

RADIVOJE M. PRODANOVIĆ¹
 NENAD B. MILOSAVIĆ¹
 SLOBODAN M. JOVANOVIĆ²
 ZORAN M. VUJČIĆ¹

Univerzitet u Beogradu

¹Hemijski fakultet, Beograd

²Tehnološko-metalurški fakultet,
 Beograd

NAUČNI RAD

678-13+66.061-039.7:577.112.004.4

IMOBILIZACIJA INVERTAZE I GLUKOAMILAZE NA MAKROPOROZKOM KOPOLIMERU GLICIDILMETAKRILATA I ETILENGLIKOLDIMETAKRILATA I NJIHOVA POTENCIJALNA PRIMENA U BIOTEHNOLOGIJI

Određeni su optimalni uslovi za imobilizaciju invertaze i glukoamilaze preko njihove ugljenohidratne komponente u strukturi na makroporoznom kopolimeru glicidilmetakrilata i etilenglikoldimetakrilata. Dobijeni su imobilizati invertaze specifične aktivnosti od 5500 IU/g i glukoamilaze specifične aktivnosti od 1100 U/g. Specifična produktivnost cevastog protočnog reaktora sa imobilizovanom invertazom je bila 3,5 kg/dm³, a sa glukoamilazom 1,5 kg/dm³h. Operativna stabilnost imobilizovane invertaze tokom dvonedeljne upotrebe je procenjena na 290 dana, dok imobilizat glukoamilaze nije gubio aktivnost tokom 30 dana kontinuirane upotrebe. U 50% (v/v) etanolu imobilizovani enzimi su bili 10 puta stabilniji, u 25% (v/v) dioksanu preko 200 puta, dok u petrol etru nisu gubili aktivnost ni posle 3 dana.

Primena enzima kao katalizatora u industriji ima nekoliko prednosti u odnosu na klasičnu hemijsku katalizu. Enzimi većinom imaju visoku specifičnost, tako da nema sporednih reakcija. Reakcije katalizovane enzimima se odvijaju u blagim reakcionim uslovima, na niskim temperaturama i pritiscima, pa troše manje energije u proizvodnji. Upotreba enzima smanjuje zagađenje životne sredine, jer su enzimi biodegradabilni. Enzimi imaju i nekoliko nedostataka od kojih su najvažniji visoka cena i mala stabilnost u odnosu na konvencionalne katalizatore [1,2].

Da bi se povećala stabilnost enzima, omogućilo višestruko korišćenje, a time smanjio udeo cene enzima u krajnjoj ceni proizvoda, enzimi se imobilizuju na čvrstoj fazi. Imobilizacija olakšava prečišćavanje dobijenog proizvoda od biokatalizatora i najčešće stabilizuje enzim, tako da se duže zadržava njegova katalitička moć tokom upotrebe tj. povećava mu se operativna stabilnost.

Čvrste faze (nosači) koje se koriste za imobilizaciju enzima moraju da imaju odgovarajuću mehaničku i biološku stabilnost, tako da se ne menjaju tokom reakcije. Da bi posedovali veliku aktivnost u uslovima heterogene katalize neophodno je i da imaju veliku dostupnu površinu po jedinici mase.

Danas se za imobilizaciju enzima koriste neporozni i porozni nosači. Neporozni nosači se sastoje od sitnih čestica, prečnika nekoliko mikrometara, tako da imaju veliku aktivnu površinu po jedinici mase. Enzim se imobilizuje na samoj površini čestica, pa je difuzija supstrata ka enzimu tokom katalize olakšana. Međutim, veliki nedostatak ove grupe nosača, predstavlja nemogućnost korišćenja u protočnom cevastom reaktoru i njihovo teško izdvajanje iz reakcione smese, što je direktna posledica veličine čestica. Kod makroporoznih nosača, čestice su prečnika nekoliko stotina mikrometara, a povr-

šina za imobilizaciju enzima se najvećim delom nalazi u unutrašnjosti čestica. Makroporozni nosači moraju da imaju unutrašnju morfologiju koja obezbeđuje, ne samo veliku površinu po jedinici mase nosača, nego i laku dostupnost unutrašnje površine molekulima supstrata i enzima. Zbog toga su veličina pora na česticama i unutrašnja morfologija čestica, izuzetno važne za osobine imobilizovanog enzima. Porozni nosači, mogu imati široku ili usko definisanu distribuciju veličine pora. Kod široke distribucije pora, samo će mali broj pora biti dostupan i supstratu i molekulima enzima. Zbog toga se koriste nosači sa strogo definisanom veličinom pora, koje nije uvek lako sintetisati.

Do sada su razvijeni postupci za sintezu nekoliko tipova makroporoznih nosača sa strogo definisanom veličinom pora. Od neorganskih nosača, koriste se makroporozni silikati (silicijum dioksid i staklo). Dobre osobine ovih nosača su visoka mehanička i termalna stabilnost, a loše osobine su im postojanje samo hidrosilnih grupa na površini nosača i nestabilnost u baznim sredinama iznad pH 8. Makroporozni nosači napravljeni od polisaharida biljnog i životinjskog porekla su lako dostupni i imaju potrebnu unutrašnju poroznost. Međutim, veliku manu ovih nosača predstavlja njihova loša mehanička stabilnost i biodegradabilnost.

