

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

Akryloamidowe pochodne skrobi w układach dwufazowych służących do oczyszczania białek

Cz. II. ZASTOSOWANIE DO OCZYSZCZANIA INHIBITORA α -AMYLAZY Z MAKI PSZENNEJ^{***)}

ACRYLAMIDE DERIVATIVES OF STARCH IN TWO-PHASE SYSTEMS USED FOR PURIFICATION OF PROTEINS. Part II. THE USE FOR PURIFICATION OF THE WHEAT FLOUR DERIVED α -AMYLASE INHIBITOR

Summary — Preparation and properties of vinyl imidazole (VI)/vinyl caprolactam (VCL) copolymers and their complex compounds with copper(II) are described, which are capable of selectively separating some proteins in mixtures. The temperature of precipitation of these copolymers from aqueous solutions (Figs. 1–3) was studied in relation to the pH and NaCl content in the solution. A method was developed to prepare a Cu(II)—VI/VCL 10:90* complex able to form a two-phase system with starch acrylamide derivatives (APS) in the presence of NaCl. The two-phase system containing the Cu(II)—VI/VCL = 10:90* complex and an S/AA = 80:60 APS was found to help isolate a pure α -amylase inhibitor from wheat flour in 75% yield (Table 2). The acrylamide derivatives of starch were considered to be excellent cheap substitutes for expensive dextran and useful for the purification of various substances in aqueous two-phase systems.

Key words: VI/VCL copolymers, complexes with Cu(II), temperature of precipitation from aqueous solutions, two-phase systems, purification of α -amylase inhibitor.

Celem badań przedstawionych w niniejszym artykule było określenie możliwości zastosowania opracowanych przez nas akryloamidowych pochodnych skrobi (APS) [1] w układach dwufazowych służących do oczyszczania białka. Oczyszczane białko stanowił inhibitor α -amylazy z mąki pszennej, który ma ogromne znaczenie w medycynie, gdyż dezaktywując enzymatyczny katalizator (amylazę) hamuje hydrolizę zawartej w pożywieniu skrobi do glukozy. Inhibitor ten przyczynia się więc do kontroli poziomu cukrów we krwi u osób chorych na cukrzycę. Problem cukrzycy dotyczy szerokich mas społeczeństwa na całym świecie, stąd podjęcie takich badań wydawało się celowe.

W pierwszej części pracy [1] potwierdziliśmy przy-

datność APS do tworzenia układów dwufazowych z glikolem polioksyetylenowym (PEG 10 000) albo z termoczulymi (wytrącającymi się z roztworów wodnych w podwyższonej temperaturze) kopolimerami winyloimidazol/winylokaprolaktam (VI/VCL). Rolą APS było zastąpienie w układach dwufazowych dotychczas stosowanego dekstranu, którego znaczny koszt uniemożliwiało zastosowanie takich układów w większej skali. Użycie kopolimerów VI/VCL zamiast PEG pozwala na łatwiejsze oddzielenie produktów białkowych od resztek polimerów dzięki termicznemu wytrąceniu tych kopolimerów z roztworów wodnych. Obecność VI w kopolimerze VI/VCL umożliwia utworzenie z jonami Cu(II) połączeń kompleksowych zdolnych do selektywnego rozdzielania białek zawierających fragment histydynowy (np. właśnie inhibitora α -amylazy) spośród mieszaniny różnych białek [3]. Dokładne scharakteryzowanie możliwości i optymalnych warunków wykonywania kompleksów kopolimerów VI/VCL z miedzią we wspomnianych układach dwufazowych stanowi przedmiot tej części pracy.

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

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

^{***)} Cz. II por. [1].

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały

- *N*-winylo-kaprolaktam (VCL) cz. i 1-winylo-imidazol (VI) cz. — Aldrich-Chemie (Steinheim, Niemcy);
- Azo-*bis*-isobutyronitryl (AIBN) cz. — Polysciences, Inc. (Eppelheim, Niemcy);
- Siarczan miedzi (II) pięciowodny, cz. — Merck (Darmstadt, Niemcy);
- Akryloamid cz. — Bio-Rad Laboratories (Richmond, USA);
- Metanol cz. — KeboLab (Spånga, Szwecja);
- Skrobia ziemniaczana — Reppe AB (Växjö, Szwecja);
- Amylaza wieprzowa (typ VI-B, aktywność 23 jednostki/1 mg) — Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA);
- Kwas 3,5-dinitrosalicylowy cz. — Aldrich Chemical Company, Inc. (USA);
- Winian sodowo-potasowy cz. — ICN Biomedicals Inc. (Ohio, USA);
- Azydek sodu cz. — BDH AnalAR (UK);
- Chlorek sodu cz. — Merck (Darmstadt, Niemcy);
- Imidazol cz. — Merck (Darmstadt, Niemcy).

