

SŁAWOMIR RUPIŃSKI, ZBIGNIEW K. BRZOZOWSKI, KATARZYNA SKWARA

Politechnika Warszawska

Wydział Chemiczny

Katedra Chemii i Technologii Polimerów

ul. Koszykowa 75, 00-662 Warszawa, Polska

e-mail: s_rupinski@o2.pl

Rozpuszczalne w wodzie karbamoiloetylowane pochodne skrobi ziemniaczanej

Cz. I. SYNTEZA I STRUKTURA

Streszczenie — Opisano dwie metody syntezy karbamoiloetylowanych pochodnych skrobi (CrES) obejmujące etapy degradacji (chemicznej bądź enzymatycznej pod wpływem α -amylazy) oraz etap reakcji addycji z akryloamidem. Zbadano wpływ warunków degradacji enzymatycznej (biodegradacji) na rozpuszczalność w wodzie CrES, lepkość jej roztworów wodnych, stopień podstawienia (*DS*) i ciężar cząsteczkowy. Scharakteryzowano wpływ opisanej modyfikacji skrobi na zmiany struktury jej powierzchni.

Słowa kluczowe: skrobia, karbamoiloetylowanie, stopień podstawienia, degradacja enzymatyczna, α -amylaza, rozpuszczalność w wodzie, ciężar cząsteczkowy, struktura powierzchni.

WATER-SOLUBLE CARBAMOYLETHYLATED DERIVATIVES OF POTATO STARCH.

PART I. SYNTHESIS AND STRUCTURE

Summary — Water-soluble starch derivatives (CrES) containing carbamoylethyl groups were synthesized using two methods. The first based on chemical degradation of native potato starch under the influence of KOH or NaOH and subsequent reaction of addition with acryloamide. The other based on carbamoylethylation of native starch in such reaction and subsequent enzymatic biodegradation of CrES obtained using α -amylase. The effects of biodegradation conditions, namely: catalyst type and concentration [Ca(OH)₂, KOH], time and temperature of the process and α -amylase concentration on CrES solubility in the water and viscosity of aqueous solutions obtained (Table 1 and 6) as well as on the degree of substitution (*DS*, Table 2—5). The lowering of molecular weight of starch products after degradation, either chemical or enzymatic one, positively influences the solubility of CrES in water (results of MALDI-TOF measurements, Fig. 1, 2 and 6). The modification causes also the changes in the surface structure of CrES facilitating its dissolution in water (results of SEM microscopic investigations, Fig. 3 and 7). Chemical structure of CrES was confirmed by FT-IR method (Fig. 4, 5 and 8).

Key words: starch, carbamoylethylation, substitution degree, enzymatic degradation, α -amylase, water solubility, molecular weight, surface structure.

Od wielu lat prowadzi się na świecie badania dotyczące modyfikacji skrobi; koncentrują się one przeważnie na zwiększeniu możliwości jej zastosowania. Zużycie skrobi i jej pochodnych nierozpuszczalnych w wodzie jest ogromne, ale ciągle wzrasta zapotrzebowanie na pochodne rozpuszczalne w zimnej wodzie. Dlatego też wiele prac badawczych jest poświęconych modyfikacji skrobi w celu polepszenia jej rozpuszczalności w wodzie, a także innych właściwości. Wzrost rozpuszczalności skrobi można uzyskać w wyniku degradacji chemicznej [1, 2] lub hydrolizy kwasowej [3] i enzymatycznej [4—8] bądź też na drodze chemicznej modyfikacji, takiej jak utlenianie [9, 10], estryfikacja [11], eteryfikacja [12—14] i szczenie [15, 16].

Dotychczasowe działania zmierzające w kierunku otrzymywania karbamoiloetylowanej skrobi były opisane m.in. w publikacjach [17—22] i dotyczyły modyfikacji skrobi kukurydzianej. Prace [17, 22, 23] odnosiły się do procesu modyfikacji skrobi akryloamidem w środowisku wodno-organicznym, z dużym nadmiarem rozpuszczalników organicznych, którymi były cykloheksan, alkohol izopropylowy oraz dimetyloformamid — a więc substancje trudne do usunięcia z mieszaniny reakcyjnej. Uzyskane karbamoiloetylowane skrobie były słabo rozpuszczalne w zimnej wodzie, pomimo wartości stopnia podstawienia (*DS*) zbliżonego do 0,2. Wciąż aktualny jest więc problem otrzymywania karbamoiloetylowanych pochodnych skrobi ziemniaczanej łatwo rozpuszczalnych w wodzie.

Prezentowana praca obejmuje badania związane z degradacją skrobi ziemniaczanej, syntezą (modyfikacją) i hydrolizą enzymatyczną karbamoiloetylowanej skrobi (CrES), a także określeniem struktury i budowy morfologicznej otrzymany, rozpuszczalnych w wodzie związków. W kolejnych częściach artykułu opiszemy ich właściwości i zastosowania.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały

Do syntezy karbamoiloetylowanej skrobi stosowano następujące substancje:

- natywną skrobię ziemniaczaną, charakterystyka wg PN-74/A-74-710, producent Zakłady Przemysłu Ziemniaczanego, Luboń;
- akryloamid czysty firmy Fluka, Szwajcaria;
- wodorotlenek wapnia, wodorotlenek sodu, wodorotlenek potasu, metanol, kwas solny produkcji firmy „CHEMPUR”, Piekary Śląskie;
- bufor pH = 6,9 firmy Fluka, Szwajcaria;
- α -amylaza trzustkowa — *Porcine Pancreatic α -Amylase* (PPA) firmy Fluka, Szwajcaria (aktywność ok. 50 U/mg, gdzie 1 U dotyczy ilości enzymu, która uwalnia 1 μ mol maltozy w ciągu 1 min w temp. 25 °C w środowisku o pH 6,9).

Synteza karbamoiloetylowanej skrobi

Syntezę prowadzono dwiema odmiennymi dwuetapowymi metodami. Pierwszy sposób dotyczył chemicznej degradacji natywnej skrobi ziemniaczanej i następnej modyfikacji zdegradowanej skrobi w reakcji addycji z akryloamidem. Druga metoda polegała na modyfikacji natywnej skrobi ziemniaczanej akryloamidem i dopiero następnej realizowanej w różnych warunkach enzymatycznej biodegradacji otrzymanych pochodnych skrobi (zmiennie: stężenie enzymu, temperatura oraz czas trwania procesu).

Metoda I

Do reaktora pojemności 2000 ml umieszczonego w czaszy grzejnej i zaopatrzonego w mieszadło, chłodnicę zwrotną oraz termometr wlewano 600 ml wody i, mieszając, wsypywano 80 g natywnej skrobi ziemniaczanej. Zawartość reaktora ogrzewano do temp. 40—50 °C, w tej temperaturze wkraplano rozpuszczony w 120 ml wody wodorotlenek sodu (lub wodorotlenek potasu), po czym podwyższano temperaturę. Po uzyskaniu temp. 90 ± 1 °C proces prowadzono jeszcze w ciągu 60—240 min, a następnie, stale mieszając, zawartość reaktora schładzano do temp. 25 °C i zobojętniano za pomocą 10-proc. HCl w celu zahamowania dalszego procesu degradacji chemicznej. Produkt końcowy wytrącono metanolem i suszono w temp. 75—80 °C, otrzymując z wydajnością ok. 80% zdegradowaną skrobię, której roz-

puszczalność w wodzie w temp. 20 °C wynosiła 5 g/50 ml. To postępowanie powtarzano kilkakrotnie ze względu na konieczność uzyskania wystarczającej ilości związku niezbędnego do optymalizacji procesu kontrolowanej degradacji.