Makroporozni nosači koji imaju dobru poroznost, koja se može kontrolisati pri sintezi i visoku mehaničku i biološku stabilnost su polimeri na bazi stirena i glicidilmetakrilata. Makroporozni polistiren je do sada najčešće korišćeni polimer za imobilizaciju enzima, zbog svoje dostupnosti i niske cene (10 \$/kg). Ipak se u poslednjih nekoliko godina glicidilmetakrilatni polimeri sve više ispituju kao potencijalni nosači za imobilizaciju enzima. Razlozi za to leže u većoj hidrofilnosti od polistirenskih polimera, što je izuzetno važno za enzimsku stabilnost i postojanju funkcionalne epoksidne grupe, koja obezbeđuje širok spektar mogućnosti za imobilizaciju enzima pri različitim uslovima [3].

Metode koje se koriste za imobilizaciju enzima, moraju da obezbede vezivanje velikih količina enzima za

Adresa autora: R.M. Prodanović, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Studentski trg 16, 11000 Beograd
 Rad prihvaćen: Oktobar 14, 2003

nosač, a da inaktivacija enzima bude minimalna. U industriji se enzimi najčešće imobilizuju (preko svojih amino grupa) vezivanjem za nosač prethodno aktiviran glutaraldehidom. Dobijena veza je stabilna, ali usled reakcije u kojoj učestvuju i amino grupe iz aktivnog mesta enzima, dolazi do delimične inaktivacije enzima. Enzimi koji u svojoj strukturi poseduju i ugljene hidrate mogu se vezati za nosač "aktiviranjem" ugljenohidratne komponente, npr. oksidovanjem perjodatom [4]. Prilikom imobilizacije ovom metodom, ne dolazi do inaktivacije enzima, zato što u samoj reakciji ne učestvuje proteinski deo molekula enzima koji poseduje katalitičku aktivnost. I pored svih ovih dobrih osobina, ova metoda nije mnogo primenjivana u industriji za imobilizaciju glikozilovanih enzima.

Glikozidaze se u industriji koriste za hidrolizu polisaharida i oligosaharida. Ispituje se i njihova primena u sintezi glikozida različitih fiziološki aktivnih supstancija [5]. Tako se invertaza koristi za proizvodnju invertnog šećera [6] i ispituje se njena primena u sintezi polifruktozida u organskim rastvaračima [7]. Glukoamilaza se koristi u industrijskoj hidrolizi skroba, pri proizvodnji glukoze i visokofruktoznog sirupa [8]. Ispituje se i njena aktivnost u organskim rastvaračima [9] i mogućnost primene u sintezi alkil glukoazida [10].

U našem radu smo ispitali mogućnost korišćenja, kao nosača za imobilizaciju enzima, makroporoznog kopolimera glicidil-metakrilata (GMA) i etilenglikoldimetakrilata (EGDMA), sintetisanog u našim laboratorijama [3]. Odredili smo optimalne parametre imobilizacije invertaze i glukoamilaze, u pogledu metode imobilizacije, količine dodatog enzima i vremena imobilizacije. Dobijeni imobilizovani enzimi su dalje okarakterisani u pogledu primene za hidrolizu saharoze i hidrolizata skroba, kao i u pogledu stabilnosti u organskim rastvaračima.

EKSPERIMENTALNI DEO

Materijal i hemikalije

Invertaza je prečišćena iz pekarskog kvasca hromatografijom na DEAE Sephadex-u i Sephadex-u G 200 [6]. Liofilizovani enzim je imao specifičnu aktivnost od 250 IU/mg. Polazni materijal iz kog je glukoamilaza liofilizovana je bio komercijalni preparat AG 300L firme Mapol Warszawa. Glukoamilaza korišćena za hidrolizu skroba je prethodno dijalizovana i liofilizovana (210 U/g), dok ona koja je korišćena za ispitivanje stabilnosti u organskim rastvaračima je delimično prečišćena na Sephadex-u G200 (240 U/g).

Glicidil metakrilat i etilenglikoldimetakrilat su bili od firme Rohm-Darmstadt iz Nemačke. Hidrolizat skroba DE (dekstrozni ekvivalent) vrednosti 50 je bio od firme Jabuka iz Pančeva. Sve druge hemikalije su bile od firme Merck, Nemačka.

Sinteza kopolimera

Makroporozni kopolimer GMA i EGDMA, koji je korišćen kao nosač za imobilizaciju enzima je sintetizovan

suspensionom kopolimerizacijom i okarakterisan na uobičajeni način [3]. Pre imobilizacije enzima, kopolimer je modifikovan 4 časa 1 M 1,2-diaminoetanom pri temperaturi od 60°C i pH 10.

Imobilizacija enzima

Enzimi (1 mg/cm³) su oksidovani 5 mM perjodatom, 6 h u mraku, pri temperaturi od 4°C i pH 5,0 [11]. Jedan deo modifikovanog kopolimera je reagovao sa oksidovanim enzimom u natrijum-acetatnom puferu, 48 časova, pri temperaturi od 4°C i pH 5,0. Drugi deo modifikovanog kopolimera, je prvo modifikovan sa 2 zapremine 2% (m/v) glutaraldehida u natrijum-fosfatnom puferu, 2 sata pri temperaturi od 25°C i pH 8. Zatim je ispran tri puta sa po pet zapremina istog pufera. Modifikovani kopolimer je reagovao sa nativnim enzimom u natrijum-fosfatnom puferu, 48 časova pri temperaturi od 4°C i pH 7,0.