Metodyka pracy

Syntezę APS i kopolimerów VI/VCL, jak również sposób sporządzania diagramów fazowych opisano w [1].

Otrzymywanie kompleksów VI/VCL z jonami Cu(II)

Do 20 ml 1-proc. wodnych roztworów kopolimerów o stosunku VI/VCL wynoszącym 5/95, 10/90, 25/75 lub 50/50 wkraplano, intensywnie mieszając, 10 ml 0,05 M CuSO₄. Po dodaniu całej ilości CuSO₄ układ mieszano jeszcze przez 30 min w temperaturze pokojowej. W celu wytrącenia powstałych kompleksów, do mieszaniny poreakcyjnej wprowadzano 2 ml 4 M NaCl. Całość ogrzewano do temp. 70°C i filtrowano. Osady ponownie rozpuszczano w wodzie do uzyskania 1-proc. roztworu, wytrącano dodatkiem 2 ml 4 M NaCl, ogrzewano do temp. 70°C, filtrowano i suszono w temperaturze pokojowej.

Otrzymywanie stężonego roztworu kompleksu, oznaczonego symbolem Cu(II)-VI/VCL = 10/90

Do 20 g 20-proc. roztworu kopolimeru o stosunku VI/VCL = 10/90 dodawano w temperaturze pokojowej, intensywnie mieszając, 20 kropli (1,1136 g) 0,1 M CuSO₄. Po 30 minutach niezwiązany CuSO₄ usuwano metodą dializy. W ten sposób otrzymywano 18-proc. roztwór kompleksu Cu(II)-VI/VCL = 10/90.

Otrzymywanie inhibitora α -amylazy

W zlewce pojemności 500 ml umieszczano 150 ml 0,15 M NaCl i 50 g mąki pszennej. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 3 h, a następnie zawieszoną filtrowano i przesącz odwirowywano w ciągu 15

min (24 000 g). W celu dezaktywacji α - i β -amylazy, 100 ml przezroczystego filtratu ogrzewano przez 30 min w temp. 70°C, chłodzono i odwirowywano jak poprzednio. Do tak otrzymanego przezroczystego, surowego ekstraktu inhibitora α -amylazy dodawano kilka kropli 0,02-proc. roztworu azydku sodu i przechowywano go w temp. 4°C.

Otrzymywanie odczynnika barwiącego DNSA

W 50 ml wody rozpuszczano 1,0 g kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNSA); w roztworze tym rozpuszczano 30 g winianu sodowo-potasowego, dodawano 20 ml 2 M NaOH i całość rozcieńczano do objętości 100 ml.

Przygotowanie układu dwufazowego do rozdzielania białek

1 g 18-proc. wodnego roztworu kompleksu Cu(II)-VI/VCL = 10/90^{*} mieszano z 1 g 10-proc. roztworu APS o stosunku skrobia/akryloamid (S/AA) = 80/60, zawierającego 1% NaCl. Do tak otrzymanej mieszaniny dodawano 100 μ l ekstraktu inhibitora α -amylazy oraz 200 μ l 0,5-proc. roztworu NaCl. Całość intensywnie mieszano i pozostawiano do rozdzielania faz na ok. 4 h. Następnie pobierano próbkę górnej fazy układu; oznaczano ilość inhibitora α -amylazy.

Związany inhibitor ogrzewano następnie do temp. 70°C (nie powodującej denaturacji tego inhibitora), powstały osad odwirowywano, a następnie rozpuszczano w wodnym roztworze imidazolu. W ten sposób odtwarza się czysty kompleks Cu(II) z kopolimerem VI/VCL, zaś inhibitor α -amylazy łączy się z silniej kompleksującym imidazolem. Ogrzewając ponownie taki układ (zawierający połączenie inhibitor-imidazol oraz kompleks Cu(II) z kopolimerem VI/VCL) usuwa się kompleks, otrzymując połączenie inhibitor-imidazol. Przyłączony imidazol nie wywiera ujemnego wpływu na dezaktywującą amylazę działanie inhibitora, więc nie ma potrzeby jego usuwania [4].

Oznaczanie temperatury wytrącenia się kopolimerów VI/VCL z roztworów wodnych

Krzywe wytrącania się kopolimerów VI/VCL otrzymywano na podstawie pomiarów gęstości optycznej ich 0,1-proc. wodnych roztworów w różnej temperaturze. Stosowano do tego celu spektrofotometr firmy Shimadzu (Japonia) z termostatowanymi kuwetami (długość fali 470 nm). Na podstawie ustalonych wcześniej wzorcowych zależności między gęstością optyczną a zawartością wytrąconego polimeru uzyskiwano dane ilustrujące wpływ temperatury na zawartość wytrąconego polimeru.

