ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ 2002
Seria: INŻYNIERIA ŚRODOWISKA z.47 Nr kol. 1537

Bożena TURKIEWICZ[1], Magdalena RUCKA[1], Gryzelda POŹNIAK[2]

MEMBRANY Z OCTANU CELULOZY Z IMMOBILIZOWANĄ α-AMYLAZĄ I GLUKOAMYLAZĄ

Streszczenie. Celem pracy było dobranie warunków immobilizacji α-amylazy i glukoamylazy na membranach z octanu celulozy oraz przeprowadzenie reakcji hydrolizy roztworu skrobi. Enzym immobilizowano w warstwie podporowej bądź naskórkowej membrany, a następnie sieciowano aldehydem glutarowym lub formaldehydem. Badano wpływ rozmieszczenia enzymu oraz różniących się wielkością cząsteczek czynników sieciujących na aktywność i stabilność immobilizowanych enzymów.

CELLULOSE ACETATE MEMBRANES WITH IMMOBILIZED α-AMYLASE AND GLUCOAMYLASE

Summary. In this study α-amylase and glucoamylase immobilized on cellulose acetate membranes were applied for starch hydrolysis. The enzymes were on the surface or in the supporting layer of the membrane. After immobilization the membranes were treated with glutaraldehyde or formaldehyde. The obtained membranes were used for concentration of starch solution.

1. Wprowadzenie

Enzymy amylolityczne, takie jak α-amylazy i glukoamylazy, stosowane są na dużą skalę w przemyśle spożywczym.

[1] Politechnika Wrocławska, Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
[2] Politechnika Wrocławska, Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

α-amylazy [EC 3.2.1.1] są endohydrolazami hydrolizującymi wiązania α-1-4 glikozydowe w cząsteczce skrobi i pokrewnych glukanach [1]. α-amylazy stosowane są głównie do upłynniania skrobi (pierwszy etap scukrzania skrobi) oraz wytwarzania różnego rodzaju skrobi modyfikowanych.

Glukoamylazy zwane też γ-amylazami lub amyloglukozydazami [EC 3.2.1.3] należą do grupy egzoamylaz. Hydrolizują one przede wszystkim wiązania α-1,4- glikozydowe, a słabiej wiązania α-1,6-glikozydowe odszczepiając glukozę od nieredukujących końców łańcuchów skrobi i glikogenu oraz produktów ich degradacji. Glukoamylaza stosowana jest do scukrzania upłynnionej przez α-amylazy skrobi [2, 3]. Enzymy amylolityczne są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, ich uzyskiwanie nie jest zbyt kosztowne i dlatego w przemyśle stosowane są głównie w postaci natywnej. Jednakże ze względu na zalety wynikające z immobilizacji biokatalizatorów oraz możliwość wyeliminowania niekorzystnych zjawisk towarzyszących katalizie w skali przemysłowej, prowadzone są badania nad unieruchamianiem enzymów amylolitycznych na różnych nośnikach: węglu aktywnym [4], polimerach [5, 6, 7], nośnikach nieorganicznych [8, 9]. Reaktory membranowe z immobilizowanymi amylohydrolazami stosowane są także do badania zjawisk związanych z mechanizmem działania enzymów (kinetyka reakcji, efekty inhibicji produktem, dezaktywacja enzymu) [10, 11].

Celem naszej pracy było dobranie warunków immobilizacji α-amylazy i glukoamylazy na membranach polimerowych z octanu celulozy oraz przeprowadzenie reakcji hydrolizy roztworu skrobi w ultrafiltracyjnym reaktorze membranowym o działaniu okresowym. Badaliśmy wpływ rozmieszczenia enzymu w membranie oraz różniących się wielkością cząsteczki czynników sieciujących na aktywność i stabilność unieruchomionych enzymów. Aktywność enzymu immobilizowanego porównywaliśmy z rezultatami uzyskanymi dla enzymu natywnego.

2. Część doświadczalna

2.1. Odczynniki

Octan celulozy, aldehyd glutarowy pochodził z BDH Chemicals, Anglia; formalhehyd z Loba Feinchemie, Wiedeń, Austria; kwas 3,5-dinitrosalicylowy z Aldrich, USA; glukoamylaza z *Rhizopus mold*, α-amylaza z *Bacillus sp.*typ II A i skrobia z Sigma Chemicals, USA, pozostałe odczynniki były produkcji POCh, Gliwice.