Posle reakcije imobilizacije, kopolimer je ispran 3 puta sa pet zapremina 1 M NaCl i čuvan u natrijum-acetatnom puferu na pH 5 i 4°C do upotrebe.

Merenje enzimske aktivnosti

Imobilizovani enzimi (5–20 mg) su dodavani u 5 cm³ 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,0 sa 10% (m/v) saharozom u slučaju invertaze ili sa 4% (m/v) rastvornim skrobom u slučaju glukoamilaze. Reakcija se odvijala pri konstantim mešanjem od 5 do 10 min. Redukujući šećeri su određivani dinitrosalicilnim reagensom. 1 U je ona količina enzima koja katalizuje nastanak 1 μmol glukoze za 1 minut na 25°C (za invertazu, IU), odnosno 40°C (za glukoamilazu, U) na pH 5,0.

Vezana količina enzima je određivana iz razlike u količini enzima u rastvoru pre i posle reakcije sa kopolimerom. Prinos imobilizacije je količnik specifične aktivnosti imobilizata i vezane aktivnosti po jedinici mase kopolimera.

Karakterizacija imobilizata

pH optimum je određivan merenjem enzimske aktivnosti u 50 mM natrijum-citratno-fosfatnom puferu odgovarajućeg pH sa 50 mM KCl. Temperaturni optimum je određen merenjem enzimske aktivnosti na standardni način na različitim temperaturama. Michaelis-Mentenova konstanta (K_m) je određena merenjem enzimske aktivnosti u rastvorima supstrata različitih koncentracija u 50 mM natrijum-acetatnom puferu, pri temperaturi od 25°C i pH 5,0. Dobijeni podaci su linearizovani Lineweaver-Burk-ovom metodom.

Reaktor sa pakovanim slojem

Eksperimenti su rađeni u termostatiranom staklenom reaktoru zapremine 10 cm³ na 40°C. Rastvori supstrata su zagrejeni na 40°C pre uvođenja u kolonu i pumpani kroz kolonu peristaltičkom pompom. Po uspostavljanju ravnotežnog stanja, određena je koncentracija

cija redukujućih šećera. Stepenn hidrolize (DE) predstavlja količnik koncentracije redukujućih šećera i koncentracije ukupnih saharida.

Stabilnost u organskom rastvaraču

Imobilizovani enzimi su inkubirani u odgovarajućem organskom rastvaraču pri temperaturi od 25°C. U određenim vremenskim intervalima uziman je deo suspenzije imobilizata (10–20 mg imobilizata) i ispran je 5 puta sa po 5 zapremina 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,0. Nakon toga je određivana aktivnost imobilizovanog enzima.

U slučaju rastvornog enzima pomešana je odgovarajuća količina vodenog rastvora enzima i organskog rastvarača. Rastvor je promešan i inkubiran na 25°C. U određenim vremenskim intervalima uzimani su alikvoti enzima i razblaženi 100 puta sa 50 mM natrijum-acetatnim puferom pH 5,0. Nakon toga određivana je enzimska aktivnost u razblaženju.

REZULTATI I DISKUSIJA

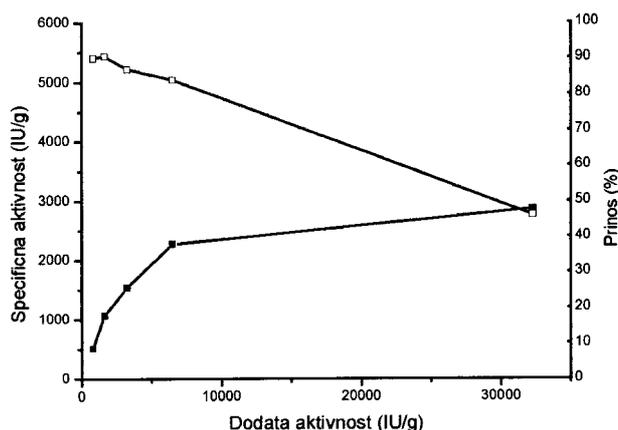
Sinteza kopolimera

Dobijene čestice kopolimera su prosejane kroz sita i korišćene su one dijametra od 150 µm do 450 µm. Izmenom sastava reakcione smeše i uslova kopolimerizacije mogu se dobiti uzorci [poli(GMA-co-EGDMA)] sa različitim karakteristikama. U okviru ovoga rada korišćena su dva uzorka poli(GMA-co-EGDMA), čije su osnovne karakteristike prikazane u tabeli 1.

Imobilizacija enzima

Da bi odredili optimalnu količinu enzima koji treba naneti na kopolimer, varirali smo količinu nanetog enzima i određivali specifičnu aktivnost dobijenog imobilizata i prinos imobilizacije. Prilikom imobilizacije invertaze aktivacijom kopolimera glutaraldehidom, sa povećanjem količine dodatog enzima povećavala se i specifična aktivnost imobilizata do određenog platoa. Prinos imobilizacije se sa povećanjem količine dodatog enzima po gramu polimera smanjivao, tako da optimalna količina u ovom slučaju predstavlja oko 20000 U nanetog enzima po 1 g kopolimera, kada se dobija specifična aktivnost od 2500 IU/g i prinos od 60%, slika 1.

Dobijena aktivnost je dvostruko veća od najviše nama poznate literaturne vrednosti na drugim makroporoznim polimerima [12].