Oznaczanie inhibitora α -amylazy

Aktywność inhibitora α -amylazy mierzono jako stopień inhibicji amylazy wieprzowej [2]. W czterech próbkach odważano odpowiednie ilości składników wzorcowych (tabela 1).

Wszystkie próbki utrzymywano przez 30 min w temp. 25°C, po czym do każdej z nich dodawano po 0,5

T a b e l a 1. Zestaw składników do oznaczania inhibitora α -amylazy

T a b l e 1. The components used to determine α -amylase inhibitor

| Numer próbki | Zawartość próbki |
|--------------|--|
| 1 | 0,5 ml buforu fosforanowego (pH 6,9) |
| 2 | 0,4 ml buforu fosforanowego (pH 6,9) + 0,1 ml 0,2-proc. roztworu amylazy |
| 3 | 0,3 ml buforu fosforanowego (pH 6,9) + 0,1 ml 0,2-proc. roztworu amylazy + 0,1 ml 20-krotnie rozcieńczonego wodą ekstraktu z mąki pszennej |
| 4 | 0,3 ml buforu fosforanowego (pH 6,9) + 0,1 ml 0,2-proc. roztworu amylazy + 0,1 ml próbki górnej fazy badanego układu dwufazowego |

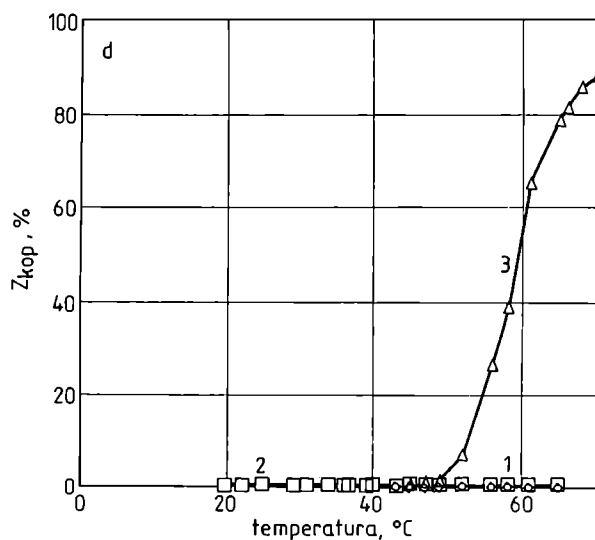
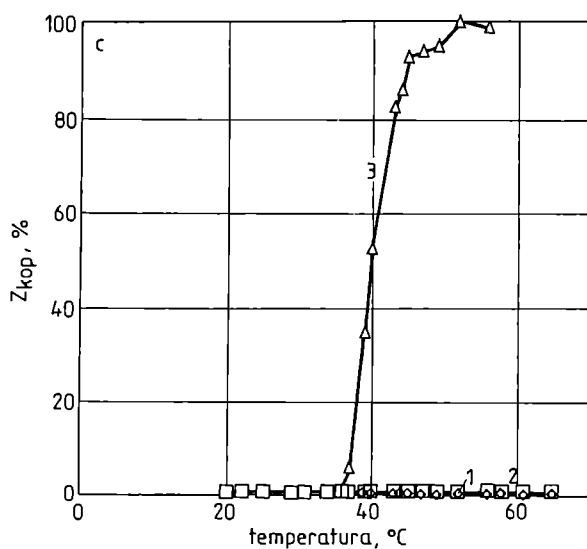
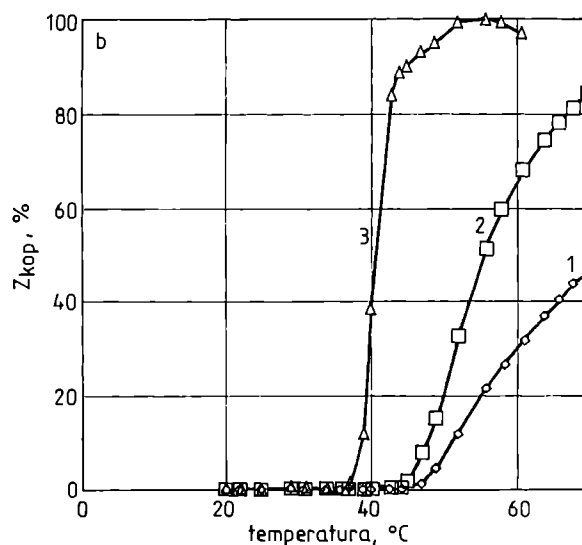
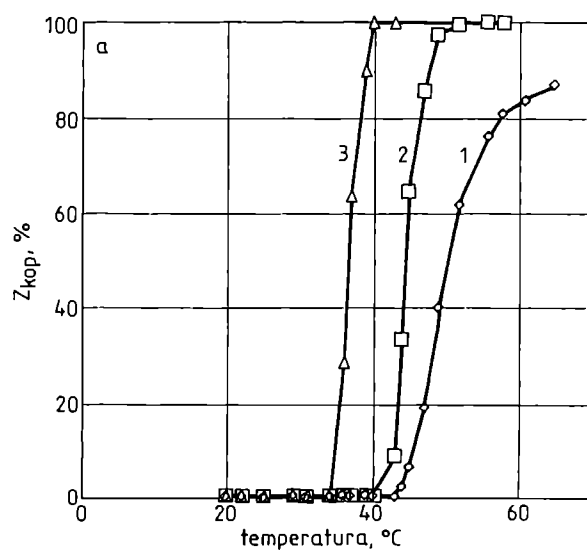
ml 1-proc. wodnego roztworu skrobi. Całość mieszano i pozostawiano w temp. 25°C jeszcze przez 3 min. Na-

