Bożena Wawrzyniak, Jerzy Krauze, Jerzy Łobarzewski*

UNIERUCHAMIANIE KRAJOWYCH PREPARATÓW GLUKOAMYLAZY NA AKRYLOWYM NOŚNIKU VINYLAFF 818

W poprzednich pracach nad unieruchamianiem glukoamylazy stosowaliśmy różne metody, między innymi adsorpcję na jonicie [1], zamykanie w usieciowanej żelatynie [1-5], sprzęganie kowalencyjne z różnymi nośnikami, w tym nośnikami akrylowymi o nazwie Vinylaff. Nośniki te, syntetyzowane uprzednio w Politechnice Wrocławskiej, są obecnie produkowane na większą skalę. Sprzęganiu kowalencyjnemu z nośnikami Vinylaff były poddawane zagraniczne rozpuszczalne preparaty enzymu. Spośród trzech badanych typów nośników Vinylaff najbardziej przydatny okazał się Vinylaff 818. Unieruchamianie na tym nośniku powodowało wyraźny wzrost termostabilności glukoamylazy, a trwałość operacyjna preparatów stosowanych w temp. 50°C była wysoka [6]. Vinylaff 818 jest kopolimerem akrylanu butylu i etylenodimetakrylanu o zawartości w 1 g 0,44 mmola wolnych grup aminowych, które mogą wpływać na właściwości unieruchomionego preparatu enzymu.
W niniejszej pracy nośnik Vinylaff 818 zastosowaliśmy do unieruchamiania krajowych rozpuszczalnych preparatów glukoamylazy pochodzących z różnych gatunków pleśni Aspergillus, a mianowicie A. niger i A. awamori. Różniły się one nie tylko pochodzeniem, ale także zawartością innych białek, tzw. białek balastowych, a celem było sprawdzenie ich przydatności do otrzymywania unieruchomionych preparatów, przeznaczonych do scukrzania wstępnie upłynnionej skrobi.

1.Część doświadczalna

1.1. Materiały

Rozpuszczalny preparat I glukoamylazy z A. niger, w postaci białego proszku, o aktywności 11,41 J/mg otrzymano z Instytutu Mikrobiologii UMCS w Lublinie. Preparat II z A. awamori, o nazwie Glukopol, był brunatną cieczą o aktywności 508,8 J/cm^3 i pochodził z Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie.
Nośnik Vinylaff 818 otrzymano od prof. dr hab. Bożeny Kolarz z Instytutu Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych Politechniki Wrocławskiej.

* Instytut Mikrobiologii UMCS w Lublinie.

1.2. Metody

1.2.1. Oznaczanie aktywności rozpuszczalnych preparatów

Aktywność rozpuszczalnych preparatów glukoamylazy oznaczano na podstawie ilości glukozy uwalnianej w czasie hydrolizy 1-procentowego roztworu skrobi rozpuszczalnej w 0,01 M buforze octanowym o pH 4,6. Hydrolizę prowadzono w tem. 30 i 60°C. Glukozę oznaczano metodą kolorymetryczną z oksydazą glukozową i peroksydazą, stosując jako chromogen di-o-anizydynę i pomiar absorbancji przy 530 nm [7]. Jako jednostkę aktywności przyjęto taką ilość glukoamylazy, która powoduje uwolnienie ze skrobi 1 μmola glukozy w czasie 1 minuty.

1.2.2. Badanie czystości preparatów

Jedną ze stosowanych metod była chromatografia żelowa. 1 cm^3 roztworu preparatu (37-38 mg białka) nanoszono na kolumnę z Sepharose 6B (1,6 x 68 cm), zrównoważoną 0,01 M buforem octanowym o pH 4,6. Elucję tym samym buforem prowadzono w tem. +4°C z szybkością 10 cm^3/godz., rejestrując absorbancję eluatu w sposób ciągły przy 280 nm. Zbierano frakcje o objętości 2 cm^3. Aktywność glukoamylazy w eluacie oznaczono metodą kolorymetryczną.