2.2. Membrany

Membrany otrzymano zgodnie z procedurą opisaną wcześniej [12].

2.3. Metody analityczne

Białko oznaczano metodą Lowry'ego stosując gotowy zestaw odczynników oraz procedurę postępowania według Sigma Chemicals.

Aktywność enzymów amylolitycznych oznaczano przez pomiar stężenia cukrów redukujących powstałych w wyniku hydrolizy skrobi. Stężenie cukrów redukujących oznaczano kolorymetrycznie [13]. Jako jednostkę aktywności przyjęto aktywność enzymu powodującą w warunkach reakcji uwolnienie 1 mg cukru redukującego w ciągu 1 minuty.

2.4. Metody immobilizacji enzymów

Immobilizację enzymów prowadzono w ultrafiltracyjnym reaktorze membranowym o działaniu okresowym. W zależności od sposobu immobilizacji membranę umieszczano warstwą naskórkową lub podporową w stronę retentatu i filtrowano roztwór enzymu przykładając ciśnienie 0,1 MPa.

2.4.1. Sieciowanie unieruchomionych enzymów na membranie

Sieciowanie enzymów prowadzono w tym samym reaktorze ultrafiltracyjnym. Sposób postępowania był identyczny jak przy prowadzeniu immobilizacji. Stężenie czynników sieciujących wynosiło 8%.

3. Wyniki

α -amylazę i glukoamylazę unieruchamiano na asymetrycznych membranach z octanu celulozy metodą wtłaczania w pory membrany za pomocą ciśnienia. Zastosowano dwa roztwory wyjściowe enzymów o stężeniach 1mg/ml oraz 0,1 mg/ml, z których tylko ten o wyższym stężeniu został wybrany do dalszych badań, ze względu na małe aktywności membran enzymatycznych otrzymanych, gdy zastosowano do immobilizacji roztwór enzymu o niższym stężeniu.

Następnie dobrano warunki immobilizacji. We wszystkich badaniach zastosowano immobilizację enzymów przez wtłoczenie w warstwę podporową lub osadzenie enzymu na naskórku membrany. Następnie unieruchomione enzymy sieciowano aldehydem glutarowym lub formaldehydem. Celem tych badań było określenie, która warstwa membrany, naskórko-

wa czy podporowa, jest korzystniejsza dla unieruchomienia w niej enzymów. Zarówno dla α-amylazy, jak i glukoamylazy immobilizacja od strony warstwy naskórkowej membrany daje wyższą aktywność amylolityczną unieruchomionych enzymów. Wyniki te potwierdziły się dla wszystkich badanych układów. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 1 i 2.

Porównując aktywność właściwą enzymu immobilizowanego na naskórku z aktywnością właściwą enzymu unieruchomionego w warstwie podporowej, można stwierdzić, że dla tych samych warunków reakcji aktywność enzymu w warstwie podporowej jest średnio niższa o 90%. Jest to niezgodne z danymi literaturowymi [14], gdyż to właśnie warstwa podporowa membrany jest idealna do unieruchomienia w niej cząsteczek enzymu. Ta zauważona prawidłowość może wiązać się z faktem, iż w badaniach aktywność hydrolityczna obu enzymów mierzona była wobec wielkocząsteczkowego substratu. Substrat taki miał prawdopodobnie ograniczoną możliwość penetracji do warstwy podporowej, a więc niższa mierzona aktywność enzymu mogła wiązać się z faktem niewysycenia cząsteczek enzymu substratem. Potwierdzeniem tej tezy mogłyby być badania z zastosowaniem substratu niskocząsteczkowego.

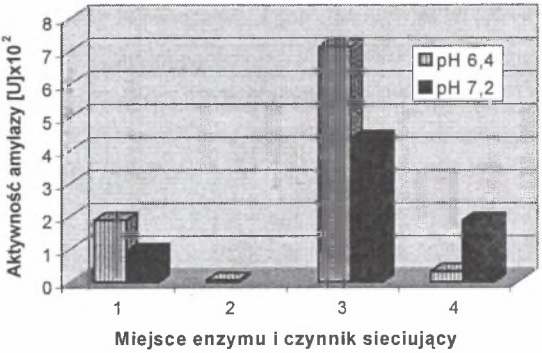
Badano również wpływ czynnika sieciującego (aldehydu glutarowego lub formaldehydu) na aktywność enzymów. α-amylaza osiąga najwyższą aktywność przy sieciowaniu formaldehydem, natomiast glukoamylaza przy użyciu aldehydu glutarowego jako czynnika sieciującego. Sieciowanie glukoamylazy formaldehydem spowodowało spadek jej aktywności o 1000 razy w porównaniu do sytuacji, gdy użyto aldehydu glutarowego (rysunek 1 i 2).