stępnie do każdej próbki dodawano po 1 ml odczynnika barwiącego DNSA, zawartość próbek mieszano i wstawiano do łaźni z wrzącą wodą na okres 5 min; po tym czasie próbki chłodzono do temperatury pokojowej i rozcieńczano 10 ml wody. Wtedy mierzono absorbancję każdej z próbek przy 540 nm i obliczano w nich zawartość inhibitora α -amylazy, posługując się uprzednio sporządzoną krzywą wzorcową.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Kopolimery VI/VCL oraz ich kompleksy z miedzią — otrzymywanie i temperatura wytrącania

Zbadano wpływ środowiska (pH, zawartość NaCl) na temperaturę wytrącania się z roztworów wodnych kopolimerów VI/VCL oraz ich kompleksów z miedzią.



Rys. 1. Wpływ temperatury i pH na zawartość wytrąconych kopolimerów VI/VCL (Z_{kop}); stosunek VI/VCL: a) 5/95, b) 10/90, c) 25/75, d) 50/50; pH: 1) 4, 2) 6, 3) 8

Fig. 1. The effect of temperature and pH on the content of precipitated VI/VCL copolymers at VI/VCL ratios of (a) 5/95, (b) 10/90, (c) 25/75, (d) 50/50 and pH of (1) 4, (2) 6 and (3) 8

Było to konieczne, gdyż związki te selektywnie wiążą wybrane białka, które mają ograniczoną odporność na temperaturę i w zbyt wysokiej temperaturze ulegają nieodwracalnej denaturacji.