Białka preparatów rozdzielano również metodą elektroforezy dyskowej w systemie zasadowym (pH buforu elektrodowego 8,3) w żelu poliakryloamidowym o stężeniu 7,5%, wg Davis'a [8], z dodatkiem skrobi rozpuszczalnej (Merck) w stężeniu 5%. Rozdział białek prowadzono stosując natężenie prądu 5 mA/słupek o średnicy 0,6 cm. Wskaźnikiem frontu jonów był błękit bromofenolowy. Po zakończeniu rozdziału słupki żelu inkubowano w temp. 30°C w 0,1 M buforze octanowym o pH 4,5 w czasie 15-60 minut, po czym w 0,001 N roztworze jodu w jodku potasu przez 60 minut. Następnie słupki pozostawiano przez noc w 7-procentowym roztworze kwasu octowego. Położenie i szerokość odbarwionych lub rozjaśnionych pasm na ciemnoniebieskim tle rejestrowano na podstawie pomiarów transmitancji przy 580 nm w aparacie Spekord M-40 (Carl Zeiss, Jena) przy pomocy urządzenia „Gel Scanner".

1.2.3. Unieruchamianie glukoamylazy przez kowalencyjne sprzęganie z nośnikiem Vinylaff 818

1,5 g wilgotnego nośnika zalewano 2,5-procentowym roztworem aldehydu glutarowego (Merck) w 0,02 M buforze fosforanowym o pH 7,0, pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 24 godz., a następnie przemywano buforem fosforanowym (pH 7). Do zaktywowanego nośnika dodawano ok. 640 J rozpuszczalnego preparatu I lub 510 J preparatu II w 0,022 M buforze fosforanowym. Roztwór wraz z nośnikiem wytrząsano przez 24 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór zlewano, a nośnik z unieruchomionym enzymem przemywano kolejno (porcjami po 100 cm^3) 0,01 M buforem octanowym po pH 4,6, 0,5 M roztworem NaCl i wodą destylowaną. W roztworze zlanym znad nośnika oraz w roztworach użytych do przemywania oznaczono aktywność glukoamylazy.

1.2.4. Oznaczanie aktywności unieruchomionych preparatów glukoamylazy

Aktywność unieruchomionych preparatów oznaczano stosując przepływ substratu w obwodzie zamkniętym przez złoże preparatu umieszczone w termostatowanej kolumnie o średnicy 1 cm i wysokości 5 cm. 1-procentowy buforowany roztwór skrobi (pH 4,6) przepuszczano z szybkością ok. 60 cm^3/godz. w temp. 30°C. Czas cyrkulacji wynosił od 5 do 20 minut, zależnie od aktywności preparatu. Po określonym czasie cyrkulacji zbierano roztwór substratu i oznaczano ilość uwolnionej glukozy metodą kolorymetryczną [7].

1.2.5. Rozdział cukrów metodą sączenia molekularnego

Cukry zawarte w hydrolizatach rozdzielano metodą sączenia molekularnego na żelu poliakryloamidowym Bio-Gel P-2 minus 400 mesh (firmy Bio-Rad). Na termostatowaną kolumnę (1,6 x 95 cm) nanoszono od 100 do 200 μl hydrolizatu. Elucję prowadzono redestylowaną wodą, w temp. 65°C, przy szybkości przepływu 18 cm^3/godz. Stężenie cukrów w eluacie rejestrowano przy pomocy refraktometru przepływowego firmy Varian, który był sprzężony z rejestratorem (LKB, typ 2201).
Stężenia poszczególnych frakcji cukrów obliczano na podstawie powierzchni pików.

1.2.6. Oznaczanie wartości DE hydrolizatów

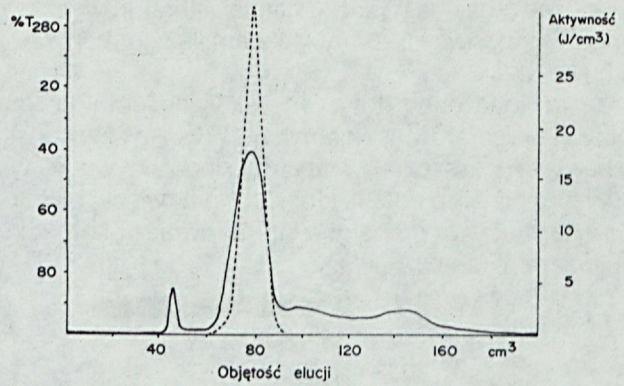
Wartość DE, czyli równoważnik glukozowy hydrolizatów, oznaczano metodą Luffa-Schoorla według PN-78/A-74701.