Następnie do kolby trój szyjnej zaopatrzonej w mieszadło, chłodnicę zwrotną i termometr wlewano 50 ml wody i, mieszając, wsypywano 20 g zdegradowanej skrobi. Zawartość ogrzewano w czaszy grzejnej. W temperaturze ok. 40 °C wkraplano rozpuszczony w 20 ml wody wodorotlenek wapnia (wodorotlenek potasu) oraz wprowadzano 50-proc. wodny roztwór akryloamidu. Całość podgrzewano i utrzymywano w temp. 50 °C w ciągu 2 h. Po tym czasie produkt reakcji zobojętniano za pomocą 10—15-proc. HCl do pH = 7, oczyszczano wytrącając w 1000 ml metanolu i suszono osad w temp. 75—80 °C. Proces otrzymywania CrES podzielono tu na dwa etapy (degradacji i modyfikacji) w celu określenia bezpośredniego wpływu stosowanego katalizatora karbamoiloetylowania na stopień podstawienia CrES.

Metoda II

W kolbie trój szyjnej pojemności 250 ml zaopatrzonej w mieszadło, chłodnicę zwrotną i termometr mieszano 20 g natywnej skrobi ziemniaczanej ze 180 g wody i układ ogrzewano do temp. 70 °C, kiedy to następowało spęcznienie oraz kleikowanie skrobi. Następnie, energicznie mieszając, wkraplano wodny roztwór Ca(OH)₂ [2,8 g Ca(OH)₂ i 6 g H₂O], temperaturę mieszaniny reakcyjnej podnoszono do 90 °C, utrzymywano na tym poziomie w ciągu 30—40 min, po czym zawartość kolby chłodzono do temp. 50 °C i wprowadzano do niej określoną ilość 50-proc. wodnego roztworu akryloamidu. Całość utrzymywano w temp. 50 °C w ciągu 2 h i zobojętniano za pomocą HCl do uzyskania wartości pH = 7. Następnie do mieszaniny reakcyjnej (CrES w roztworze wodnym) dodawano buforowany roztwór α -amylazy o różnych stężeniach; temperatura procesu biodegradacji wynosiła 30 °C, 40 °C lub 50 °C, a utrzymywano ją w ciągu 60, 120, 180 bądź 240 min. Otrzymane w ten sposób próbki CrES oczyszczano wytrącając je w 2000 ml metanolu (dezaktywacja enzymu). Tak oczyszczony produkt suszono w temp. 75—80 °C.

Metody oceny produktów

Pomiary reologiczne

Właściwości reologiczne badano w reometrze „Mettler RM 180” w temp. 25 °C, stosując różne szybkości ścinania. Pomiary wykonywano w układzie cylindrów współosiowych.

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR)

W metodzie FT-IR posługiwano się spektrofotometrem FT-IR 165 firmy BIO-RAD, rejestrując widma w przedziale liczb falowych 4000—400 cm⁻¹. Próbkę miały postać błon na płytkach KBr; pomiarów dokony-

wano w temp. 25 °C. Widma FT-IR analizowano z zastosowaniem programu „BioRad Win-IR”.

Spektrometria masowa

Ciężary cząsteczkowe próbek określano metodą MALDI-TOF w spektrometrze masowym „Compact MALDI 4” firmy Kratos Analytical w technice liniowej, badając jony dodatnie. Matrycą był kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (DHB); stosowano 0,2 M wodny roztwór DHB z dodatkiem 0,1 % mas. CH₃COOH. Próbkę rozpuszczano w wodzie destylowanej w stężeniu ok. 25 mg/1 ml. Przed pomiarem mieszano roztwór próbki z matrycą w stosunku 1:80 i nanoszono w objętości ok. 1—1,5 µl na płytkę pomiarową. Do wzorcowania użyto sygnału insuliny *M* = 5733 Da oraz sygnału kwasu synapinowego *M* = 207 Da (stosowano kalibrację dwupunktową).

Analiza elementarna

Analizę elementarną otrzymanych próbek prowadzono w automatycznym analizatorze spaleniowym firmy Perkin-Elmer, seria II CHNS/O. Oznaczano trzy pierwiastki: azot, węgiel i wodór. Na podstawie procentowej zawartości azotu określano stopień podstawienia (*DS*) grup karbamoiloetylowych wg wzoru (1) [24]:

$$DS = \frac{162 \cdot \%N}{1400 - (71 \cdot \%N)} \quad (1)$$

Oznaczanie procentowej zawartości grup karboksylowych

Oznaczanie procentowej zawartości grup karboksylowych w próbkach wykonywano według poniższej procedury opisanej w literaturze [25, 26]. W 300 ml dejonizowanej wody mieszano 500 mg próbki i gotowano w ciągu 10 min ciągle mieszając. Tak otrzymany roztwór miareczkowano za pomocą 0,025 M NaOH przy użyciu jako wskaźnika roztworu fenoloftaleiny. Procentową zawartość grup karboksylowych obliczano ze wzoru (2):

$$COOH \% = V \text{ NaOH} \cdot 0,025 \cdot 0,045 \cdot \frac{100}{m_p} \quad (2)$$

gdzie: *V* — użyta ilość NaOH w ml, 0,045 — masa molowa grupy COOH/1000, *m_p* — masa próbki w g.

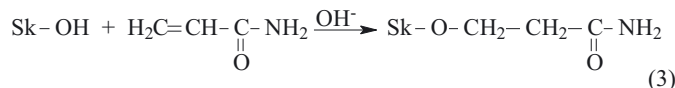
Elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM)

Do pomiarów SEM wykorzystywano mikroskop skaningowy „Tesla BS300” o powiększeniach w zakresie 500—5000× (fotografie). Próbki pochodnych skrobi przed pomiarem rozdrabniano w moździerzu.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Modyfikowanie skrobi wstępnie degradowanej chemicznie (metoda I)

Syntezę karbamoiloetylowanej skrobi opisuje równanie (3) [23, 27]:



gdzie: Sk-OH — próbka wyjściowej skrobi.

Otrzymane w tej reakcji addycji CrES opisane w publikacjach [23, 28] rozpuszczały się w wodzie w temp. 25 °C w przedziale 5—70 %, a rozpuszczalność ta zależała przede wszystkim od sumarycznej zawartości grup karbamoiloetylowych i karboksylowych. Wraz ze wzrostem wartości *DS* rozpuszczalność zwiększała się. Warto podkreślić, że w tych opisanych w literaturze przypadkach nie prowadzono degradacji skrobi, nie było więc możliwe określenie wpływu degradacji na rozkład jej ciężarów cząsteczkowych. Wiadomo natomiast, że procesy zarówno degradacji, jak i biodegradacji skrobi powodują znaczne zmniejszenie ciężaru cząsteczkowego, co z kolei zwiększa rozpuszczalność skrobi i jej pochodnych w zimnej wodzie. Dlatego też na pierwszym etapie (metoda I) poddawano skrobię ziemniaczaną opisanej w części doświadczalnej degradacji, której wyniki przedstawiono w tabeli 1. Potwierdzeniem zmniejszenia się ciężaru cząsteczkowego jest zmiana lepkości wodnego roztworu karbamoiloetylowanej skrobi.