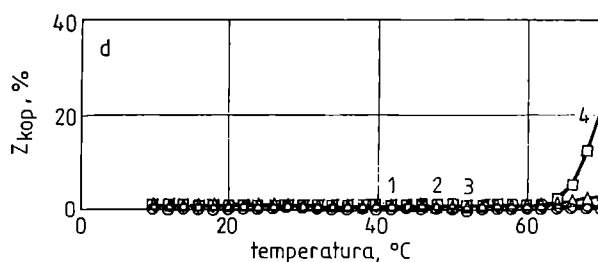
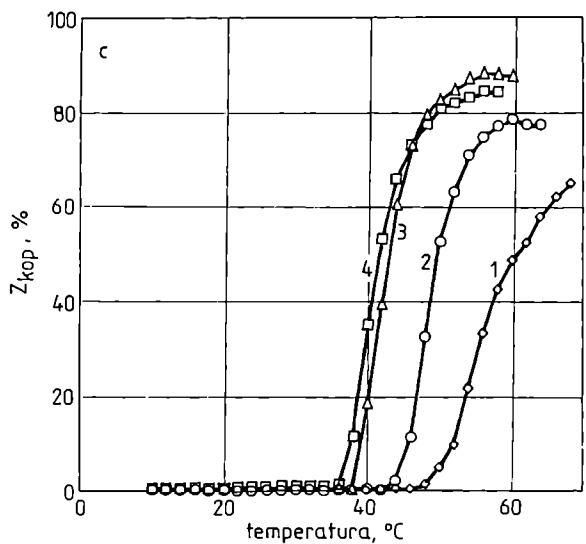
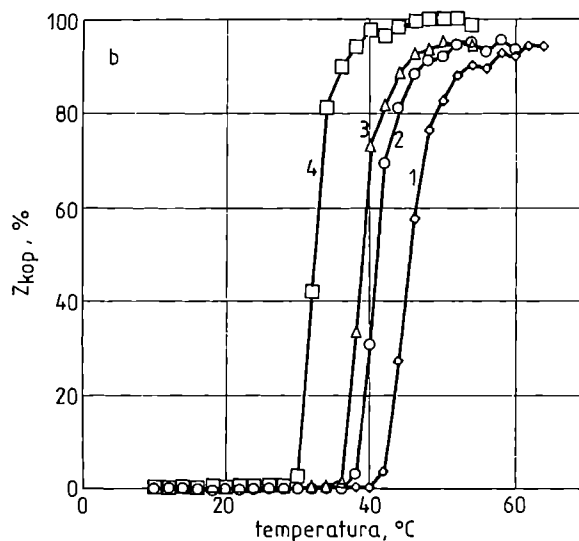
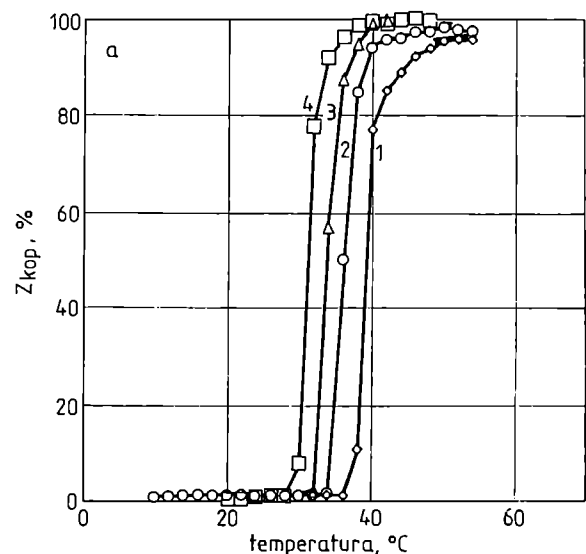
Mechanizm selektywnego wychwytywania białek zawierających fragmenty histydynowe, czyli np. inhibitora α -amylazy, z mieszaniny różnych białek polega na wiązaniu tych fragmentów za pośrednictwem kompleksów Cu(II) z kopolimerami VI/VCL.

Rysunki 1a–1d przedstawiają wpływ pH na przebieg zależności zawartości wytrącanego kopolimeru od temperatury. Zatem, im mniejsza wartość pH tym wyższa jest temperatura wytrącania. Kopolimery VI/VCL = 5/95 i VI/VCL = 10/90 (rys. 1a i 1b) wytrącają się w środowisku o pH 4–8 w zakresie temp. 35–70°C, a kopolimery VI/VCL = 25/75 i VI/VCL = 50/50 (rys. 1c i 1d) ulegają wytrącaniu wyłącznie z roztworu o pH = 8, odpowiednio w temp. 39–45 oraz 52–70°C.

Rysunek 2 ilustruje wpływ stężenia NaCl i temperatury na wytrącanie termiczne kopolimeru VI/VCL z roztworów wodnych o pH 6. Stosowaliśmy stężenia NaCl