Rys. 1. Wpływ różnych czynników na aktywność immobilizowanej glukoamylazy: 1-warstwa naskórkowa, aldehyd glutarowy; 2-warstwa podporowa, aldehyd glutarowy; 3- warstwa naskórkowa, formaldehyd; 4- warstwa podporowa, formaldehyd

Fig. 1. Effect of different factors on the activity of immobilized glucoamylase

Badano wpływ pH roztworu skrobi na aktywność amylolityczną enzymów natywnych. Dla glukoamylazy zastosowano pH 4,8; 6,0; 7,0; 8;0, a dla α-amylazy pH: 6,4; 7,0; 7,2; 7,6.

Glukoamylaza najwyższą aktywność wykazywała w pH 4,8 i 6,0, a α-amylaza w pH 6,4 i 7,2. Z tego względu w badaniach z enzymami immobilizowanymi zastosowano roztwory skrobi o pH 4,8; 6,0; 6,4; 7,2.



Rys. 2. Wpływ różnych czynników na aktywność immobilizowanej α-amylazy 1-warstwa naskórkowa, aldehyd glutarowy; 2-warstwa podporowa, aldehyd glutarowy; 3- warstwa naskórkowa, formaldehyd; 4- warstwa podporowa, formaldehyd

Fig. 2. Effect of different factors on the activity of immobilized α-amylase

Stwierdzono, że w optymalnych warunkach dla poszczególnych enzymów aktywność amylolityczna rośnie w miarę trwania reakcji prowadzonej w reaktorze.

Oceniono stabilność w czasie przechowywania membran enzymatycznych. Najbardziej stabilne są membrany z enzymem unieruchomionym na naskórku membrany, gdy glukoamylaza była sieciowana aldehydem glutarowym, a α-amylaza formaldehydem. Aktywność po 45 dniach przechowywania membrany w wodzie w temperaturze 4°C (hydroliza 2) spadała o 46% dla glukoamylazy mierzona w pH 4,8, a dla α-amylazy 10% w pH 6,4 (tabele 1 i 2). Aktywność glukoamylazy sieciowanej formaldehydem wzrasta po przechowywaniu membrany przez 45 dni. Przypuszczalnie spowodowane jest to wypłukiwaniem czynnika sieciującego z porów membrany, a potwierdzeniem tego może być zwiększony strumień ultrafiltratu podczas drugiej hydrolizy. Słabsze usieciowanie glukoamylazy formaldehydem umożliwia osiągnięcie takiej konformacji, która bardziej eksponuje centrum katalityczne enzymu dla substratu. To stwierdzenie wymagałoby potwierdzenia przez zbadanie trwałości wiązania formaldehydu z biokatalizatorem.

Tabela 1

Wpływ różnych czynników na aktywność unieruchomionej glukoamylazy

pH substratu	Miejsce unieruchomienia enzymu	Czynnik sieciujący			
		glutaraldehyd		formaldehyd	
		A [U]x10^2		A [U] x 10^5	A [U] x 10^3
		Hydroliza 1	Hydroliza 2	Hydroliza 1	Hydroliza 2
4,8	Warstwa naskórkowa	26,5	14,4	5,5	2,84
4,8	Warstwa podporowa	1,85	2,79	7,05	5,47
6,0	Warstwa naskórkowa	10,1	6,25	6,62	-
6,0	Warstwa podporowa	0,64	0,05	3,93	3,93

Wyniki przedstawiono dla ostatnich prób w danej serii pomiarowej.
Aktywność właściwa unieruchomionego enzymu.
Hydroliza I – aktywność mierzona bezpośrednio po immobilizacji.
Hydroliza II – aktywność mierzona po 45 dniach przechowywania membrany.