Tabela 1. Wpływ czasu degradacji na rozpuszczalność w wodzie w temp. 25 °C i na lepkość wodnych roztworów skrobi^{*)}

T a b l e 1. Effect of degradation time on solubility and viscosity of starch aqueous solutions

Czas, min	Rozpuszczalność w wodzie	Lepkość η, Pa · s ^{**)}
60	nierozpuszczalna	0,971
120	częściowo rozpuszczalna	0,097
180	częściowo rozpuszczalna	0,046
240	całkowicie rozpuszczalna	0,030

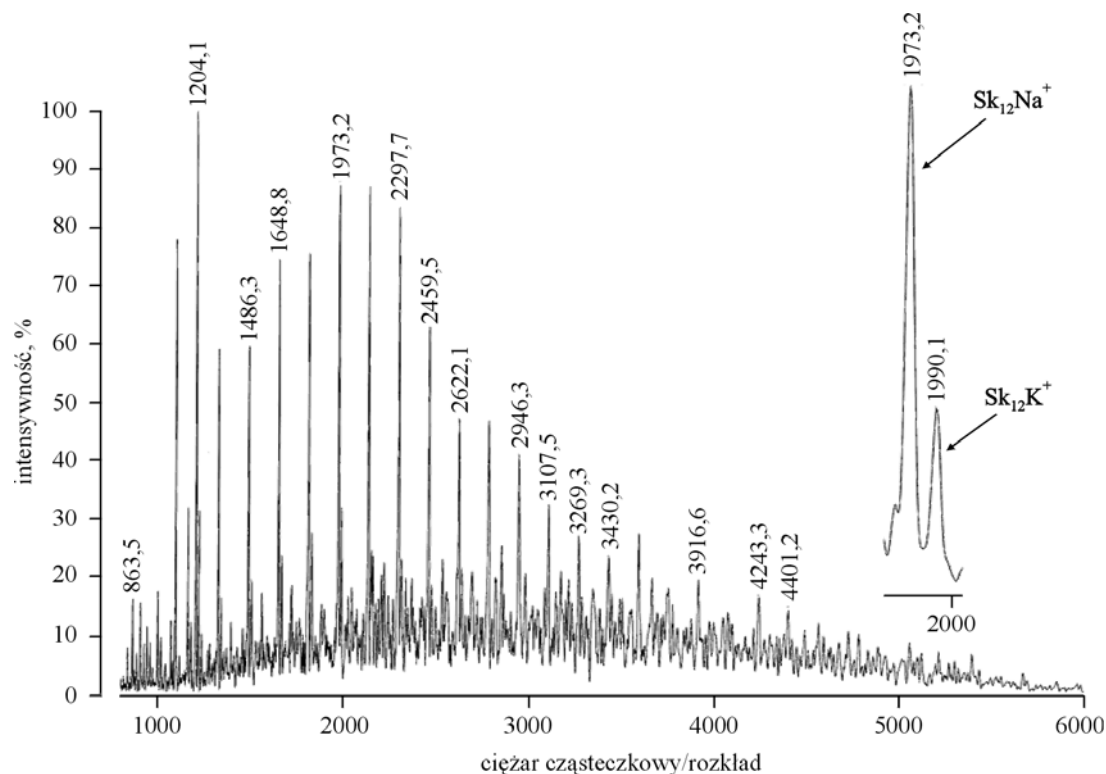
^{*)} Temperatura degradacji 90 ± 1 °C, stężenie *c* = 10 %.

^{**)} Temperatura pomiaru 25 °C, szybkość ścinania 100 s⁻¹.

Widmo masowe MALDI-TOF zdegradowanej skrobi ziemniaczanej otrzymanej w wyniku degradacji w środowisku zasadowym w temp. 90 °C przedstawia rys. 1. Obecna jest w nim jedynie seria sygnałów pochodzących od skrobi, a jej ciężary cząsteczkowe po 240 min degradacji mieszczą się w przedziale 800—5500 Da, podczas gdy ciężar cząsteczkowy natywnej skrobi może osiągać wartość kilku milionów Da [29].

Następnie zdegradowaną skrobię poddawano modyfikacji wg równania (3) i określano na podstawie analizy elementarnej stopień podstawienia wyjściowej skrobi grupami karbamoiloetylowymi obecnymi w CrES. Analizie elementarnej poddano także skrobię natywną, w przypadku której uzyskano następujące dane: 38,30 % C i 6,23 % H. Określono wpływ ilości Ca(OH)₂ i KOH na stopień podstawienia CrES oraz zawartość grup karboksylowych (tabele 2 i 3).

Tak więc najwyższy stopień podstawienia grupami karbamoiloetylowymi uzyskano stosując ilość Ca(OH)₂



Rys. 1. Widmo masowe MALDI-TOF skrobi po 240 min degradacji chemicznej; $Sk_{12}Na^+$ — addukt skrobi z jonem sodowym, $Sk_{12}K^+$ — addukt skrobi z jonem potasowym ($Sk = C_6H_{10}O_5$)

Fig. 1. MALDI-TOF spectrum of a starch after 240 min of chemical degradation; $Sk_{12}Na^+$ — starch adduct with sodium ion, $Sk_{12}K^+$ — starch adduct with potassium ion ($Sk = C_6H_{10}O_5$)

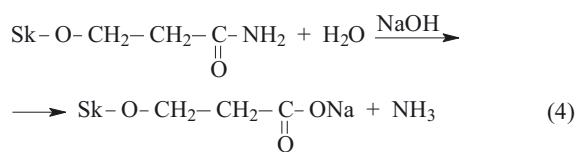
T a b e l a 2. Wpływ ilości $Ca(OH)_2$ na określony metodą analizy elementarnej stopień podstawienia (DS) CrES i na zawartość grup karboksylowych¹⁾

T a b l e 2. Effect of $Ca(OH)_2$ amount on substitution degree (DS) of CrES (determined by elemental analysis) and on carboxyl groups' content

Lp.	$Ca(OH)_2$, g	N, %	H, %	C, %	DS	$COOH$, %
1	1,38	0,82	5,25	36,27	0,10	0,09
2	1,84	1,12	6,12	40,20	0,14	0,10
3	2,29	1,42	6,44	40,18	0,18	0,11
4	2,76	1,28	6,10	42,72	0,16	0,12
5	3,20	1,28	6,17	41,87	0,16	0,15
6	3,68	1,19	6,44	41,15	0,15	0,16
7	4,60	1,12	6,18	41,02	0,14	0,17

¹⁾ Warunki reakcji karbamoiloetylowania skrobi: akryloamid 10 g, czas 2 h, temp. 50 °C.

wynoszącą 2,29 g (0,18; próbka 3 w tabeli 2), a w przypadku KOH — 2,80 g (0,28; próbka 6 w tabeli 3). Przy użyciu ilości $Ca(OH)_2$ przekraczającej 2,70 g oraz ilości KOH przekraczającej 3,50 g, następuje hydroliza grup karbamoilowych z wydzieleniem NH_3 [równanie (4)];



T a b e l a 3. Wpływ ilości KOH na określony metodą analizy elementarnej stopień podstawienia (DS) CrES i na zawartość grup karboksylowych¹⁾

T a b l e 3. Effect of KOH amount on substitution degree (DS) of CrES (determined by elemental analysis) and on carboxyl groups' content

Lp.	KOH, g	N, %	H, %	C, %	DS	$COOH$, %
1	1,04	1,10	6,15	40,11	0,13	0,10
2	1,39	1,37	6,26	41,36	0,17	0,11
3	1,73	1,51	6,18	41,51	0,19	0,13
4	2,10	1,70	6,15	40,11	0,22	0,15
5	2,43	1,83	5,96	41,22	0,23	0,17
6	2,80	2,17	6,27	41,35	0,28	0,19
7	3,50	2,16	6,18	41,51	0,28	0,22
8	4,20	2,14	6,08	42,02	0,27	0,23
9	4,90	2,13	5,98	43,20	0,27	0,25
10	5,60	1,65	5,78	43,50	0,21	0,28

¹⁾ Warunki reakcji jak w tabeli 2.

maleje wówczas procentowa zawartość azotu w CrES, a więc i wartość DS (próbki 4—7 w tabeli 2 i 7—10 w tabeli 3).