Slika 1. Zavisnost specifične aktivnosti i prinosa imobilizacije od količine dodatog enzima, pri imobilizaciji invertaze aktivacijom SGE 10/12 glutaraldehidom. ■ – specifična aktivnost imobilizata, □ – prinos imobilizacije.

Figure 1. Dependence of the specific activity and yield of immobilization on the amount of added enzyme in the immobilization of invertase by activating SGE 10/12 by glutaraldehyde ■ – specific activity, □ – yield of immobilization.

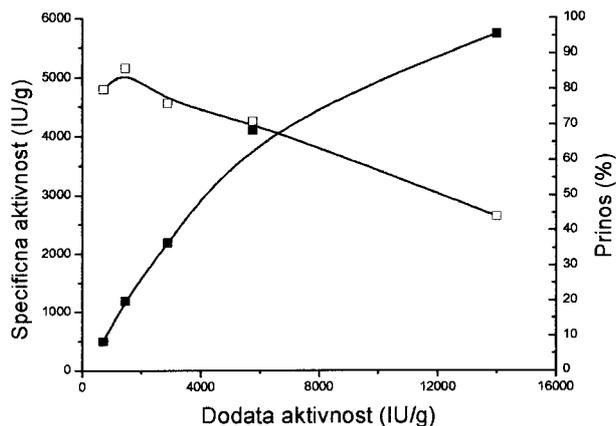
Isti postupak smo ponovili u imobilizaciji invertaze na kopolimer oksidacijom sa perjodatom. Dobijen je identičan oblik krive, sa tom razlikom, da je dobijena specifična aktivnost imobilizata bila dva puta veća. Tako je za količinu nanete invertaze od 14000 IU/g dobijena specifična aktivnost od 5500 IU/g i prinos imobilizacije od 50 %, slika 2.

Dobijena specifična aktivnost imobilizovane invertaze je 4 puta veća od najveće nama literaturno poznate (na makroporoznim polimerima), jer imobilizacijom invertaze nakon perjodatne oksidacije, ne dolazi do inaktivacije enzima. Prilikom imobilizacije se vezalo više od 90% dodate enzimске aktivnosti [13], što je posledica produženja vremena reakcije oksidovane invertaze sa kopolimerom sa 2 h koji se pominju u literaturi [11] na 48 h. Prinosi imobilizacije su odgovarali u svim slučajevima do sada opisanim u literaturi [12].

Da bi proverili da li se ova metoda može primeniti i na drugom glikoproteinu osim invertaze, ponovljen je isti set eksperimenata sa glukoamilazom, koja u svojoj strukturi ima nešto manje ugljenih hidrata (25%) u odnosu na invertazu (50%). Dobijena je slična zavisnost specifične aktivnosti i prinosa imobilizacije od količine nanetog enzima. Prilikom imobilizacije glukoamilaze aktivacijom kopolimera glutaraldehidom, za optimalnu količinu nanetog enzima od 160 mg po 1 g kopolimera,

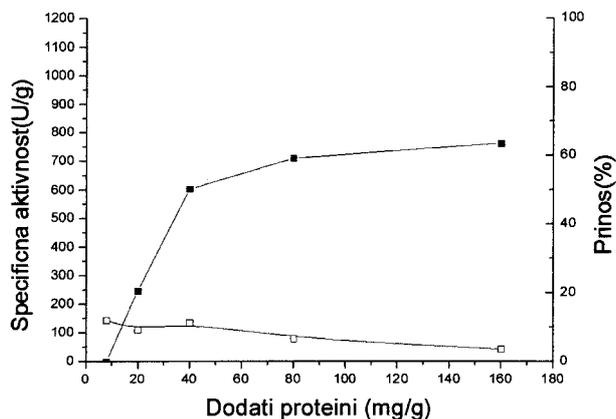
Tabela 1. Osnovne karakteristike uzoraka poli(GMA-co-EGDMA) koji su korišćeni u ovome radu
Table 1. Properties of poly(GMA-co-EGDMA) used in this study

Oznaka uzorka	Specifična površina (m ²)	Zapremina pora (cm ³ /g)	Poroznost polimera (%)	Dijametar pora (nm)	Koncentracija epoksidnih grupa (mmol/g)	Koncentracija amino grupa (mmol/g)
SGE 10/12	50	0,610	42	53	2,08	1,18
SGE 15/16	34	1,020	55	200	2,48	0,37



Slika 2. Zavisnost specifične aktivnosti i prinosa od količine dodatog enzima pri imobilizaciji invertaze oksidovane perjodatom na SGE 10/12. ■ – specifična aktivnost imobilizata, □ – prinos imobilizacije.

Figure 2. Dependence of the specific activity and yield on the amount of enzyme added in the immobilization of invertase via a carbohydrate moiety on SGE 10/12. ■ – specific activity, □ – yield of immobilization.



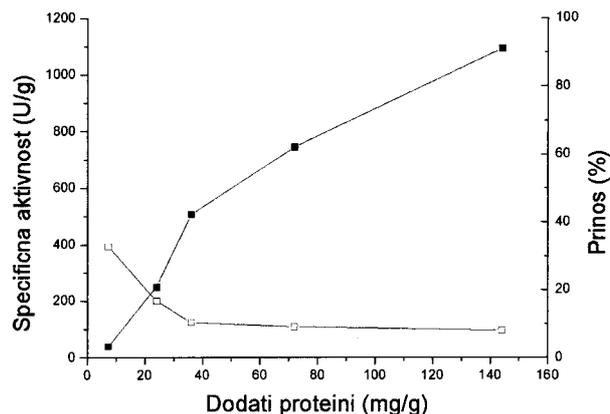
Slika 3. Zavisnost specifične aktivnosti i prinosa od količine dodatog enzima, pri imobilizaciji glukoamilaze na SGE 10/12 aktiviran glutaraldehidom. ■ – specifična aktivnost imobilizata, □ – prinos imobilizacije.

