., Alvarez-Lorenzo C., Grosberg A.Y., Tanaka T., *J. Chem. Phys.*, 115, 1596-1600, 2001
  101. Hiratani H., Alvarez-Lorenzo C., Chuang J., Guney O., Grosberg A.Y., Tanaka T., *Langmuir*, 17, 4431-4436, 2001
  102. Takeshita K., Nakano Y., *Solvent Extr. Ion Exch.*, 18, 375-386, 2000
  103. Lehto J., Vaaramaa K., Vesterinen E., Tenhu H., *J. Appl. Polym. Sci.*, 68, 355-362, 1998
  104. Kuckling D., Pareek P., *J. Polym. Sci., Part A*, 41, 1594-1602, 2003
  105. Watanabe T., Utsunomiya M., Kurihara S., Nonaka T., *J. Polym. Sci., Part A*, 39, 1505-1514, 2001
  106. Tokuyama H., Kanazawa R., Sakohara S., *Sep. Purif. Technol.*, 44, 152-159, 2005

- 
107. Tokuyama H., Yanagoura K., Sakohara S., *Sep. Purif. Technol.*, 50, 8-14, 2006
  108. Brzyska W., „Lantanowce i aktynowce”, WNT, Warszawa, 1996
  109. Lee J.D., „Związła chemia nieorganiczna”, PWN, Warszawa, 1997
  110. Shaw M.J., Nesterenko P.N., Dicinoski G.W., Haddad P.R., *Austr. J. Chem.*, 56, 201-206, 2003
  111. Siva Kesava Raju C., Subramanian M.S., *Talanta*, 67, 81-89, 2005
  112. Nishihama S., Sakaguchi N., Hirai T., Komasaawa I., *Hydrometallurgy*, 64, 35-42, 2002
  113. Ogata T., Nagayoshi K., Nagasako T., Kurihara S., Nonaka T., *React. Funct. Polym.*, 66, 625-633, 2006
  114. Draye M., Czerwinski K.R., Favre-Reguillon A., Foos J., Guy A., Lemaire M., *Sep. Sci. Technol.*, 35, 1117-1132, 2000
  115. Araki K., Yoshida M., Uezu K., Goto M., Furusaki S., *J. Chem. Eng. Jpn.*, 33, 665-668, 2000
  116. Bullock C., *Sci. Prog.*, 78, 119-134, 1995
  117. Hartmeier W., „Immobilized biocatalyst. An introduction.”, Springer – Verlag, 1988
  118. „Comprehensive Biotechnology. The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine”, Vol. 2, 191-201, pod red. C.L. Cooney, A.E. Humphrey, Pergamon Press, 1985
  119. Berezin I.W., Kliaczko N.L., Lewaszow A.W., Martinek K., Mozajew W.W., Chmielnickij I., „Immobilizowane enzymy”, tom VII, UAM, Poznań, 1992
  120. Tischer W., Wedekind F., *Topics in Curr. Chem.*, 200, 95-126, 1999
  121. Chmiel A., „Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne.”, PWN, Warszawa, 1998
  122. Cao L., *Current Opinion Chem. Biol.*, 9, 217-226, 2005
  123. Nithianandam V.S., Srinivasan S.V., Joseph K.T., Santappa M., *Biotech. Bioeng.*, 23, 2273-2282, 1981
  124. Oh J.T., Kim J.H., *Enzyme Microb. Technol.*, 27, 356-361, 2000
  125. Rucka M., Winnicki T., Żuk J.S., *Post. Biochem.*, 33, 93-106, 1987
  126. Rucka M., Winnicki T., Żuk J.S., *Post. Biochem.*, 33, 81-92, 1987



- 
127. Szewczuk A., Rapak A., *Wiadomości Chemiczne*, 39, 31-84, 1985
  128. Haag R., Roller S., *Topics in Curr. Chem.*, 242, 1-42, 2004
  129. Kamei S., Okubo M., Matsuda T., Matsumoto T., *Colloid Polym. Sci.*, 264, 743-747, 1986
  130. Tanriseven A., Dogan S., *Process Biochem.*, 36, 1081-1083, 2001
  131. Tanriseven A., Uludag Y.B. Dogan S., *Enzyme Microb. Technol.*, 30, 406-409, 2002
  132. Bodalo A., Bastida J., Gomez J.L., Alcaraz I., Asanza M.L., *Enzyme Microb. Technol.*, 21, 64-69, 1997
  133. Cetinus S.A., Öztop H.N., *Enzyme Microb. Technol.*, 32, 889-894, 2003
  134. DeSantis G., Jones J.B., *Curr. Opinion Biotech.*, 10, 324-330, 1999
  135. Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M.J., Waldron K.C., *Biotechniques*, 37, 790-802, 2004
  136. López-Galego F., Betancor L., Hidalgo A., Alonso N., Fernandez-Lorente G., Guisañ J.M., Fernández-Lafuente R., *Enzyme Microb. Technol.*, 37, 750-756, 2005
  137. Hublik G., Schinner F., *Enzyme Microb. Technol.*, 27, 330-336, 2000
  138. Malmsten M., Larsson A., *Colloids Surf. B*, 18, 277-284, 2000
  139. Bai Y.X., Li Y.F., Wang M.T., *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 540-547, 2006
  140. Yakup Arica M., Gürdal Alaeddinoğlu N., Hasirci V., *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 152-157, 1998
  141. Al-Adhami A.J.H., Bryjak J., Greb-Markiewicz B., Peczyńska-Czoch W., *Process Biochem.*, 37, 1387-1394, 2002
  142. Bryjak J., Kolarz B.N., *Process Biochem.*, 33, 409-417, 1998
  143. Bryjak J., *Biochem. Eng. J.*, 16, 347-355, 2003
  144. Bayramoğlu G., Altinok H., Bulut A., Denizli A., Yakup Arica M., *React. Funct. Polym.*, 56, 111-121, 2003
  145. Pepper D.S., *Meth. Mol. Biol.*, 11, 173-196, 1992
  146. Bayramoğlu G., Kaçar Y., Denizli A., Yakup Arica M., *J. Food Eng.*, 52, 367-374, 2002
  147. Ohtani N., Ishidao T., Iwai Y., Arai Y., *Colloid Polym. Sci.*, 277, 197-202, 1999