2. Omówienie wyników

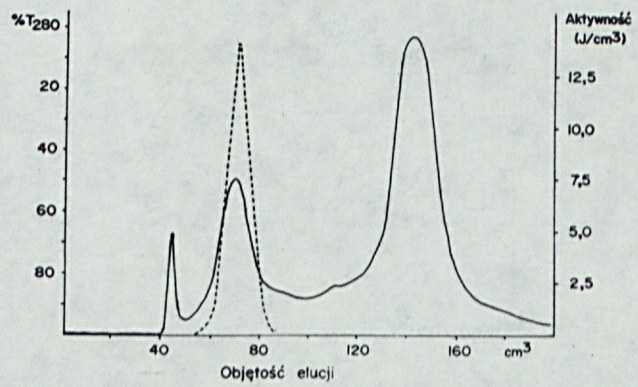
2.1. Charakterystyka krajowych rozpuszczalnych preparatów glukoamylazy

Pleśnie syntetyzujące glukoamylazę wytwarzają również inne enzymy, m.in. α-amylazę, transglukozydazę i proteazy. Transglukozydaza obniża wydajność hydrolizy substratów skrobiowych. Obecność enzymów proteolitycznych może prowadzić do stopniowej degradacji glukoamylazy i powstania form o różnych masach cząsteczkowych. Nieoczyszczone preparaty mogą zawierać także inne białka balastowe [9-14].
Czystość badanych krajowych preparatów glukoamylazy określano na podstawie rozdziału białek na kolumnie z Sepharose 6B. Dla porównania rozdzielano także preparat Amigase znanej firmy Gist Brocades, produkującej enzymy. Preparat I po rozdziale chromatograficznym wykazywał jeden duży pik białkowy obejmujący całą aktywność glukoamylazy (rys. 1.). Poprzedzał go mały pik białek o większych masach cząsteczkowych. Ilości substancji białkowych o niskich masach cząsteczkowych były nieznaczne.
Preparat II był bardziej zanieczyszczony, ponieważ wraz z pikiem odpowiadającym glukoamylazie występował wyraźny pik białek o wysokich masach i bardzo duży pik substancji o niskich masach cząsteczkowych (rys. 2.).
Białka o wysokich masach cząsteczkowych nie były widoczne na obrazie

elucji preparatu Amigase. Oprócz piku odpowiadającego glukoamylazie występowały nieznaczne ilości substancji o mniejszych masach cząsteczkowych, które dzieliły się na 3 piki.



Rys.1. Rozdział białek preparatu I metodą sączenia na Sepharose 6B
_____ T_{280}
..... aktywność glukoamylazy

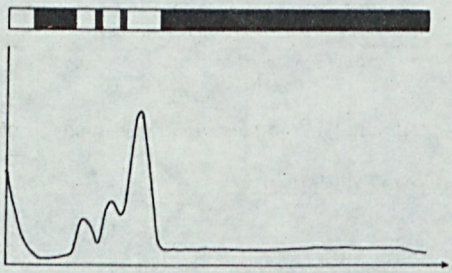


Rys.2. Rozdział białek preparatu II metodą sączenia na Sepharose 6B
_____ T_{280}
..... aktywność glukoamylazy

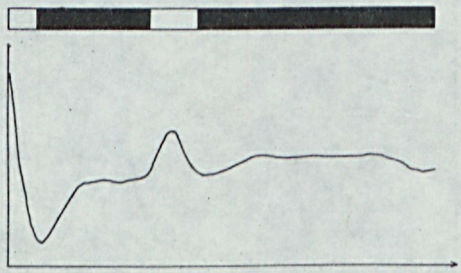
Badania metodą elektroforezy dyskowej wykazały, że w przypadku preparatu I, pochodzącego z pleśni A. niger C, na słupkach żelu występowały 4 odbarwione pasma (rys. 3.). Paszczyński i współpr. [11], badając surowy preparat glukoamylazy z tego samego szczepu, również obserwowali 4 pasma.
Rozdział pasm z preparatu II metodą elektroforezy dyskowej był bardziej utrudniony. Przy nanoszeniu większych ilości białka (ok. 88 μg) cały słupek