Wartość stopnia podstawienia skrobi zależy też od ilości dodawanego akryloamidu i wzrasta wraz ze zwiększaniem tej ilości (tabela 4). Im wyższy stopień podstawienia, tym większe prawdopodobieństwo, że na jednostkę powtarzalną skrobi przypada więcej niż jedna grupa karbamoiloetylowa. Maksymalny stopień podsta-

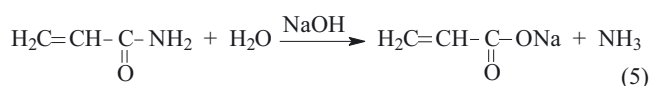
T a b e l a 4. Wpływ ilości akryloamidu na określony metodą analizy elementarnej stopień podstawienia (DS) CrES^{*)}

T a b l e 4. Effect of acrylamide amount on substitution degree (DS) of CrES, determined by elemental analysis

Lp.	Akryloamid, g	Ca(OH) ₂				KOH			
		N, %	H, %	C, %	DS	N, %	H, %	C, %	DS
1	5,0	0,63	6,21	39,64	0,08	1,06	6,28	40,80	0,13
2	7,5	1,16	6,19	42,60	0,14	1,40	6,27	41,08	0,17
3	10,0	1,42	6,44	40,18	0,18	2,17	6,27	41,35	0,28
4	15,0	1,68	6,50	40,70	0,21	3,95	6,26	41,60	0,57

^{*)} Warunki reakcji: skrobia 20 g, czas reakcji 2 h, temperatura reakcji 50 °C, Ca(OH)₂ 2,7 g, KOH 2,8 g.

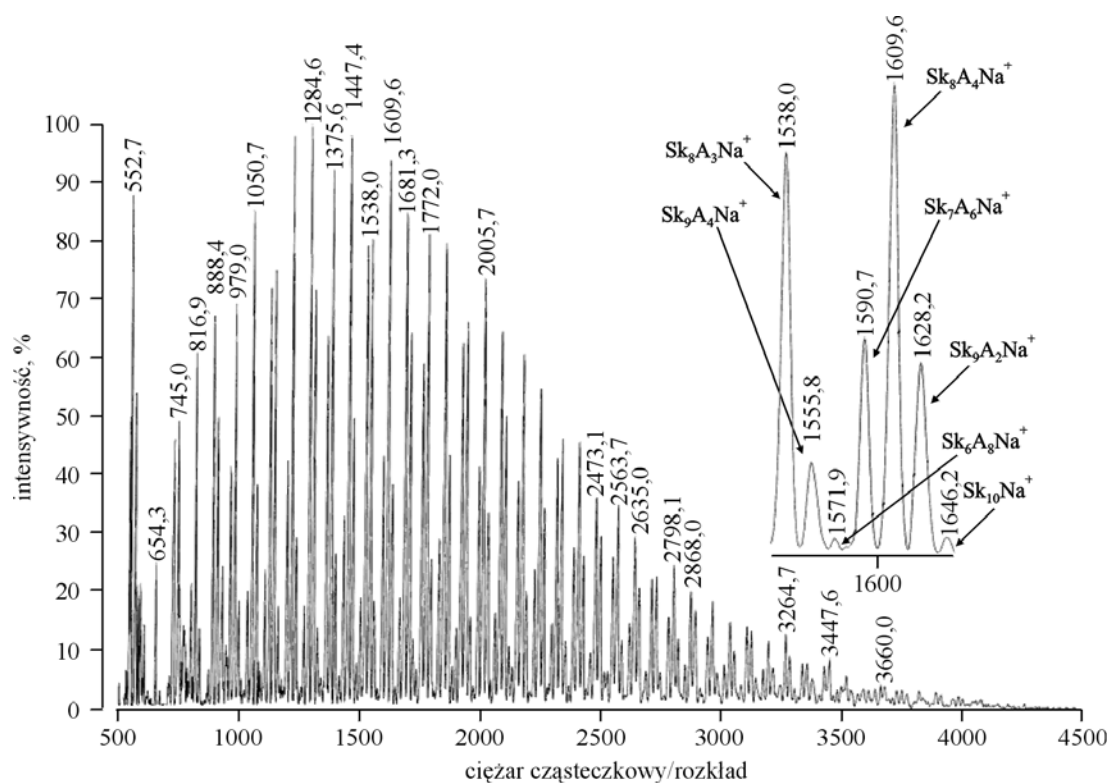
wienia jaki można uzyskać podczas modyfikacji skrobi akryloamidem jest równy 3. Wówczas na 3 grupy -OH skrobi przypadają 3 grupy -CH₂CH₂CONH₂. Jednakże aby uzyskać tak dużą wartość DS należałoby użyć znacznego nadmiaru akryloamidu. Ze względów ekonomicznych nie jest to jednak korzystne, a technologicznie trudne do zrealizowania, ponieważ część zarówno podstawionych, jak i pochodzących z monomeru grup karbamoilowych mogłaby ulec hydrolizie [26]:



Wszystkie karbamoiloetylowane skrobie o różnych stopniach podstawienia dobrze rozpuszczały się w wodzie w temp. 25 °C.

Poza analizą elementarną, potwierdzeniem otrzymania CrES była analiza jej widma masowego. Widoczne na rys. 2 serie sygnałów pochodzą od skrobi i karbamoiloetylowanej skrobi o różnej zawartości jednostek karbamoiloetylowych (-CH₂CH₂CONH₂). Przeważają łańcuchy, w których na mer skrobi przypada ≤1 jednostek karbamoiloetylowych, a pojawiają się również łańcuchy, w których na jeden mer skrobi przypadają dwie takie grupy, ale ich udział jest niewielki.

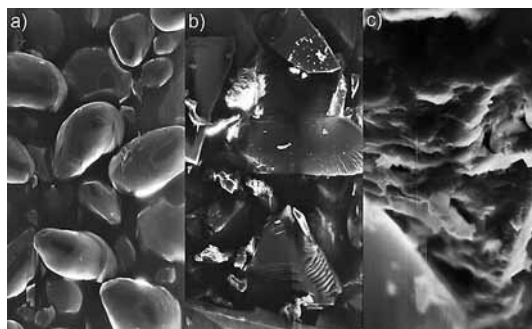
W przypadku polisacharydów o dużych ciężarach cząsteczkowych rozpatrywane widma są skomplikowane, a poszczególne sygnały trudne do zinterpretowania. Możliwe jest natomiast określenie rozrzutu ciężarów cząsteczkowych, które w przypadku CrES otrzymywanej tu wobec Ca(OH)₂ lub KOH mieszczą się w przedziale 500—3700 Da, podobnie jak w przypadku CrES uzyskanej przy użyciu NaOH jako katalizatora [1]. Widma masowe zdegradowanej skrobi oraz CrES wskazują również na degradację łańcuchów skrobi podczas 120 min procesu modyfikacji akryloamidem. Jednocześnie zwrócić się rozkład ciężarów cząsteczkowych.



