

Optimizacija uslova za imobilizaciju invertaze na kopolimeru GMA-co-EGDMA

Invertaza dobijena eksperimentalnim putem je imobilisana na tri uzorka nemodifikovanog kopolimera GMA-co-EGDMA (glicidilmetakrilata-co-etilenglikoldimetakrilata) sa različitim parametrima poroznosti. Imobilizacija je urađena u šaržnom reaktoru. Variirani su pH, jonska sila i odnos protein-nosač da bi se utvrdili optimalni uslovi za dobijanje imobilisanog enzima sa najvećom specifičnom aktivnošću. Dobijeno je da je pH optimum između 4 i 6 pri koncentraciji 0.1 mol/dm³ i odnosu protein-nosač 1:5. Najveću aktivnost je pokazao enzim imobilisan na uzorak GMA-co-EGDMA 20/14 (20% n-alkohola, 14 C-atoma koje taj alkohol sadrži). Ovaj uzorak nije ranije korišćen u ove svrhe. Krajnji rezultati pokazuju da se invertaza može uspešno vezati za kopolimer GMA-co-EGDMA i kao takva koristiti u industrijske svrhe.

Uvod

Invertaza je jedan od najkorišćenijih enzima u konditorskoj industriji. Upotrebljava se kao katalizator pri dobijanju invertnog šećera (smeša glukoze i fruktoze u odnosu 1 : 1) iz saharoze sa smanjenim utroškom energije. Invertni šećer se koristi umesto saharoze zbog većeg koeficijenta slasti i boljih osobina pri kristalizaciji (Prodanović *et al.* 2005).

Problem izdvajanja enzima iz invertnog šećera posle završetka reakcije može da se efikasno reši vezivanjem enzima za nosač. Kao dobar nosač može da se upotrebi makroporozni kopolimer glicidilmetakrilata-co-etilenglikoldimetakrilata (u daljem tekstu GMA-co-EGDMA), zbog hemijske i mehaničke postojanosti i prisustva epoksidne grupe u

svojoj strukturi, koja može lako da se veže za hidrosilnu, amino ili karboksilnu grupu prisutnih u enzim (Prodanović *et al.* 2003).

Cilj rada je određivanje optimalnih uslova za imobilizaciju invertaze u zavisnosti od stepena poroznosti kopolimera, pH vrednosti i jonske sile (koncentracija pufera).

Materijal i metode

U radu su korišćena tri uzorka nemodifikovanog makroporoznog kopolimera GMA-co-EGDMA sa prikazanim parametrima poroznosti (tabela 1). Uzeti polimeri su označeni sa 10/12, 10/16, 20/14, gde prvi broj predstavlja procenat n-alkohola korišćenog u inertnoj komponenti za dobijanje polimera, a drugi broj označava koliko C-atoma ima alkohol. Kopolimeri su sintetisani na način prikazan u literaturi (Nastasović 2003).

Tabela 1. Parametri poroznosti polimera

Uzorak kopolimera	Specifična površina (m ² /g)	Srednji prečnik pora (nm)
10/12	47.6	53
10/16	36.0	87
20/14	27.6	270

Specifična površina SBET je određena iz niskotemperaturnih adsorpcionih izoterma azota, a izračunata pomoću BET jednačine, dok je srednji

Ivan Mrkić (1987), Barajevo, Prokić kraj 83/d, učenik 4. razreda XIII beogradske gimnazije

Stefan Vujčić (1989), Sirig, M. Rejkina 44, učenik 2. godine gimnazije "Jovan Jovanović Zmaj" u Novom Sadu

MENTORI:

mr Nenad Milosavić, istraživač-saradnik u IHTM-u Aleksandra Nastasović, naučni saradnik u IHTM-u

prečnik pora određen pomoću živine porozimetrije (Nastasović 2003).

Korišćen je dinitrosalicilni reagens (u daljem tekstu DNS) dobijen po postupku opisanom u literaturi (Prodanović, Ćirković-Veličković 2005).

Enzim korišćen u eksperimentalnom delu dobio je eksperimentalnim putem (Prodanović *et al.* 2003).