Tabela 2

Wpływ różnych czynników na aktywność unieruchomionej α-amylazy

pH substratu	Miejsce unieruchomienia enzymu	Czynnik sieciujący			
		glutaraldehyd		formaldehyd	
		A [U]x10^3		A [U]x10^3	
		Hydroliza 1	Hydroliza 2	Hydroliza 1	Hydroliza 2
6,4	Warstwa naskórkowa	18,5	13,0	71,4	64,3
6,4	Warstwa podporowa	0,66	2,81	3,25	3,25
7,2	Warstwa naskórkowa	9,45	4,4	43,6	26,0
7,2	Warstwa podporowa	-	1,59	18,7	1,81

Wyniki przedstawiono dla ostatnich prób w danej serii pomiarowej.
Aktywność właściwa unieruchomionego enzymu.
Hydroliza I – aktywność mierzona bezpośrednio po immobilizacji.
Hydroliza II – aktywność mierzona po 45 dniach przechowywania membrany.

Literatura

1. Galas E., Kalinowska H., Turkiewicz M.: α-amylazy: struktura i mechanizm działania. Biotechnologia, 1996, nr 2(33), s. 165-175.
2. Tanaka A., Takeda S.: Random attack as the hydrolytic reaction made oligosaccharides by Rhizopus glucoamylase. Biosci. Biotech. Biochem., 1995, No 59, Pp. 1372-1373.
3. Tanaka A., Takeda S.: Subside structure of Rhizopus glucoamylase for the hydrolytic reaction of isomaltooligosaccharides. Biosci. Biotech. Biochem., 1994, No 58, Pp. 1809-1813.
4. Bailey JE., Cho YK.: Immobilization of glucoamylase and glucose oxidase in activated carbon: effects of particle size and immobilization conditions on enzyme activity and effectiveness. Biotech. Bioeng. 1983, No 25, Pp. 1923-1935.
5. Nithianandam VS., Srinivasan SV., Joseph KT., Santappa M.: Preparation and properties of immobilized amyloglucosidase. Biotech. Bioeng. 1981, No 23, Pp. 2273-2282.
6. Uhlich T.,Ulbricht M., Tomaschewski G.: Immobilization of enzymes in photochemically cross-linked polyvinyl alcohol. Enzyme Microb. Technol. 1996. No 19, Pp. 124-131.
7. Prazerees D.M.F., Cabral J.M.S.: Enzymatic membrane bioreactors and their applications. Enzyme Microb. Technol. 1994, Vol. 26, No 16, Pp. 738-750.
8. Cabral J.M.S., Novais J.M., Cardodo J.P.: Immobilization of amyloglucosidase on alkylamine derivatives of metal - link- activated inorganic supports.: Biotechnol. Bioeng. 1981, No 23, Pp. 12083-2092.
9. Zanin GM., De Moraes FF.: Stability of immobilized amyloglucosidase in the process of Cassava starch saccharification.: Appl. Biochem. Biotechnol., 1995, No 51/52, Pp. 253-262.
10. Lee DD., Lee GK., Reily PJ., Lee YY.: Effect of pore diffusion limitation on dextrin hydrolysis by immobilized glucoamylase.: Biotechnol. Bioeng. 1980, Vol. 22, No 22, Pp. 1-17.
11. Kusunoki K., Kawakami K., Shiraishi F., Kato K., Kai M.: A kinetic expression for hydrolysis of soluble starch by glucoamylase.: Biotechnol. Bioeng. 1982, Vol.24, No 24, Pp. 347-354.
12. Rucka M., Turkiewicz B.: Removal of RNA during protein concentration by means of enzyme membrane. 1989, Vol. 22, No 1. Pp. 119-123.
13. Hartmeier W.: Immobilized Biocatalysts, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 1989, Pp. 34-48.
14. Ceynowa J.: Kataliza w reaktorach z membranami enzymatycznymi. Biotechnologia, 1994, nr 1, s. 64-78.

Abstract

Cellulose acetate membranes with immobilized α-amylase and glucoamylase were applied for starch hydrolysis. The enzymes were immobilized on the surface or in the support layer of the membranes. When α-amylase and glucoamylase were placed on the membrane surface amylolytic activity was the highest. The highest activity (7,14 x 10^{-1} U) of glucoamylase immobilized on the membrane surfaces and cross-linked by glutaraldehyde obtained at pH 4.8. It was 55% activity of soluble enzyme. After 45 days storaged at 4°C this membrane retained 54 % of its initial activity whereas the activity of immobilized glucoamylase cross-linked by formaldehyde decreased.

The highest activity (2,65 x 10^{-2} U) of α-amylase immobilized on the membrane surface and cross- linked by formaldehyde obtained at pH 6.4, it was 15 % activity of native enzyme.

The membrane with immobilized α-amylase cross-linked formaldehyde was retained 90% of its initial activity.