Figure 3. Dependence of the specific activity and yield on the amount of added enzyme in the immobilization of glycoamylase on SGE 10/12 activated by glutaraldehyde. ■ – specific activity, □ – yield of immobilization.

dobijena je specifična aktivnost od 750 IU/g sa prinosom imobilizacije od 5 %, slika 3.

Prilikom imobilizacije glukoamilaze oksidovane perjodatom, kao i u slučaju invertaze dobijene su skoro dva puta veće specifične aktivnosti. Tako je za optimalnu količinu dodatog enzima od 140 mg po 1 g kopolimera, dobijena specifična aktivnost od 1100 IU/g, sa prinosom imobilizacije od 10%, slika 4.

Svi ovi rezultati ukazuju na to da u obadva slučaja, prilikom imobilizacije enzima oksidovanog perjodatom, dolazi do manje denaturacije enzima nego kod imobilizacije enzima aktivacijom kopolimera glutaraldehidom. Činjenicom da perjodatno oksidovani enzim u svojoj strukturi poseduje i amino i aldehidne grupe, te na taj



Slika 4. Zavisnost specifične aktivnosti i prinosa od količine dodatog enzima, pri imobilizaciji glukoamilaze oksidovane perjodatom na SGE 10/12. ■ – specifična aktivnost imobilizata, □ – prinos imobilizacije.

Figure 4. Dependence of the specific activity and yield on the amount of added enzyme in the immobilization of glucoamylase via a carbohydrate moiety on SGE 10/12. ■ – specific activity, □ – yield of immobilization.

način predstavlja bifunkcionalni reagens čiji molekuli mogu međusobno da se umrežavaju i imobilizuju na već imobilizovan sloj enzima na nosaču (nadslojevanje), može se objasniti vezivanje celokupne količine nanetog enzima [13]. Dobijeni efekat dolazi do izražaja ukoliko se enzim imobilizuje više dana, a ne 2 časa kako je opisano u literaturi [10].

U daljem radu su korišćeni imobilizati invertaze i glukoamilaze dobijeni imobilizacijom enzima oksidovanog perjodatom, specifične aktivnosti od 5500 IU/g za invertazu i 1100 U/g za glukoamilazu.

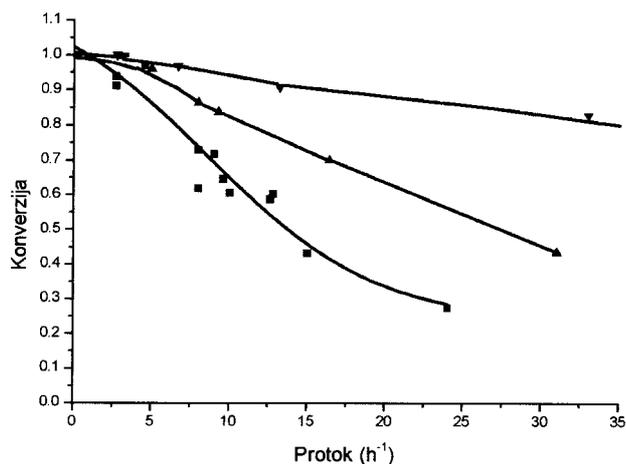
Merenjem zavisnosti specifične aktivnosti imobilizata od pH vrednosti sredine, utvrđeno je da oba enzima imaju pH optimum između 4 i 5, što se ne razlikuje od nativnih oblika enzima.

Temperaturni optimum imobilizovane invertaze je bio na 60°C, što se ne razlikuje od nativnog oblika enzima, ali je na višim temperaturama primećena povećana termostabilnost imobilizata invertaze [4]. Temperaturni optimum glukoamilaze je bio na 70°C što je za 5°C više od nativnog oblika enzima.

K_m invertaze za saharozu je bila 43 mM, što je viša vrednost u odnosu na nativan enzim ($K_m=29$ mM). Kod glukoamilaze je K_m za skrob bila 1,2% (m/v) što je opet viša vrednost u odnosu na nativan enzim (0,2%). Povišene vrednosti za K_m se mogu objasniti difuzionim ograničenjima, koji se javljaju kod reakcija katalizovanim enzimima imobilizovanim na makroporoznim polimerima [4].

Karakterizacija imobilizata u protočnom cevastom reaktoru

Da bi ispitali, da li se imobilizati dobijeni oksidacijom enzima perjodatom mogu koristiti za hidrolizu saharida u protočnom cevastom reaktoru, ispitali smo



Slika 5. Zavisnost stepena konverzije saharoze od protoka (h^{-1} – broj zapremina reaktora na sat) na $40^{\circ}C$ u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5 u reaktoru zapremine 1 cm^3 , pri različitim koncentracijama saharoze. ■ – $2,5\text{ M}$ saharoza, ▲ – $2,0\text{ M}$ saharoza, ▼ – $1,5\text{ M}$ saharoza.