żelowy odbarwiał się, a przy małych ilościach (15 μg) widoczne były tylko dwa odbarwione pasma (rys. 4.). Lepsze rezultaty uzyskano poddając elektroforezie jedynie białka frakcji odpowiadającej glukoamylazie, którą wstępnie rozdzielono na kolumnie z Sepharose 6B. Na elektroforetogramach były wówczas widoczne 3 pasma. Według danych literaturowych w pleśniach A. awamori mogą występować 3 formy glukoamylazy o różnych masach cząsteczkowych [12, 13].

W tabeli 1. zestawiono dane dotyczące aktywności badanych krajowych rozpuszczalnych preparatów glukoamylazy. Wysoką aktywnością charakteryzował się bardziej oczyszczony preparat I. Jego aktywność właściwa była 6-7-krotnie wyższa niż preparatu II, który zawierał więcej białek towarzyszących. Aktywność właściwa preparatu II była również około 4-krotnie niższa w porównaniu z preparatem Amigase.



Rys.3. Elektroforetogram preparatu I (górna część słupka znajduje się po lewej stronie rysunku)



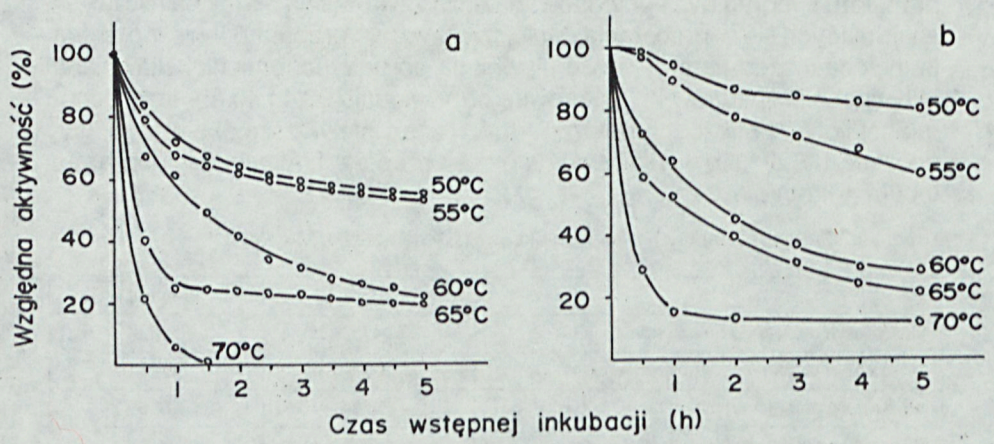
Rys.4. Elektroforetogram preparatu II

Tabela 1. Aktywność rozpuszczalnych preparatów glukoamylazy

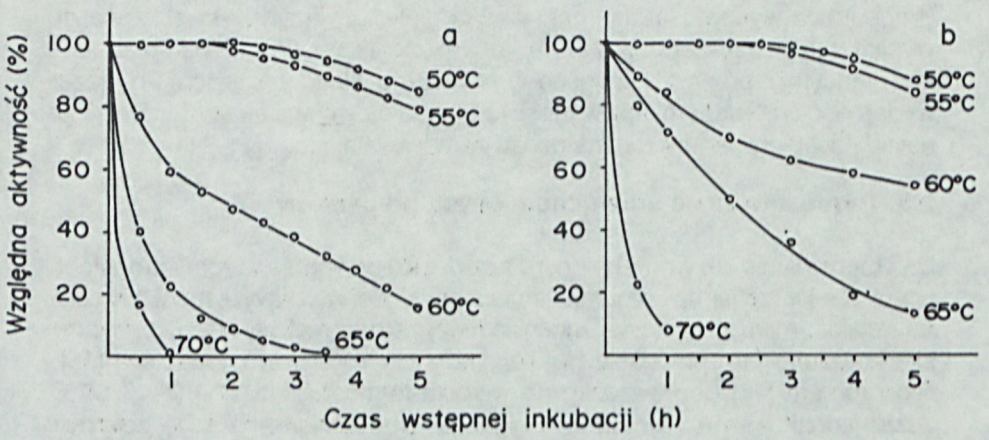
Temperatura oznaczenia	Preparat I		Preparat II		Preparat Amigase	
	J/mg	J/mg białka	J/cm^3	J/mg białka	J/cm^3	J/mg białka
30°C	11,41	24,80	508,80	4,07	2679	17,86
60°C	42,95	93,37	1695,00	13,56	—	—