Rys. 2. Widmo masowe MALDI-TOF zdegradowanej chemicznie skrobi; $\text{Sk}_{10}\text{Na}^+$ — addukt jonu sodowego ze zdegradowaną chemicznie skrobią, która nie uległa karbamoiloetylowaniu, $\text{Sk}_8\text{A}_3\text{Na}^+$ — addukt karbamoiloetylowanej skrobi z jonem sodowym ($\text{Sk} = \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$, $\text{A} = \text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$)

Fig. 2. MALDI-TOF spectrum of chemically degraded starch; $\text{Sk}_{10}\text{Na}^+$ — adduct of sodium ion with chemically degraded starch, which did not undergo carbamoylethylation, $\text{Sk}_8\text{A}_3\text{Na}^+$ — adduct of carbamoylethylated starch with sodium ion ($\text{Sk} = \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$, $\text{A} = \text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$)

Wraz ze zmniejszaniem się ciężaru cząsteczkowego, zmienia się również struktura powierzchni zarówno zdegradowanej, jak i karbamoiloetylowanej skrobi. Podczas degradacji i modyfikacji ziaren skrobi natywnej zostaje zaburzony charakter hydrofobowy, na którego zmianę wpływają nie tylko zmiany powierzchni cząstek skrobi, ale również zmniejszenie ciężarów cząsteczkowych zmodyfikowanej skrobi. Jak już wspominaliśmy, ziarna skrobi przed degradacją i modyfikacją są nierozpuszczalne w zimnej wodzie, a podczas degradacji, po przekroczeniu temperatury kleikowania, zostaje zniszczona struktura ziaren skrobi, co prowadzi do powstawania roztworu koloidalnego ze względu na obecność w łańcuchach grup hydroksylowych zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych z cząsteczkami wody; skrobia w tym stanie jest typowym przykładem koloidu hydrofilowego. Dodatkowy czynnik, który wpływa na zmianę charakteru cząstek skrobi z hydrofobowego na hydrofilowy, stanowi proces modyfikacji. Podczas eteryfikacji cząstek skrobi wprowadza się do jej łańcuchów grupy karbamoiloetylowe. Ich obecność w zdegradowanej skrobi wpływa na zwiększenie odległości pomiędzy łańcuchami zmodyfikowanej skrobi oraz na zmniejszenie liczby wiązań wodorowych pomiędzy poszczególnymi łańcuchami CrES. Ograniczony udział wiązań wodorowych, a także mniejszy ciężar cząsteczkowy ułatwiają wnikanie cząsteczek wody do wnętrza

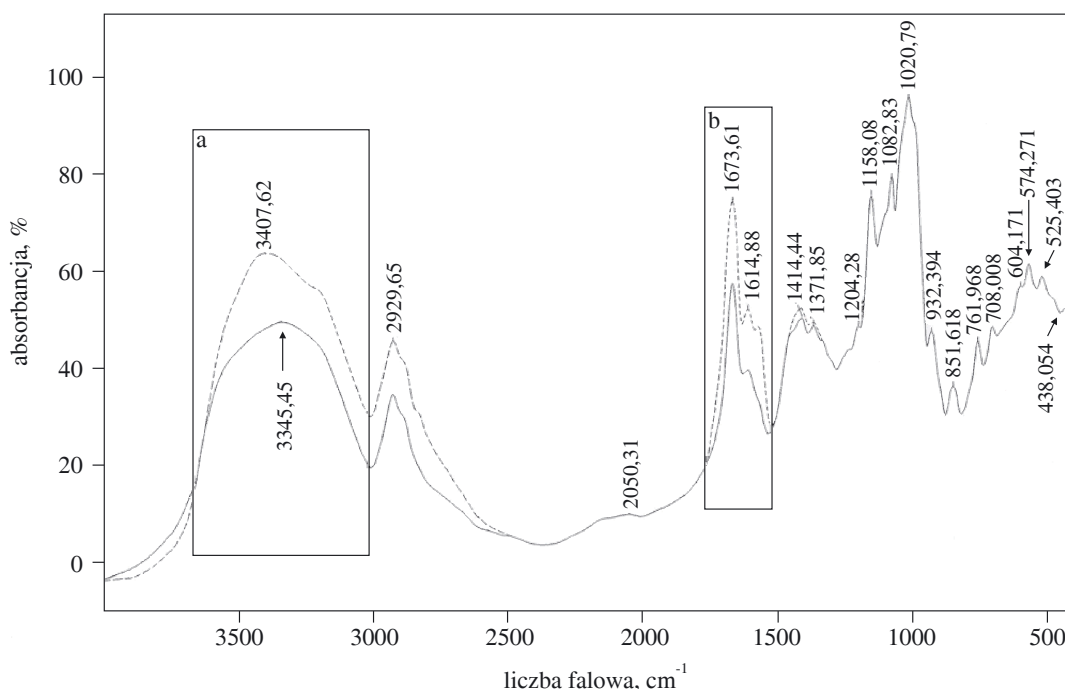


Rys. 3. Obrazy uzyskane metodą SEM: a) ziarna skrobi natywnej ($\times 1000$), b) skrobia po degradacji ($\times 500$), c) CrES ($\times 5000$)

Fig. 3. SEM images of: a) native starch grains (magnification 1000 times), b) starch after degradation (magnification 500 times), c) CrES (magnification 5000 times)

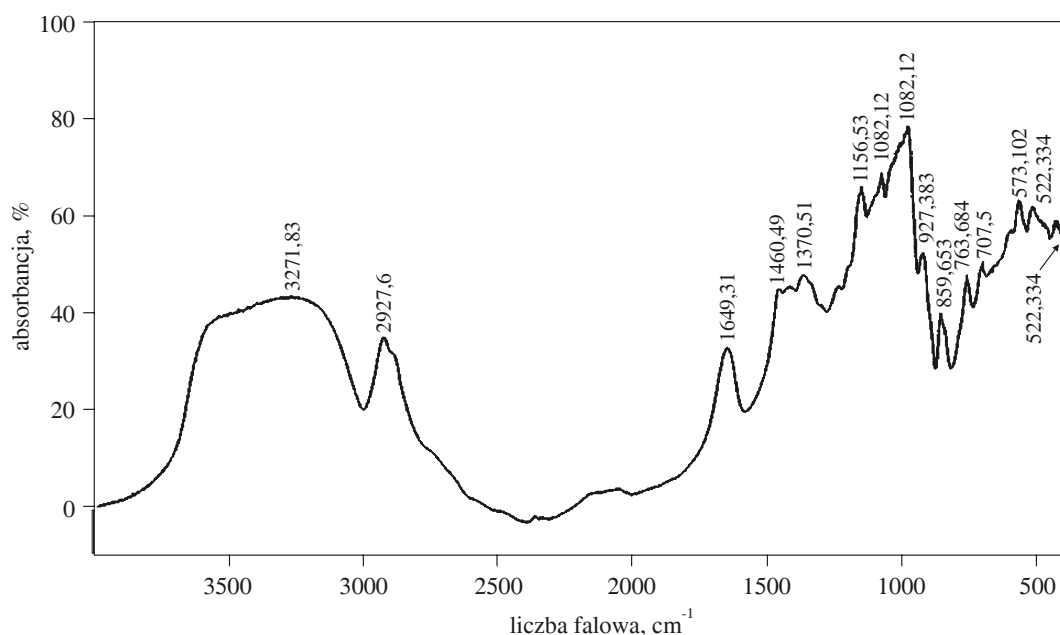
ziaren zmodyfikowanej skrobi i jednocześnie zwiększają ich rozpuszczalność.

Rysunek 3a przedstawia strukturę kulistych ziaren natywnej skrobi ziemniaczanej przed degradacją, charakteryzujących się gładką powierzchnią. W większości ziaren widoczny jest ośrodek wzrostu leżący zazwyczaj w węższej części ziarna (ciemniejsze zabarwienie). Taka budowa powoduje, że ziarna skrobiowe są nierozpuszczalne w zimnej wodzie.



Rys. 4. Widmo FT-IR CrES (linia ciągła — $DS = 0,18$; linia przerywana — $DS = 0,27$): a) zawierający pasma charakterystyczne dla grup NH_2 , NH oraz OH fragment widma FT-IR w zakresie $3600-3000\text{ cm}^{-1}$; b) zawierający I i II pasma amidowe fragment widma FT-IR w zakresie $1680-1600\text{ cm}^{-1}$

Fig. 4. FT-IR spectrum of CrES (full line — $DS = 0.18$; dashed line — $DS = 0.27$): a) FT-IR spectrum fragment in the range $3600-3000\text{ cm}^{-1}$, containing the bands characteristic for NH_2 , NH and OH groups; b) — FT-IR spectrum fragment in the range $1680-1600\text{ cm}^{-1}$, containing I and II amide bands



Rys. 5. Widmo FT-IR skrobi natywnej
Fig. 5. FT-IR spectrum of native starch

Przedstawione na rys. 3b ziarna skrobi po 240 min degradacji znacznie różnią się strukturą od ziaren skrobi natywnej, których nie obserwuje się już w badanej próbce. Wyraźnie widoczne są natomiast zmiany na powierzchni skrobi zdegradowanej. Po degradacji skrobia ma gładką, warstwową strukturę, nie wykazującą charakteru ziarnistego. Rozwinięta w ten sposób powierzchnia styku cząstek skrobi z wodą zwiększa zdolność wnikania wody do ich wnętrza i zwiększa rozpuszczalność w zimnej wodzie.