Određivanje uzorka kopolimera s najvećim stepenom vezivanja invertaze. Od tri uzorka kopolimera sa različitim stepenom poroznosti odmereno je po 50 mg. U odmerene polimere je dodato po 5 cm³ rastvora enzima koncentracije 1 mg/cm³ u acetatnom puferu koncentracije 50 mM. Imobilizacija enzima je urađena na 4° C, uz povremeno mešanje (na svaka 2-3 sata) i pri pH vrednosti podešenoj na 4.6. Imobilizacija je trajala 24 časa. Nakon imobilizacije, čestice imobilizanta su sakupljene i isprane sa 5 cm³ acetatnog pufera (pH 4.6), a zatim dva puta sa po 5 cm³ jednomolarnog rastvora NaCl u acetatnom puferu.

Određivanje optimalne pH vrednosti. Na osnovu rezultata iz prethodnog eksperimenta izabran je kopolimer sa najvećim stepenom aktivnosti. Odmerene su probe od po 20 mg kopolimera kojima je dodato po 2 mg enzima. pH vrednost je podešena u intervalu od 3 do 8 u fosfatno-citratnom puferu koncentracije 0.1 M. Imobilizacija enzima je urađena na 4°C, uz povremeno mešanje (na svaka 2-3 sata) u trajanju od 12 sati. Nakon imobilizacije, čestice imobilizanta su sakupljene i isprane sa 5 cm³ acetatnog pufera (pH 4.6), a zatim dva puta sa po 5 cm³ jednomolarnog rastvora NaCl u acetatnom puferu.

Određivanje optimalne jonske sile pri imobilizaciji. Imobilizacija je rađena na probama od po 20 mg kopolimera kojima je dodato po 2 mg enzima rastvorenog u fosfatnom puferu pH 6 i koncentracije 0.1, 0.5, 1, 1.5 i 2 mol/dm³. Nakon imobilizacije, čestice imobilizanta su sakupljene i isprane sa 5 cm³ acetatnog pufera (pH 4.6), a zatim dva puta sa po 5 cm³ jednomolarnog rastvora NaCl u acetatnom puferu. Imobilizacija je urađena na temperaturi od 4°C uz povremeno mešanje (na svaka 2-3 sata). Vreme trajanja imobilizacije je 12 sati.

Određivanje optimalnog odnosa protein-nosač. Uzorcima od po 20 mg kopolimera je dodato po 5 cm³ invertaze različite koncentracije tako da odnos protein-nosač bude 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 i 1 : 100. Imobilizacija je urađena u acetatnom puferu koncentracije 50 mM i pH vrednosti 4,6 na temperaturi 4°C

uz povremeno mešanje (na svaka 2-3 sata) u trajanju od 12 sati. Nakon imobilizacije čestice imobilizanta su sakupljene i isprane sa 5 cm³ acetatnog pufera (pH 4.6), a zatim dva puta sa po 5 cm³ jednomolarnog rastvora NaCl u acetatnom puferu

Određivanje aktivnosti imobilisanog enzima. Posle svake imobilizacije, od proba je odmereno između 5 i 10 mg imobilizanta i preliveno sa 5 cm³ 10% rastvora saharoze u acetatnom puferu (pH 4.6) uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici pri brzini 500 obr/min. Reakciona smeša se nalazila u šaržnom reaktoru zapremine 5 cm³. Magnet u reaktoru ne sme biti na dnu da ne bi sitnio polimer. U intervalima od 5, 10 i 20 minuta iz reakcione smeše je uzeto 0.5 cm³ rastvora i pomešano sa 0.5 cm³ DNS-reagensa. Nakon zagrevanja u ključalom vodenom kupatilu u vremenskom periodu od 5 minuta i razblaženja sa 4 cm³ H₂O, spektrofotometrom je merena apsorbanca na 540 nm. Koncentracija oslobođenih redukujućih šećera je određivana sa standardne prave za redukujuće šećere. Specifična aktivnost imobilizata je određivana na osnovu formule:

$$A_{sp} = 3300 \cdot C_x \cdot V_r / (m \cdot t)$$

gde je: A_{sp} – koncentracija enzimske aktivnosti, 3300 – odnos suve i vlažne mase imobilizanta, V_r – zapremina smeše, C_x – koncentracija redukujućih šećera (mmol/dm³), m – masa vlažnog imobilizanta i t – vreme (min).