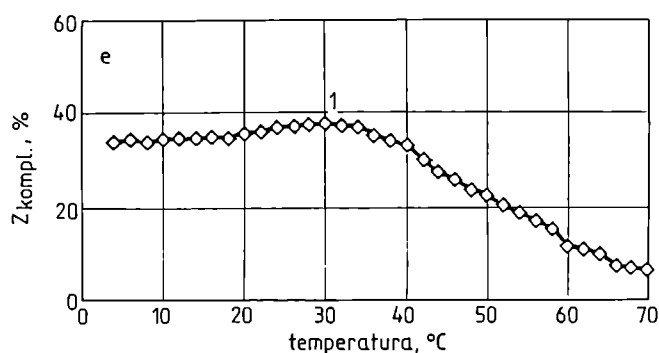
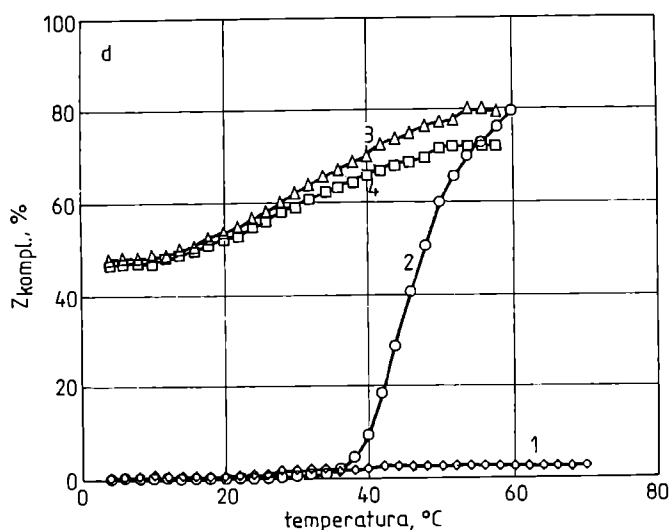
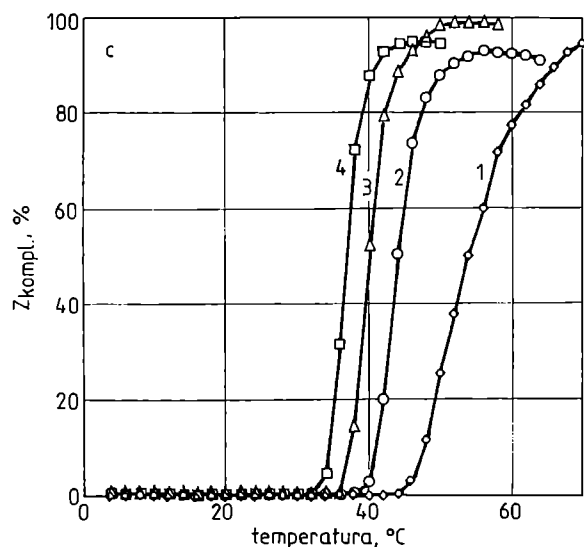
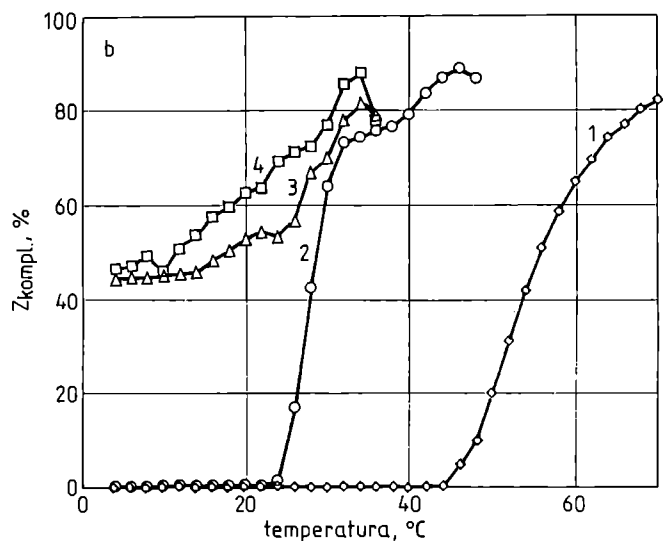
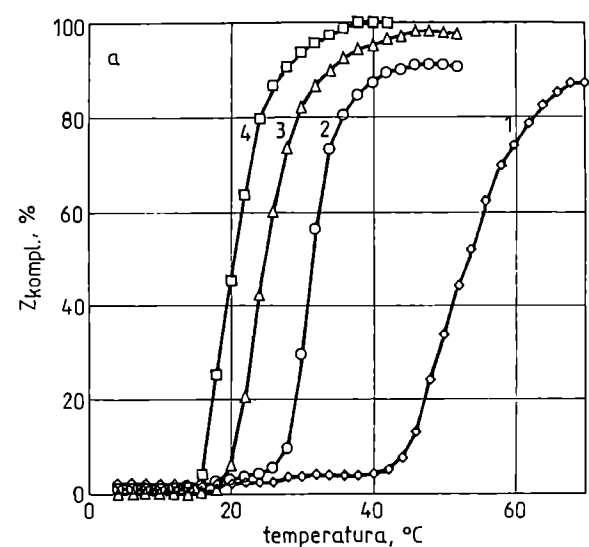
$\leq 1 \text{ mol/dm}^3$, ponieważ jest to górna granica stężeń soli stosowanych w biotechnologii. Wzrost stężenia NaCl do 1 mol/dm^3 powoduje obniżenie temperatury wytrącania (30–36°C w przypadku VI/VCL = 5/95 — rys. 2a oraz 30–37°C w przypadku VI/VCL = 10/90 — rys. 2b). Kopolimer VI/VCL = 25/75 wytrąca się w tych warunkach w temp. 40–50°C (rys. 2c), a VI/VCL = 50/50 dopiero w temp. 65–70°C, przy czym jest to wytrącenie niecałkowite — w temp. 70°C zawartość wytrąconego kopolimeru wynosi zaledwie 25% (rys. 2d).