Na rysunku 3c przedstawiono karbamoiloetylowaną skrobię o jeszcze bardziej rozwiniętej pofałdowanej powierzchni, nie wykazującej ani ziaren, ani płaskiej, bądź warstwowej powierzchni.

Budowę chemiczną CrES otrzymanych metodą I scharakteryzowano za pomocą FT-IR. Widmo FT-IR karbamoiloetylowanej skrobi w zakresie 3000–3600 cm^{-1} obejmuje charakterystyczne dla amidów pasma ν_{as} ($-\text{NH}_2$) i ν (NH) (rys. 4a). Przesłonięte są one wprawdzie przez drgania grupy ν (OH) pochodzące od natywnej skrobi (rys. 5), lecz charakteryzują się dużą absorbancją, większą niż odpowiednie pasma na rys. 5. Deformacyjne drgania wachlarzowe grupy NH występujące w obszarze 850 cm^{-1} są także przesłonięte przez walencyjne drgania asymetryczne $\text{C}-\text{C}$ pochodzące od pierścienia skrobiowego.

W widmach FT-IR CrES występują charakterystyczne drgania wiązań pochodzące od grup $\text{C}-\text{O}$ (1420–1340 cm^{-1}), $-\text{OH}$ (932 cm^{-1}) oraz $-\text{CH}_2$ (2930 cm^{-1}). Występują także słabe sygnały grup $-\text{COOH}$ (1414 cm^{-1}) pochodzące z hydrolizy amidów. Budowę chemiczną karbamoiloetylowanej skrobi, podobnie jak w przypadku karbamoiloetylowanego fosforanu diskrobiowego [30], można potwierdzić na podstawie silnego sygnału

w zakresie 1680–1600 cm^{-1} pochodzącego od I i II pasma amidowego (rys. 4b).

Modyfikowanie skrobi nie poddawanej wstępnej degradacji chemicznej (metoda II)

Na kolejnym etapie pracy przeprowadziliśmy modyfikację skrobi ziemniaczanej natywnej (nie poddanej degradacji), także wg równania (3). Otrzymana w opisany w części doświadczalnej sposób karbamoiloetylowana niedegradowana skrobia o $DS = 0,28$, nie rozpuszczała się w zimnej wodzie, poddano ją więc degradacyjnej hydrolizie enzymatycznej stosując jako enzym α -amylazę. Tabela 5 zawiera wyniki badania wpływu czasu hydrolizy na wartość DS .

Tabela 5. Wpływ czasu hydrolizy enzymatycznej na określony metodą analizy elementarnej stopień podstawienia (DS) CrES otrzymanej wg metody II^{*)}

T a b l e 5. Effect of enzymatic hydrolysis time on substitution degree (DS) (determined by elemental analysis) of CrES, obtained according to method II

Czas hydrolizy enzymatycznej, min	N, %	H, %	C, %	DS
0	2,13	6,28	42,20	0,28
60	1,95	6,24	42,29	0,25
120	1,75	6,04	40,21	0,22
180	1,58	6,09	39,91	0,20
240	1,16	6,08	39,72	0,14

^{*)} Temperatura hydrolizy 40 °C, stężenie α -amylazy = $9 \cdot 10^{-3}$ g/dm³.

Tak więc, wraz z przedłużaniem czasu działania α -amylazy maleje stopień podstawienia; po upływie

240 min wartość *DS* zmniejsza się dwukrotnie. Można przypuszczać, że po tak długim czasie działania enzymu część łańcuchów skrobi podstawionej grupami karbamoiloetylowymi ulega daleko posuniętej degradacji do karbamoiloetylowanej glukozy, którą oddziela się od CrES w wyniku rozpuszczenia w metanolu.

Podobnie jak w przypadku skrobi wstępnie degradowanej, podstawienie grupami karbamoiloetylowymi polepsza rozpuszczalność polimeru w zimnej wodzie. Przyczyny tego zjawiska omówiliśmy już poprzednio.

Zbadaliśmy zależność rozpuszczalności w wodzie w temp. 25 °C biodegradowanej CrES od temperatury biodegradacji (30–50 °C), stężenia α -amylazy ($2 \cdot 10^{-3}$ – $9 \cdot 10^{-3}$ g/dm³) oraz czasu trwania reakcji (60–240 min).

T a b e l a 6. Zależność rozpuszczalności w wodzie w temp. 25 °C^{*)} biodegradowanej CrES od temperatury i czasu biodegradacji oraz stężenia α -amylazy

T a b l e 6. Dependence of water solubility at temp. 25 °C of biodegraded CrES on temperature and time of biodegradation and on α -amylase concentration

Czas biodegradacji min	Rozpuszczalność w wodzie po biodegradacji w temperaturze:		
	30 °C	40 °C	50 °C
stężenie α -amylazy = $2 \cdot 10^{-3}$ g/dm ³			
60	—	—	—
120	—	—	—
180	—	+	+
240	—	+	+
stężenie α -amylazy = $4 \cdot 10^{-3}$ g/dm ³			
60	—	—	—
120	—	+	+
180	—	+	+
240	—	+	+
stężenie α -amylazy = $9 \cdot 10^{-3}$ g/dm ³			
60	—	+	+
120	—	+	+
180	—	+	+
240	+	+	+

^{*)} + = CrES rozpuszczalna, — = CrES nierozpuszczalna.

Jak wynika z tabeli 6, wzrost stężenia enzymu w buforowanym wodnym środowisku biodegradacji i przedłużenie czasu trwania tego procesu do 3 h powoduje zwiększenie rozpuszczalności CrES w wodzie. Zbyt wysoka temperatura hydrolizy enzymatycznej sprzyja fragmentaryzacji łańcuchów skrobiowych. W przypadku α -amylazy optymalna temperatura działania enzymu mieści się w przedziale 40–50 °C. Takiemu właśnie zakresowi odpowiadają najlepsze wyniki rozpuszczalności CrES.

W porównaniu z CrES uzyskaną po chemicznej degradacji skrobi natywnej, CrES po biodegradacji rozpuszcza się w wodzie w temperaturze pokojowej z mniejszą szybkością. Przyczyną tego może być fakt, że

α -amylaza jest enzymem hydrolizującym wiązania α -1,4-glikozydowe wewnątrz cząsteczki skrobi a nie naruszającym wiązań α -1,6-glikozydowych odpowiadających za rozgałęzienia łańcuchów skrobi, utrudniających rozpuszczalność.

Zaobserwowaliśmy również znaczny spadek lepkości CrES pod wpływem biodegradacji. Lepkość 10-proc. roztworu wodnego CrES po 240 min hydrolizy w zależności od stężenia enzymu miała następujące wartości: $0,047 \text{ Pa} \cdot \text{s} / 2 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,035 \text{ Pa} \cdot \text{s} / 4 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $0,021 \text{ Pa} \cdot \text{s} / 9 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Spadek lepkości to oczywiście skutek zmniejszania się ciężaru cząsteczkowego CrES.