Krajowe rozpuszczalne preparaty glukoamylazy różniły się także termostabilnością (rys. 5.). Preparat I był bardziej wrażliwy na długotrwałe oddziaływanie temp. 50 i 55°C niż preparat II (rys. 6.). Aktywność preparatu I po 1

godzinie ogrzewania w tych temperaturach obniżała się do ok. 68%, a po dalszym czasie inkubacji spadała nieznacznie. Natomiast aktywność preparatu II w temp. 50 i 55°C praktycznie nie zmieniała się przez 2,5 godziny inkubacji, a po 5 godz. stanowiła odpowiednio 92 i 86% aktywności wyjściowej. W wyższych temperaturach preparat I był jednak bardziej trwały, gdyż po 5 godz. inkubacji w temp. 65°C zachowało się jeszcze 20% aktywności wyjściowej, a preparat II uległ inaktywacji już po 3 godzinach ogrzewania. W zakresie temperatur 50-65°C aktywność preparatu I kształtowała się podobnie jak preparatu Amigase pochodzącego również z A. niger [6].
Jak już podano wcześniej, preparat II uzyskano z pleśni A. awamori. Według Hayashida i współpr. [12, 13] modyfikacja enzymu tej pleśni przez działanie



Rys.5. Termostabilność glukoamylazy preparatu I
a – enzym rozpuszczalny
b – enzym unieruchomiony



Rys. 6. Termostabilność glukoamylazy preparatu II
a – enzym rozpuszczalny
b – enzym unieruchomiony

proteaz i glikozydaz prowadzi do powstania form mniej stabilnych w temp. 60°C. Możliwe, że większa zawartość białek balastowych w preparacie II mogła mieć również wpływ na termostabilność w temperaturach 60 i 65°C.

2.2. Wydajność unieruchamiania i aktywność

Wydajność kowalencyjnego sprzęgania obu badanych enzymów z nośnikiem Vinylaff 818 oraz aktywność ujawnianą przez unieruchamiane preparaty przedstawiono w tabeli 2. Wydajność unieruchamiania obliczono na podstawie różnicy między ilością enzymu (J) w roztworze przed i po unieruchomieniu.
Wydajność kowalencyjnego sprzęgania preparatu I wynosiła ok. 58%. Gdy unieruchomieniu poddawano enzym preparatu II, wówczas z nośnikiem wiązało się tylko 17,6% aktywności. Niższa wydajność unieruchamiania preparatu II mogła być spowodowana dużą zawartością białek balastowych znajdujących się w preparacie. Mniejsza czystość preparatu II nie wpłynęła jednak znacząco na aktywność ujawnianą po unieruchomieniu. Ujawniana aktywność preparatów I i II stanowiła odpowiednio 38,4 i 40,0% unieruchomionej ilości. W liczbach bezwzględnych znacznie wyższą aktywność, wynoszącą 145 J/1,5 g, wykazywał natomiast preparat I. Aktywność preparatu II była 4-krotnie niższa.