Figure 5. Dependence of the degree of conversion on the flow rate at various substrate concentrations, at $40^{\circ}C$ in 50 mM sodium-acetate buffer pH 4.5, and reactor volume 1 mL . ■ – $2,5\text{ M}$ sucrose, ▲ – $2,0\text{ M}$ sucrose, ▼ – $1,5\text{ M}$ sucrose.

zavisnost stepena konverzije (hidrolize) saharida na izlazu reaktora od protoka kroz reaktor.

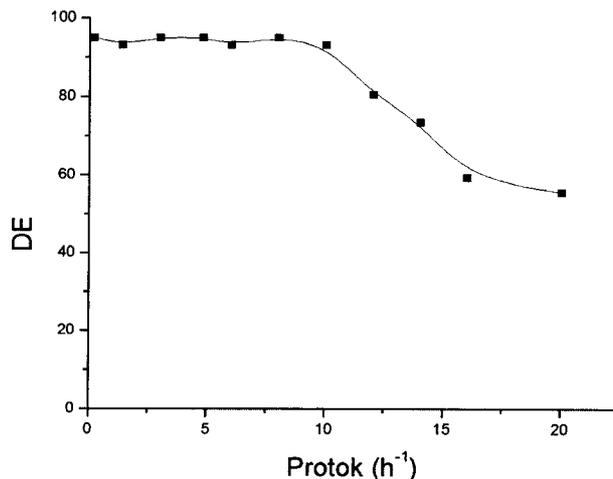
U slučaju invertaze zadovoljavajući stepen konverzije je preko 90%. Ovaj stepen konverzije za $2,5\text{ M}$ saharozu je dobijen pri protoku do 4 zapremine reaktora na sat (h^{-1}), što je do sada najbolji nama poznat rezultat u literaturi [12]. Konverzija od 90% za $2,0\text{ M}$ i $1,5\text{ M}$ saharozu dobijena je pri protocima od $6,5$ odnosno $14,5\text{ h}^{-1}$, slika 5.

Specifična produktivnost reaktora pri 90% konverziji za ove tri koncentracije rastvora saharoze iznosi $3,5$; $4,3$ i $7,2\text{ kg/dm}^3\text{h}$ respektivno.

U slučaju glukoamilaze zadovoljavajući stepen hidrolize (dekstrozni ekvivalent, DE) je preko 95%. Glukoamilaza je pokazivala stepen konverzije preko 95% sve do protoka od 10 h^{-1} , slika 6.

Specifična produktivnost reaktora za protok od 10 h^{-1} iznosi $1,9\text{ kg/dm}^3\text{h}$, što predstavlja najvišu vrednost nama poznatu iz literature [14]. Treba reći, da se većina literarnih podataka o hidrolizi skroba imobilizovanom glukoamilazom odnosi na razblažene rastvore. Kod koncentrovanih rastvora skroba, do izražaja dolaze difuziona ograničenja zbog čega se dobijaju manje DE vrednosti u odnosu na rastvoran enzim. Ovde izuzetno važnu ulogu ima veličina čestice korišćenog polimera, jer se za čestice veličine ispod $400\text{ }\mu\text{m}$ mogu dobiti DE vrednosti kao kod rastvornog enzima [15]. Stoga su u toku dalja ispitivanja imobilizata glukoamilaze, koja za cilj imaju preciznije određivanje DE vrednosti i optimizaciju veličine korišćenih čestica polimera, da bi imobilizovani enzim bio efikasan kao i rastvoran.

Da bi proverili da li su imobilizati dovoljno stabilni za dugotrajnu upotrebu u hidrolizi saharoze i skroba, ko-



Slika 6. Zavisnost dekstroznog ekvivalenta u hidrolizi 20% (m/m) industrijskog hidrolizata skroba od protoka (h^{-1} – broj promena zapremina reaktora na sat) na $40^{\circ}C$ u 50 mM natrijum-acetatnom puferu pH 4,5 u reaktoru zapremine 1 cm^3 .

Figure 6. Dependence of the degree of conversion on the flow rate for the hydrolysis of 20% (w/w) industrial starch hydrolysate, at $40^{\circ}C$ in 50 mM sodium-acetate buffer pH 4.5, and reactor volume 1 cm^3 .

rišćeni su više nedelja. Prilikom dvonedeljne upotrebe imobilizata invertaze pri protoku od 3 h^{-1} i temperaturi od $40^{\circ}C$, dobijen je poluzivot od 290 dana. Imobilizat glukoamilaze tokom 30 dana upotrebe, pri protoku od 10 h^{-1} i temperaturi od $40^{\circ}C$ nije gubio svoju aktivnost.

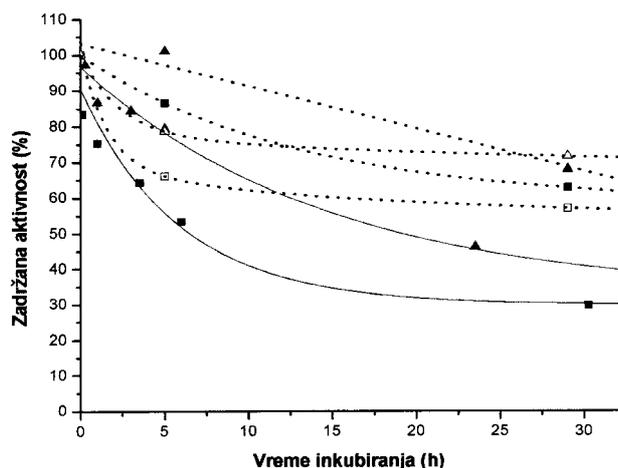
Svi dobijeni rezultati ukazuju, da se naši imobilizati invertaze i glukoamilaze, mogu upotrebiti u protočnim reaktorima u industriji, za hidrolizu saharoze i hidrolizata skroba čija je DE vrednost 50%.