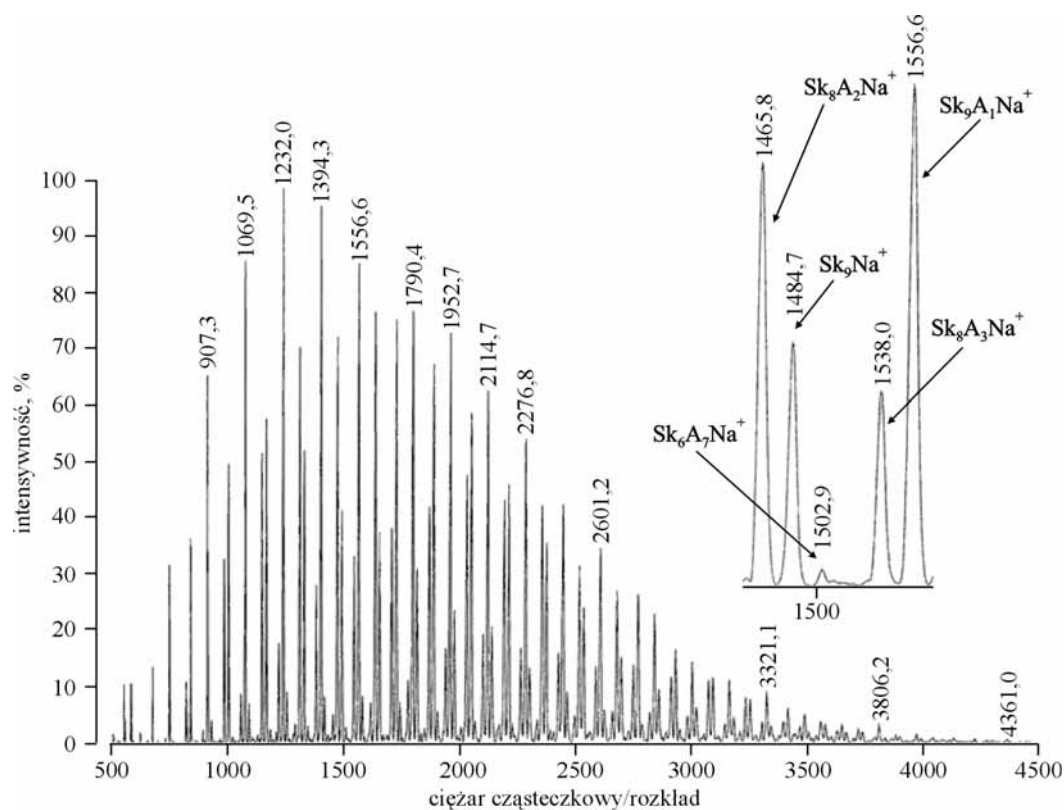
Oznaczone metodą MALDI-TOF wartości ciężarów cząsteczkowych CrES otrzymanej po hydrolizie enzymatycznej (rys. 6) mieściły się w przedziale 500–3800, czyli podobnym jak w przypadku CrES uzyskanej po 240 min degradacji w wysokiej temperaturze (90 °C). Również podobnie jak tam, wraz ze zmniejszaniem się ciężaru cząsteczkowego zmienia się struktura powierzchni karbamoiloetylowanej skrobi. Pod wpływem α -amylazy, w wyniku procesu hydrolizy wiązań α -1,4-glikozydowych skrobi podstawionej grupami karbamoiloetylowymi, charakter hydrofobowy tego produktu przekształca się w hydrofilowy.

Budowę morfologiczną nierozpuszczalnej w wodzie w temp. 25 °C CrES o *DS* = 0,28 zarówno przed, jak i po biodegradacji przedstawiają, odpowiednio, rys. 7a i 7b. Obydwa te obrazy pokazują nieregularnie pofałdowane powierzchnie CrES. Jednak powierzchnia na rys. 7a jest mniej porowata, zatem mniej rozwinięta, co może ograniczać zdolność takiej CrES do rozpuszczania się w wodzie w temperaturze pokojowej. Natomiast dobrze rozwinięta, porowata powierzchnia CrES po biodegradacji (rys. 7b) umożliwia łatwiejszy dostęp wody do wnętrza ziarna, co potwierdza wyniki badań rozpuszczalności. Warto podkreślić, że obydwa typy CrES po degradacji bądź chemicznej (rys. 3c), bądź też enzymatycznej (rys. 7b) mają podobną budowę morfologiczną, charakteryzującą się znaczną porowatością.

Widma FT-IR uzyskanej metodą II CrES po jej degradacji enzymatycznej (rys. 8) nie różnią się w istotnym stopniu pod względem położenia charakterystycznych sygnałów od widm opisanych już w odniesieniu do CrES z metody I. Pewne różnice można zaobserwować w pasmach charakterystycznych dla grup amidowych (karbamoilowych), lecz jest to uzależnione przede wszystkim od wartości *DS*.

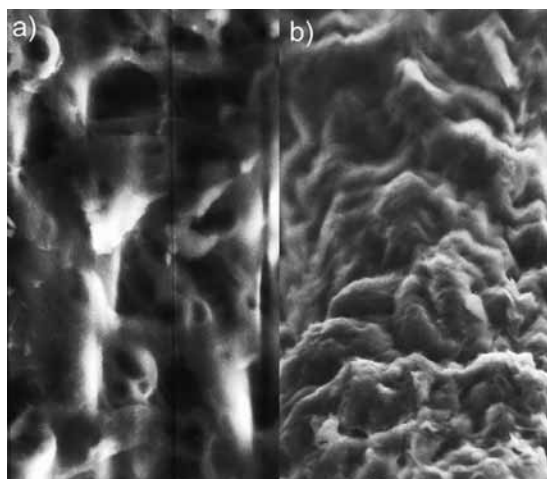
PODSUMOWANIE

Skrobia natywna zarówno przed, jak i po degradacji chemicznej reaguje z akryloamidem na drodze reakcji addycji, co potwierdziła analiza elementarna, FT-IR oraz analiza widm masowych. Dodanie w tej reakcji większych niż katalityczne ilości KOH lub Ca(OH)₂ powoduje hydrolizę grup karbamoilowych do grup karboksylo-



Rys. 6. Widmo masowe MALDI-TOF karbamoiloetylowanej skrobi po trwającej 240 min biodegradacji; Sk_9Na^+ — addukt jonu sodowego z biodegradowaną skrobią, która nie uległa karbamoiloetylowaniu, $Sk_8A_2Na^+$ — addukt biodegradowanej karbamoiloetylowanej skrobi z jonem sodowym ($Sk = C_6H_{10}O_5$, $A = C_3H_5NO$)

Fig. 6. MALDI-TOF spectrum of carbamoyl ethylated starch after 240 min of biodegradation; Sk_9Na^+ — adduct of sodium ion with biodegraded starch, which did not undergo carbamoyl ethylation, $Sk_8A_2Na^+$ — adduct of biodegraded carbamoyl ethylated starch with sodium ion ($Sk = C_6H_{10}O_5$, $A = C_3H_5NO$)