Tabela 2. Wydajność unieruchamiania glukoamylazy na nośniku Vinylaff 818

	Preparat I	Preparat II
Ilość enzymu użyta do unieruchamiania (J)	647,5	508,8
Ilość enzymu, jaka uległa unieruchomieniu (J)	377,5	89,5
Wydajność unieruchamiania (%)	58,3	17,6
Ujawniana aktywność (J/1,5 g wilgotnego preparatu)	145,0	35,8
% ujawnianej aktywności w stosunku do unieruchomionej ilości enzymu	38,4	40,0

Procentowa wydajność unieruchamiania glukoamylazy I była zbliżona do wyników, jakie uzyskano, gdy z tym samym nośnikiem Vinylaff 818 sprzęgano kowalencyjnie preparat Amigase [6]. Według Holló i Laszló [14], jeżeli wydajność unieruchamiania wynosi 40-80%, a ujawniana aktywność 15-30% użytej ilości, procedurę można uznać za zadawalającą.

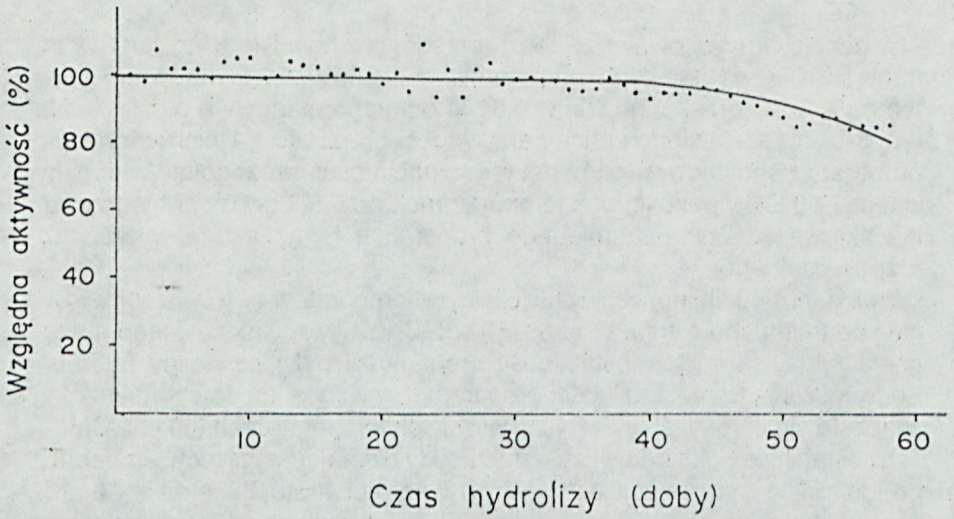
2.3. Termostabilność unieruchomionych preparatów

Unieruchamianie enzymów na nośnikach często powoduje wzrost termostabilności. Nie jest to jednak regułą, a zmiany trwałości w podwyższonej temperaturze zależą m.in. od charakteru nośnika i enzymu oraz metody unieruchamiania. Np. kowalencyjne sprzęganie glukoamylazy z A. niger z aminocelulozą [15] i silochromem [16] doprowadziło do wzrostu termostabilności w temp. 50°C. Jeżeli jednak enzym, również z A. niger, unieruchomiono na szkle pokrytym poliamidem, wówczas aktywność unieruchomionego preparatu w temperaturach powyżej 40°C była niższa niż rozpuszczalnego [17].

Aby ocenić wpływ kowalencyjnego sprzęgania z nośnikiem Vinylaff 818 na termostabilność badanych preparatów glukoamylazy, inkubowano je w temp. 50-70°C przez 5 godzin w 0,01 M buforze octanowym o pH 4,6. Na rys. 5 b. przedstawiono zmiany aktywności preparatu I. Unieruchomienie preparatu I spowodowało wzrost termostabilności, szczególnie widoczny w temp. 50°C. W pozostałych temperaturach po 0,5-5 godzinach ogrzewania aktywność unieruchomionego preparatu I była zawsze wyższa niż rozpuszczalnego.
Różnice termostabilności rozpuszczalnych preparatów I i II wystąpiły również po unieruchomieniu. W temp. 50 i 55°C wpływ kowalencyjnego sprzęgania z Vinylaff na termostabilność preparatu II był nieznaczny (rys 6b.) Podwyższenie termostabilności preparatu II w wyniku unieruchomienia zaznaczyło się natomiast wyraźnie w wyższych temperaturach (60 i 65°C).
Termostabilność glukoamylazy wzrasta, gdy działaniu wyższych temperatur poddaje się enzym rozpuszczony w roztworze substratu. Substrat – 20-procentowy roztwór maltodekstryny – działał stabilizująco także na preparaty unieruchomione na Vinylaff 818. Np. aktywność preparatu I sprzężonego kowalencyjnie z nośnikiem po 3-godzinnym ogrzewaniu w temp. 65°C w roztworze substratu stanowiła około 80% aktywności wyjściowej, podczas gdy po inkubacji w tym samym czasie w buforze tylko około 37%.