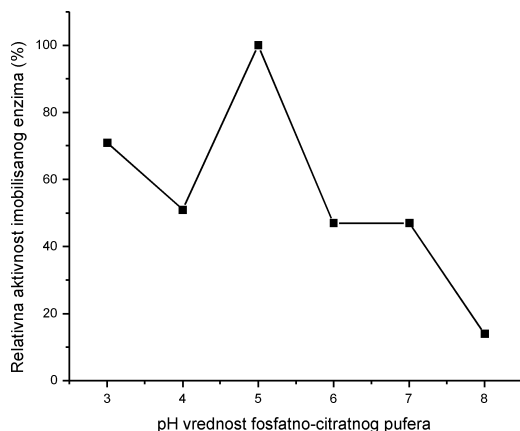
Rezultati i diskusija

Specifična aktivnost dobijenih imobilizovanih preparata je određena u šaržnom reaktoru i rezultati su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Specifične aktivnosti polimera za koje je vezana invertaza (U/g).

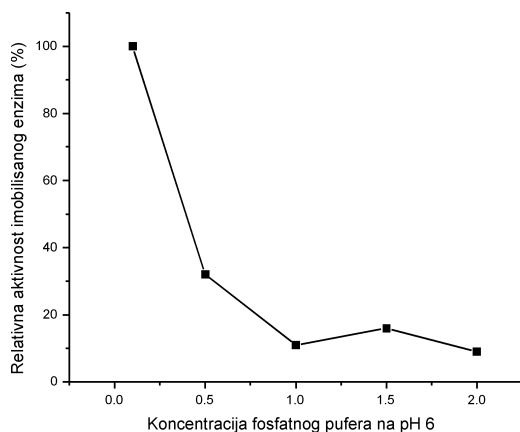
Uzorak kopolimera	Relativna aktivnost
10/12	6
10/16	8
20/14	187

Kao što se iz tabele 2 vidi, najveću aktivnost ima enzim vezan za kopolimer sa najvećim srednjim prečnikom pora (20/14). Ovo je i logično jer taj polimer ima najmanja difuziona ograničenja



Slika 1. Relativne aktivnosti imobilisanog enzima u zavisnosti od pH vrednosti fosfatno-citratnog pufera.

Figure 1. Relative activity of the immobilized enzyme in dependence of pH value in phosphate-citric buffer, concentration 0.1 mol/dm^3

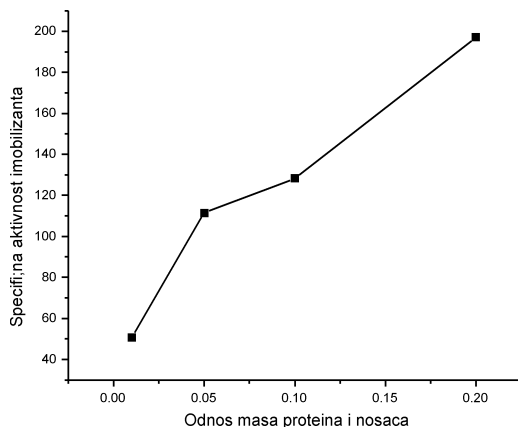


Slika 2. Relativne aktivnosti imobilisanog enzima u zavisnosti od koncentracije fosfatnog pufera na pH 6

Figure 2. Relative activity of the immobilized enzyme in dependence of concentration of phosphate-citric buffer, pH 6

prilikom kretanja supstrata do molekula enzima koji su imobilizovani u unutrašnjosti čestice polimera, kao i difuzije proizvoda iz unutrašnjosti čestice u spoljašnji rastvor.

Relativne aktivnosti imobilisanog enzima su prikazane na slici 1. Kao što se iz priloženog vidi, en-



Slika 3. Specifična aktivnost imobilisanog enzima u zavisnosti od masenog odnosa protein-nosač

Figure 3. Dependence of specific activity of the immobilized enzyme at various protein-polymer relations, pH 5 in phosphate-citric buffer, concentration 0.1 mol/dm^3

zim pokazuje najveću aktivnost na pH vrednosti u intervalu od 4 do 6 što je u skladu sa ranijim rezultatima (Prodanović *et al.* 2003, Milosavić *et al.* 2005).