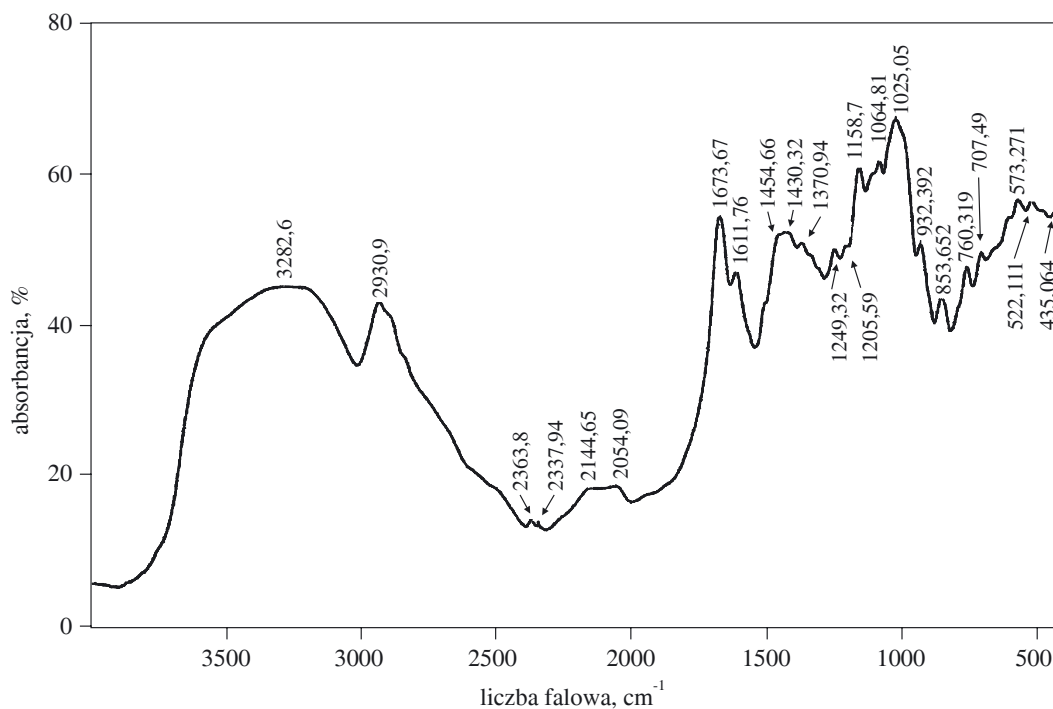


Rys. 7. Obrazy uzyskane metodą SEM: a) CrES nierozpuszczalna przed hydrolizą enzymatyczną ($\times 5000$), b) CrES rozpuszczalna po hydrolizie enzymatycznej ($\times 5000$)

Fig. 7. SEM images of: a) insoluble CrES before enzymatic hydrolysis (magnification 5000 times), b) soluble CrES after enzymatic hydrolysis (magnification 5000 times)

wych ulegających zobojętnieniu katalizatorem addycji. Proces hydrolizy potwierdzono wynikami analizy ele-

mentarnej. KOH jest bardziej skutecznym katalizatorem podstawienia CrES ($DS = 0,28$), niż $Ca(OH)_2$ ($DS = 0,18$). Stosowanie KOH jako katalizatora daje podobne wyniki jak w przypadku prowadzonych przez nas w ostatnich latach reakcji modyfikacji skrobi wobec NaOH [1]. Karbamoiloetylowane pochodne degradowanej chemicznie skrobi dobrze rozpuszczają się w zimnej wodzie (temp. 25 °C), a ich roztwory wodne charakteryzują się małą lepkością. Pochodne CrES pod wpływem α -amylazy ulegają enzymatycznej degradacji, tworząc produkty rozpuszczalne w wodzie w temp. 40—50 °C. Optymalne warunki biodegradacji prowadzące do polimerów o dobrej rozpuszczalności w wodzie są następujące: temperatura 40 °C, stężenie α -amylazy = $9 \cdot 10^{-3} \text{ g/m}^3$, czas 60 min. W miarę upływu czasu biodegradacji CrES następuje wyraźne zmniejszenie jej ciężaru cząsteczkowego. Karbamoiloetylowane skrobie o małym ciężarze cząsteczkowym (po degradacji chemicznej lub enzymatycznej) charakteryzują się dobrze rozwiniętą, porowatą powierzchnią, ułatwiającą rozpuszczanie w wodzie w temp. 25 °C. Rozpuszczalne w wodzie CrES mogą znaleźć zastosowanie np. jako związki wychwytyjące wolny formaldehyd z wodnych roztworów żywic fenolowo-formaldehadowych oraz wychwytyjące metale ciężkie z zanieczyszczonych akwenów wodnych.



Rys. 8. Widmo FT-IR karbamoiloetylowanej skrobi po degradacji enzymatycznej (DS = 0,14)

Fig. 8. FT-IR spectrum of carbamoylethylated starch after enzymatic degradation (DS = 0.14)

LITERATURA

- Rupiński S., Brzozowski Z. K.: *Polimery* 2003, **48**, 122.
- Brzozowski Z. K., Pietruszka N., Galaev J., Mattiasson B.: *Polimery* 2000, **45**, 687.
- Sisi F. F. E., Abel-Hafiz S. A., Saleh A. R., Heneish A.: *Polym. Degrad. Stab.* 1998, **62**, 201.
- Lenz R. W.: *Adv. Polym. Sci.* 1993, **107** (Biopolymers I), 1.
- Jarowenko W.: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* 1970, t. 12, 787.
- Cooke T. F.: *J. Polym. Eng.* 1990, **9**, 171.
- Cone J. W., Tas U. A. C., Wolters M. G. E.: *Starch/Stärke* 1992, **44**, 55.
- Copinnet A., Bliard C., Onteniente J. P., Couturier Y.: *Polym. Degrad. Stab.* 2001, **71**, 203.
- Hebeish A., El-Rafie M. H., Sisi F. F. E., Abel-Hafiz S. A., Abel-Rahman A. A.: *Polym. Degrad. Stab.* 1994, **43**, 363.
- Painter T. J.: *Carbohydr. Res.* 1998, **179**, 259.
- Radley J. A.: „Starch Production Technology”, Applied Science Publishers, Londyn 1976, str. 481—542.
- Hebeish A., Abel Tholouth I., El-Kashouti M. A.: *J. Appl. Polym. Sci.* 1981, **26**, 171.
- Hebeish A., Abel Tholouth I., Ibrahim M. A., El-Zairy M. R.: *Starch/Stärke* 1985, **37**, 373.
- Khalil M. I., Beliakowa M. K., Aly A. A.: *Carbohydrate Polym.* 2001, **46**, 217.
- Fanta G. F., Burr R. C., Doanne W. M., Russell C. R.: *J. Appl. Polym. Sci.* 1977, **21**, 425.
- Noniewicz K., Brzozowski Z. K., Mazur J.: *Polimery* 1994, **39**, 726.
- Sisi F. F. E., Abel-Hafiz S. A., Saleh A. R., Hebeish A.: *Polym. Degrad. Stab.* 1998, **62**, 201.
- Ragheb A., Refai R., Abd El-Thalouth I., Hebeish A.: *Starch/Stärke* 1990, **42**, 420.
- Pat. USA* 3 033 852 (1962).
- Pat. USA* 3 101 330 (1963).
- Usmanov U., Kolesov S. N., Sodovnikova V. I., Beklitskii B. E.: *Dokl-Akad. Nauk Uzb. SSR* 1963, **20**, nr 3, 25.
- Mostafa Kh. M.: *Carbohydr. Polym.* 2003, **51**, 63.
- Khalil M. I., Bayazeed A., Frag S., Hebeish A.: *Starch/Stärke* 1987, **39**, 311.
- Hebeish A., Waly A., Abdel-Mohdy F. A., Aly A. S.: *Pigment Res. Technol.* 1997, **26**, nr 2, 88.
- Parovuori P., Hamunen A., Forssell P., Autio K., Potanen K.: *Starch/Stärke* 1995, **47**, 19.
- Demiante I. M., Dupuy N., Huvenne J. P., Cereda M. P., Wosiacki G.: *Carbohydr. Polym.* 2000, **42**, 149.
- Pat. USA* 2 928 827 (1960); *CA* 1960, **54**, 12 626d.
- Brzozowski Z. K.: *Żywn. Technol. Jakość* 1996, **2**, nr 7, 110.
- van Soest J. J. G., Vliegthart J. F. G.: *TIBTECH* June 1997, **15**, 208.
- Rupiński S., Brzozowski Z. K., Skwara K., Zatorski W.: *Przem. Chem.* 2003, **82**, 1157.

Otrzymano 28 X 2004 r.