- 
148. Kato N., Samejima S., Takahashi F., *Materials Sci. Eng. C*, 17, 155-160, 2001
  149. Kawaguchi H., Fujimoto K., Mizuhara Y., *Colloid Polym.Sci.*, 270, 53-57, 1992
  150. Shiroya T., Tamura N., Yasui M., Fujimoto K., Kawaguchi H., *Colloids Surf. B*, 4, 267-274, 1995
  151. Yasui M., Shiroya T., Fujimoto K., Kawaguchi H., *Colloids Surf. B*, 8, 311-319, 1997
  152. Kondo A., Fukuda H., *J. Ferment. Bioeng.*, 84, 337-341, 1997
  153. Takahashi F., Sakai Y., Mizutani Y., *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 152-156, 1997
  154. Liu F., Tao G., Zhuo R., *Polymer J.*, 25, 561-567, 1993
  155. Chen G., Hoffman A.S., *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.*, 5, 371-382, 1994
  156. Shiroya T., Yasui M., Fujimoto K., Kawaguchi H., *Colloids Surf. B*, 4, 275-285, 1995
  157. Wilimowska A., Polish Patent 100373, 1982
  158. Pepper K.W., Reichenburg D., Hale D.K.J., *J. Chem. Soc.*, 4, 3129-3131, 1952
  159. Hecker H., *J. Chromatogr. A*, 102, 135-138, 1974
  160. Gózdź A., „Struktura a selektywność anionów polistyrenowych”, Praca doktorska, Politechnika Wrocławska, ITOTS, 1976
  161. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr N.J., Randall R.J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951
  162. Kunitz M., *J. General Physiology*, 31, 291-298, 1947
  163. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W., *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 271-278, 1961
  164. Jang S., Kim D., Choi J., Row K., Ahn W., *J. Porous Mater.*, 13, 385-391, 2006
  165. Nesterenko P.N., Zhukova O.S., Shpigun O.A., Jones P., *J. Chromatogr. A*, 813, 47-53, 1998
  166. Bielański A., „Podstawy chemii nieorganicznej”, tom 2, PWN, Warszawa, 1994
  167. Gomez C.G., Alvarez Igarzabal C.I., Strumia M.C., *Polymer*, 45, 6189-6194, 2004

- 
168. Wang R., Zhang Y., Ma G., Su Z., *Colloids Surf. B*, 51, 93-99, 2003
  169. Svoboda K., Kyrš M., *J. Radioanalyt. Nuclear Chem.*, 220, 245-247, 1997
  170. Sivaiah M.V., Venkatesan G.S., *Colloids Surf. A*, 236, 147-157, 2004
  171. Cortina J.L., Arad-Yellin R., Miralles N., Sastre A.M., Warshawsky A., *React. Funct. Polym.*, 38, 269-278, 1998
  172. Caliceti P., Salmaso S., Lante A., Yoshida M., Katakai R., Martellini F., *J. Contr. Release*, 75, 173-181, 2001
  173. "Methods in Enzymology", pod red. K. Mosbach, vol. 137, Academic Press, San Diego, 1988
  174. Fernandez-Lafuente R., Rosell C.M., Rodriguez V., Guisan J.M., *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 517-523, 1995
  175. Lopez-Gallego F., Betancor L., Mateo C., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R., *J. Biotechnol.*, 119, 70-75, 2005
  176. O'Neill H., Angley C.V., Hemery H., Evans B.R., Dai S., Woodward J., *Biotechnol. Lett.*, 24, 783-790, 2002
  177. Bryjak J., *Wiadomości Chemiczne*, 58, 691-746, 2004
  178. Danisman T., Tan S., Kacar Y., Ergene A., *Food Chem.*, 85, 461-466, 2004
  179. Arica M.Y., Bayramoglu G., *J. Mol. Catal. B*, 38, 131-138, 2006
  180. Sekizaki H., Itoh K., Murakami M., Toyota E., Tanizawa K., *Comparative Biochem. Physiol. B*, 127, 337-346, 2000
  181. Zech M., Görisch H., *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 41-46, 1995
  182. Manger-Jacob F., Müller T., Janssen M., Höfer M., Hölker U., *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, 267-275, 2005
  183. Kumar A., Gupta M.N., *J. Mol. Catal. B*, 5, 289-294, 1998