Stabilnost imobilizata u organskim rastvaračima

Za ispitivanje mogućnosti primene imobilizovane invertaze i glukoamilaze u organskim rastvaračima za sintezu glikozida, korišćen je i imobilizat enzima na kopolimeru veličine pora od 200 nm (SGE 15/16). Cilj je bio da se utvrdi da li veličina pora utiče na stabilnost enzima u organskim rastvaračima. Svi korišćeni imobilizati su dobijeni imobilizacijom na kopolimeru enzima oksidovanih perjudatom.

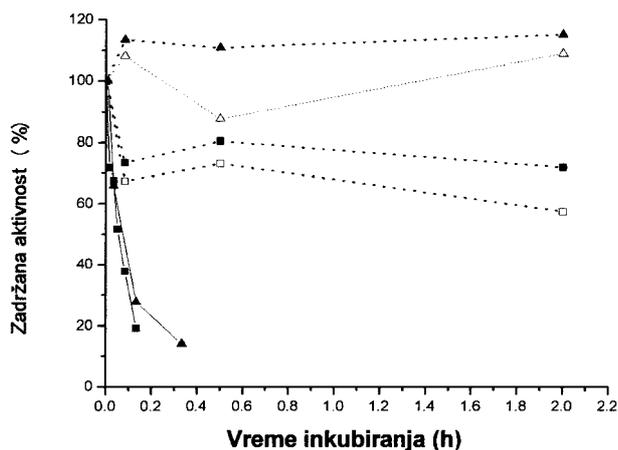
Nativni enzimi su u 50% (v/v) etanolu posle 30 h izgubili oko 60% od polazne aktivnosti. Imobilizovani oblici ovih enzima su tokom istog perioda izgubili od 30 do 40% polazne aktivnosti, slika 7.

Imobilizati su pokazali veću stabilnost u odnosu na rastvorne enzime, dok veličina pora na kopolimeru u ovom opsegu od 53 do 200 nm , nije u većoj meri uticala na stabilnost enzima. Ovo je u skladu sa literarnim podacima gde se uticaj na stabilnost enzima očekuje pri veličini dijametra pora od oko 20 nm [15]. U 25% -nom dioksanu nativni oblici su gubili 50% polazne aktivnosti već posle 3 minuta, dok su imobilizovani enzimi pokazali izuzetno veliku stabilnost, tako da je invertaza izgubila 30% svoje aktivnosti posle 2 h, dok glukoamilaza nije gubila svoju aktivnost, slika 8.



Slika 7. Zavisnost zadržane aktivnosti enzima od vremena inkubiranja u 50% etanolu, 50 mM natrijum-acetatnom puferu pH 4,5 i temperaturi od 25°C. —■— INV, —▲— GA, ■■■ INV 53 nm, ■■■ INV 200 nm, ■■■ GA 53 nm, ■■■ GA 200 nm.

Figure 7. Dependence of the residual activity on time of incubation in 50% (v/v) ethanol, 50 mM sodium-acetate buffer pH 4,5 and 25°C. —■— INV, —▲— GA, ■■■ INV 53 nm, ■■■ INV 200 nm, ■■■ GA 53 nm, ■■■ GA 200 nm.



Slika 8. Zavisnost zadržane aktivnosti enzima od vremena inkubiranja u 25% dioksanu, 50 mM natrijum-acetatnom puferu pH 4,5 i temperaturi od 25°C. —■— INV, —▲— GA, ■■■ INV 53 nm, ■■■ INV 200 nm, ■■■ GA 53 nm, ■■■ GA 200 nm.

Figure 8. Dependence of the residual activity on time of incubation in 25% (v/v) dioxane, 50 mM sodium-acetate buffer pH 4,5 and 25°C. —■— INV, —▲— GA, ■■■ INV 53 nm, ■■■ INV 200 nm, ■■■ GA 53 nm, ■■■ GA 200 nm.

I u dioksanu veličina pora nije značajnije uticala na stabilnost enzima. U petrol etru u kome nativni oblik enzima nije rastvoran, imobilizati su posle 3 dana inkubiranja zadržali u potpunosti polaznu aktivnost.

Svi ovi podaci ukazuju da su dobijeni imobilizati u organskim rastvaračima bili stabilniji od rastvornih oblika enzima i time pogodniji za upotrebu u tim sredinama u cilju sinteze glikozida.

ZAKLJUČAK

Utvrdili smo optimalne uslove za imobilizaciju invertaze i glukoamilaze preko ugljenohidratne komponentne u njihovoj strukturi oksidacijom perjodatom, na makroporoznom poli(GMA-co-EGDMA). Produžavanjem vremena imobilizacije od 2 h do 48 h dobijeno je vezivanje skoro celokupne količine dodatog enzima za matriks i specifična aktivnost imobilizata od 5500 IU/g za invertazu i 1100 U/g za glukoamilazu. U protočnom reaktoru sa napakovanim slojem, dobijena je specifična produktivnost od 3,5 kg/dm³h za invertazu i 1,9 kg/dm³h za glukoamilazu, što je najveća vrednost do sada zabeležena u literaturi. Zbog svoje produktivnosti i pokazane stabilnosti tokom dugotrajne upotrebe, dobijeni imobilizati invertaze i glukoamilaze bi mogli da se upotrebe za industrijsku hidrolizu koncentrovanih rastvora saharoze i hidrolizata skroba. Imobilizati su imali 5 do 10 puta veću stabilnost u 50% etanolu i preko 200 puta u 25% dioksanu, dok u petrol etru nisu gubili aktivnost ni posle 3 dana. Zbog svoje veće stabilnosti i velike aktivne površine (u odnosu na suspenziju enzima u organskom rastvaraču), dobijeni imobilizati bi mogli biti pogodniji za sintezu glikozida od rastvornih enzima.