Na slici 2 je prikazana relativna aktivnost imobilisanog enzima u zavisnosti od jonske sile. Invertaza sadrži veliki procenat ugljenih hidrata (oko 50%) i zbog toga je jako hidrofилна. Sa povećanjem koncentracije rastvora povećava se i hidrofилnost istog i zbog toga enzim teži da ostane u rastvoru.

Na slici 3 je prikazana specifična aktivnost imobilisanog enzima u zavisnosti od masenog odnosa protein-nosač. Kao što je i logično, za uzetu veću količinu enzima dobijena je i veća aktivnost. S obzirom na to da se sa grafika ne vidi da specifična aktivnost dostiže svoj maksimum, zaključak je da se daljim povećanjem količine enzima u odnosu na kopolimer može dobiti još veća aktivnost.

Zaključak

U radu su ispitani i optimizovani uslovi za imobilizaciju invertaze iz *S. cerevisiae* na tri tipa makroporoznog GMA-co-EGDMA sa različitim veličinom pora i dostupnom aktivnom površinom. Polimer sa najvećim porama je pokazao 30 puta veću aktivnost od polimera sa najmanjim porama. Optimalni uslovi za imobilizaciju invertaze na testi-

ranim epoksidnim polimerima su na pH u intervalu od 4 do 6, pri koncentraciji fosfatnog pufera 0.01 mol/dm³ i odnosu protein-nosač 1:5. Sa grafika 2 i 3 vidi se da postoji mogućnost dobijanja veće vrednosti specifične aktivnosti u slučaju da se imobilizacija odvija u rastvoru čija je koncentracija manja od 0.1 mol/dm³ i odnos protein-nosač veći od 1:5. Rezultati koji su prikazani u ovom radu jasno ukazuju da se imobilizat invertaze može koristiti u reaktoru za hidrolizu rastvora saharoze u konditorskoj industriji.

Literatura

Martin M. T., Plou P. J., Alcalde M., Ballesteros A. 2003. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **21**: 299.

Milosavić N. B., Prodanović R. M., Jovanović S. M., Novaković I., Vujčić Z. 2005. Preparation and characterization of two types of covalently immobilized amyloglucosidase. *J. Serb. Chem. Soc.*, **70**: 713.

Nastasović A. 2003. Sintaza, svojstva i primena makroporoznih kopolimera. Doktorska disertacija. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu

Prodanović R., Ćirković-Veličković T. 2005. *Enzimologija, laboratorijski priručnik*. Beograd: Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prodanović R. M., Milosavić N. B., Sladić D., Ćirković Veličković T., Vujčić Z. 2005. Synthesis of hydroquinone- α -glucoside by α -glucosidase from baker's yeast. *Biotechnology letters*, **27**: 551.

Prodanović R. M., Milosavić N. B., Jovanović S. M., Vujčić Z. M. 2003. Imobilizacija invertaze i

glukoamilaze na makroporoznom kopolimeru glicidilmetakrilata i etilenglikoldimetakrilata i njihova potencijalna primena u biotehnologiji. *Hemijska industrija*, **57**: 536.

Ivan Mrkić and Stefan Vujičić

Optimization of Conditions for Immobilization of Invertase on Macroporous Copolymer GMA-co-EGDMA

Invertaze, gained experimentally, was immobilized upon three samples of unmodified copolymer GMA-co-EGDMA (glycidyl metacrylate-co-ethylene glycol dimetacrylate) with different parameters of porosity. Immobilization was performed in a charge reactor. The pH, ion force and relation protein-porter were varied in order to set optimal conditions for gaining the immobilized enzyme with the greatest specific activity. According to the research results, optimal conditions for immobilization are pH between 4-6, concentration 0.1 mol/dm³ and protein-porter relation 1:5. The greatest specific activity was shown in the enzyme immobilized upon a sample of GMA-co-EGDMA 20/14 (number 20 represents the percent of n-alcohol in the inert component, 14 is the number of C-atoms in the alcohol). This sample has never been used for that purpose before. Final results show that the invertaze can be successfully bound to the copolymer GMA-co-EGDMA and used in the industry.