Rysunek 3 przedstawia wpływ stężenia NaCl (0–0,5 mola/dm³) na wytrącanie termiczne kompleksów miedzi(II) z kopolimerami VI/VCL z roztworów wodnych o pH = 6. Obecność miedzi i wzrost jej stężenia obniża temperaturę wytrącania — kompleks z kopolimerem VI/VCL = 5/95 w obecności 0,5 mol/dm³ NaCl wytrąca się w temp. 18–28°C (rys. 3a, krzywa 4) a w przypadku kompleksów z kopolimerami VI/VCL = 10/90, VI/VCL = 25/75 i VI/VCL = 50/50 (rys. 3b, 3d, 3e) znaczna część produktu wytrąca się już w temp.



Rys. 2. Wpływ temperatury i stężenia NaCl na zawartość wytrąconych kopolimerów VI/VCL (Z_{kop}) z roztworów wodnych o pH = 6; stosunek VI/VCL jak na rys. 1; stężenie NaCl (mol/dm^3): 1) 0,1; 2) 0,3; 3) 0,5; 4) 1,0

Fig. 2. The effect of temperature and NaCl concentration on the content of precipitated VI/VCL copolymers from aqueous solutions at pH = 6 and VI/VCL ratios as in Fig. 1; NaCl concentrations (mol/dm^3): (1) 0.1, (2) 0.3, (3) 0.5, (4) 1.0



Rys. 3. Wpływ temperatury i stężenia NaCl na zawartość wytrąconych kompleksów miedzi z kopolimerami VI/VCL ($Z_{\text{kompl.}}$) z roztworów wodnych o $\text{pH} = 6$; stosunek VI/VCL w kopolimerach: a) 5/95, b) 10/90, c) 10/90*, d) 25/75, e) 50/50; stężenie NaCl (mol/dm^3): 1) 0; 2) 0,1; 3) 0,3; 4) 0,5

Fig. 3. The effect of temperature and NaCl concentration on the content of precipitated copper (II) complexes with VI/VCL copolymers from aqueous solutions at $\text{pH} = 6$, VI/VCL ratios: (a) 5/95, (b) 10/90, (c) 10/90*, (d) 25/75, (e) 50/50 and NaCl concentrations (mol/dm^3): (1) 0, (2) 0.1, (3) 0.3, (4) 0.5

$< 4^\circ\text{C}$. W przypadku tych trzech kompleksów można regulować temperaturę wytrącania zmieniając stężenie NaCl w odpowiednich granicach. Ostatni z nich, z kopolimerem VI/VCL = 50/50 w temp. ok. 30°C osiąga maksimum wytrącania; dalsze podwyższenie temperatury powoduje (w odróżnieniu od innych kompleksów) rozpuszczanie wytrąconego produktu. Specjalnie opracowany kompleks z kopolimerem VI/VCL = 10/90* (rys. 3c) wytrąca się w temp. $34\text{--}40^\circ\text{C}$ (w obecności NaCl).

Do otrzymania stosowanych do oczyszczania białek układów dwufazowych złożonych z APS oraz kompleksów Cu(II) z kopolimerami VI/VCL należało sporządzić ok. 20-proc. wodne roztwory tych składników odporne na obecność NaCl. Kompleks Cu(II) z kopolimerem VI/VCL = 50/50 jest całkowicie nierozpuszczalny w wodzie. Zmniejszanie zawartości VI w kopolimerze polepsza rozpuszczalność kompleksu w wodzie. Tak więc kompleks Cu(II) z kopolimerem VI/VCL = 25/75 łatwo rozpuszczał się w wodzie

wyłącznie w układach o pH < 5; ponieważ jednak reakcja selektywnego wiązania inhibitorem α -amylazy przez omawiane kompleksy przebiega wyłącznie w środowisku o pH powyżej 6, kompleks ten był bezużyteczny. Podobnie bezużyteczny okazał się kompleks Cu(II) z kompleksem VI/VCL = 10/90 otrzymany w typowy sposób: co prawda rozpuszczał się on w całym zakresie pH, ale już jego, z trudem otrzymany, 8-proc. roztwór okazał się zbyt lepki, a ponadto stężenie to było i tak zbyt małe (znacznie mniejsze od wymaganego 20-proc.), aby można go było zastosować do tworzenia układów dwufazowych z APS. Próby wykorzystania takiego 8-proc. roztworu poprzez dodanie NaCl w celu zmniejszenia koniecznych stężeń składników ewentualnego układu dwufazowego nie powiodły się, gdyż NaCl powodował wytrącanie się kompleksu z roztworu wodnego.