SPISAK OZNAKA

- DE — dekstrozni ekvivalent
- K_m — mihaelis-mentenova konstanta
- SGE 10/12 — makroporozni glicidil metakrilat sa veličinom pora od 53 nm
- SGE 15/16 — makroporozni glicidil metakrilat sa veličinom pora od 200 nm
- INV — nativna invertaza
- GA — nativna glukoamilaza
- INV 53nm — invertaza imobilizovana na SGE 10/12
- INV 200NM — invertaza imobilizovana na SGE 15/16
- GA 53nm — glukoamilaza imobilizovana na SGE 10/12
- GA 200nm — glukoamilaza imobilizovana na SGE 15/16

LITERATURA

- [1] J.T. Sime, J. Chem. Edu. **76** (1999) 1658.
- [2] J.D. Rozzell, Bioorg. Med. Chem. **7** (1999) 2253.
- [3] S.M. Jovanović, A. Nastasović, N.N. Jovanović, K. Jeremić, Mater. Sci. Forum **214** (1996) 155.
- [4] R. Prodanović, Magistarski rad, Hemijski fakultet (2001)
- [5] F. Rantwijk, W. Oosteron, R.A. Sheldon, J. Mol. Cat. B: Enzym. **6** (1999) 511.
- [6] R.M. Prodanović, S.M. Jovanović, Z.M. Vujčić, Biotechnol. Lett. **23** (2001) 1171.
- [7] S. Bielecki, R.I. Somiari, Biotechnol. Lett. **20** (1998) 287.
- [8] H.J. Rehm, G. Reed, J.F. Kennedy, Biotechnology Volume 7a, Enzyme Technology, VCH 1987
- [9] C. Shah, S. Sellappan, D. Madamwar, Process Biochem. **35** (2000) 971.
- [10] H.K. Shin, J.Y. Kong, J.D. Lee, T.H. Lee, Biotechnol. Lett. **22** (2000) 321.
- [11] M. Marek, O. Valentova, J. Kas, Biotechnol. Bioeng. **26** (1984) 1223.

- [12] J. Mansfeld, M. Forster, A. Schellenberger, H. Dautzenberg, *Enzym Microb Technol* **13** (1991) 240.
- [13] R.M. Prodanović, S.M. Jovanović, Z.M. Vujčić, *Acta Periodica Technol* **32** (2001) 151.
- [14] Y. Ge, Y. Wang, H. Zhou, S. Wang, Y. Tong, W. Lee, *J. Biotechnol.* **67** (1999) 33.
- [15] D.D. Lee, G.K. Lee, P.J. Reily, Y.Y. Li, *Biotechnol. Bioeng.* **22** (1980) 1.
- [16] B. Li & H. Takahashi, *Biotechnol. Lett.* **22** (2000) 1953.

SUMMARY

IMMOBILIZATION OF INVERTASE AND GLUCOAMYLASE ON A MACROPOROUS COPOLYMER OF ETYLENEGLYCOLDIMETHACRYLATE AND GLYCIDYL METHACRYLATE AND POTENTIAL APPLICATIONS IN BIOTECHNOLOGY

(Scientific paper)

Radivoje M. Prodanović¹, Nenad B. Milosavić¹, Slobodan M. Jovanović², Zoran M. Vujčić¹
University of Belgrade, ¹Faculty of Chemistry, Belgrade, ²Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, Serbia

The optimal conditions for the immobilization of invertase and glucoamylase were found via their carbohydrate moiety on a macroporous copolymer of ethyleneglycoldimethacrylate and glycidylmethacrylate. Almost all of the added enzyme was bound to the polymer by increasing the time of incubation of the oxidized enzyme with polymer. A specific activity of 5500 U/g for invertase was obtained and 1100 U/g for glucoamylase. The specific productivity for invertase in a packed bed reactor was 3.5 kg/lh and for glucoamylase 1.9 kg/lh. During continuous use in a packed bed the reactor operational half life for invertase was 290 days, while no decrease in activity was observed for glucoamylase. In 50% (v/v) ethanol the immobilized enzymes were five to ten times more stable, and more than 200 times more stable in 25% (v/v) dioxane. The immobilized enzymes retained all activity in petroleum ether after 3 days of incubation. Because of their higher stability over native enzymes, and the large surface area of the polymer, immobilized glucoamylase and invertase could be more useful for glycoside synthesis in non-aqueous solvents than native ones.

Key words: Invertase • Glucoamylase • Periodate • Poly(GMA-co-EGDMA) • Immobilization • Stability • Glycoside • Organic solvent •

Ključne reči: Invertaza • Glukoamilaza • Perjodat • Poli(GMA-co-EGDMA) • Imobilizacija • Stabilitnost • Glikozid • Organski rastvarač •