Do dalszych doświadczeń wybraliśmy kopolimer VI/VCL = 10/90 łatwo tworzący układ dwufazowy z APS (nawet w obecności NaCl). Wstępnie otrzymywaliśmy układ dwufazowy tego kopolimeru z APS w obecności 0,5% NaCl, a następnie wprowadzaliśmy Cu(II) w postaci CuSO₄. W większości przypadków nie powstawały układy dwufazowe, gdyż podczas wprowadzania CuSO₄ wytracał się osad. Tylko w jednym przypadku udało się uzyskać taki układ; zawierał on w górnej fazie kopolimer VI/VCL = 10/90 wraz z określoną ilością związanych jonów Cu(II) (mniejszą od ilości odpowiadającej całkowitemu nasyceniu miedzią kopolimeru), a w dolnej fazie znajdował się APS. W taki właśnie sposób otrzymywaliśmy kompleksy określonych ilości miedzi Cu(II) z kopolimerem VI/VCL = 10/90 (kompleksy VI/VCL = 10/90*, por. Część doświadczalna) używane z dobrym skutkiem do otrzymywania układów dwufazowych z APS (S/AA = 80/60).

Oczyszczanie białek

Sposób oczyszczania białek za pomocą badanych przez nas układów dwufazowych opisaliśmy w części

T a b e l a 2. Oczyszczanie inhibitora α -amylazy z mąki pszennej
T a b l e 2. Purification of the α -amylase inhibitor from wheat flour

| Etapy | Zawartość białek, mg | Aktywność specjalna, jednostka/mg białka | Wydajność % |
|--|----------------------|--|-------------|
| Początkowy ekstrakt | 0,29 | — | — |
| Ekstrakt po ogrzewaniu w temp. 70°C przez 30 min | 0,26 | 276 | 100 |
| Przesącz po wytrąceniu | 0,02 | 0 | 0 |
| Wymycie za pomocą 200 mM imidazolu | 0,15 | 360 | 75 |

doświadczalnej. Tabela 2 zawiera wyniki analizy próbek z różnych etapów oczyszczania inhibitora α -amylazy z mąki pszennej. Wydajność procesu oczyszczania wynosi 75% czystego inhibitora, którego aktywność wzrosła z początkowej wartości 276 do 360 jednostek/mg białka.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

— Wartość pH oraz stężenia NaCl silnie wpływają na temperaturę wytrącania się kopolimerów VI/VCL i ich kompleksów z miedzią z roztworów wodnych — maleje ona ze zwiększaniem tych wartości. Umożliwia to regulowanie tej temperatury na drodze odpowiedniego doboru stężenia NaCl i pH roztworu; jest to szczególnie ważne w przypadku oczyszczania substancji nieodpornych na podwyższoną temperaturę, takich jak białka.

— Wzrost zawartości VI w jego kopolimerze z VCL powoduje podwyższenie temperatury wytrącania, natomiast wzrost zawartości Cu(II) w kompleksie — jej zmniejszenie.

— Zastosowanie otrzymanych w typowy sposób kompleksów Cu(II) z kopolimerami VI/VCL do tworzenia układów dwufazowych z akryloamidowymi pochodnymi skrobi jest niemożliwe przede wszystkim ze względu na złą rozpuszczalność uniemożliwiająca uzyskanie ich wymaganych stężonych (20-proc.) roztworów wodnych. W związku z tym opracowaliśmy specjalny sposób otrzymywania kompleksu Cu(II)-VI/VCL = 10/90* zdolnego do utworzenia układów dwufazowych w obecności NaCl dzięki niecałkowitemu nasyceniu miedzią kopolimeru.

— Zastosowanie układu dwufazowego złożonego z kompleksu Cu(II)-VI/VCL = 10/90* i APS o składzie S/AA = 80/60 pozwala na oczyszczenie inhibitora α -amylazy z wydajnością 75%. Wydaje się więc, że akryloamidowe pochodne skrobi stanowią obiecujące polimery, które będą mogły znaleźć zastosowanie w biotechnologii do oczyszczania różnych substancji za pomocą układów dwufazowych.

LITERATURA

1. Brzozowski Z., Pietruszka N., Galaev I., Mattiasson B.: *Polimery* 2000, 45, nr 9.
2. Franco T., Galaev I., Hatto-Kaul R., Holmberg N., Bulow L., Mattiasson B.: *Biotechnol. Techn.* 1997, 11, nr 4, 231.
3. Kumar A., Galaev I., Mattiasson B.: *Biotechnol. Bioeng.* 1998, 59, nr 6, 695.
4. Albertson P.: "Partition of Cell Particles and Macromolecules", Wyd. 2, Almqvist & Wiksell, Sztokholm 1971.

Otrzymano 26 I 1999 r.