2.4. Trwałość operacyjna

Badania trwałości preparatów I i II sprzężonych kowalencyjnie z Vinylaff 818 prowadzono w temp. 50°C.
Trwałość preparatu I badano stosując ciągły przepływ 20-procentowego roztworu maltodekstryny (DE ok. 24) przez złoże preparatu o obj. 2,5 cm^3 w kolumnie z szybkością 9 cm^3/godz. Aktywność tego preparatu mierzona wartością DE hydrolizatu i stężeniem glukozy nie zmieniła się przez 50 dni ciągłego działania kolumny. Preparat I był otrzymany z pleśni A. niger, podobnie jak handlowy preparat Amigase. Okres półtrwania preparatu Amigase unieruchomionego na tym samym nośniku wynosił ponad 60 dni [6].
Trwałość operacyjną unieruchomionego preparatu II badano w reaktorze kolumnowym i w reaktorze z mieszadłem. Przy zastosowaniu złoża o obj. 11 cm^3 w kolumnie i szybkości przepływu 20-procentowego roztworu maltodekstryny wynoszącej 20 cm^3/godz. hydrolizat zbierany z kolumny zawierał ok. 80% glukozy. Względne aktywności preparatu oznaczone na podstawie ilości uwalnianej glukozy w czasie 58 dni działania reaktora przedstawiono na rys. 7. W ciągu 45 dni aktywność preparatu wykazywała jedynie nieznaczną tendencję spadkową, a po 58 dniach obniżyła się o ok. 20%. W tym czasie w wyniku hydrolizy otrzymano ponad 3,4 kg glukozy. Zastosowanie odpowiednio mniejszej szybkości przepływu roztworu substratu umożliwiłoby uzyskanie większego stopnia scukrzenia. Równocześnie zmniejszenie szybkości przepływu w miarę obniżania się aktywności preparatu przedłużyłoby okres jego stosowania.
Unieruchomiony preparat II zastosowany do hydrolizy maltodekstryny w reaktorze z mikromieszadłem charakteryzował się również stosunkowo wysoką trwałością operacyjną. Aktywność wyjściowa tego preparatu nie zmie-



Rys.7. Trwałość operacyjna preparatu II unieruchomionego na nośniku Vinylaff 818 w warunkach ciągłego przepływu 20-procentowego roztworu maltodekstryny przez kolumnę z upakowanym złożem w temp. 50°C

niła się przez 20 dni, a po 26 dniach badań obniżyła się o 10%. Należy jednak zaznaczyć, że po 16 dniach działania reaktora następowało „roztarcie" nośnika. Korzystniejsze wydaje się zatem stosowanie preparatów glukoamylazy unieruchomionych na Vinylaff 818 w reaktorze kolumnowym z upakowanym złożem.

2.5. Hydroliza maltodekstryny przez krajowe preparaty glukoamylazy

Wydajność hydrolizy maltodekstryny zależy m.in. od stężenia substratu i enzymu, czasu działania enzymu i stopnia jego oczyszczenia. Zachodzenie reakcji rewersji katalizowanych przez samą glukoamylazę [18, 19] oraz występującą wraz z nią transglukozydazę [20] obniża wydajność scukrzenia. Unieruchomienie, zwłaszcza na porowatych nośnikach, sprzyja dodatkowo reakcjom resyntezy [21, 22].

Substratem w badaniach rozpuszczalnych preparatów glukoamylazy były 20-, 30- i 40-procentowe roztwory maltodekstryny (DE 24). Przy różnych stężeniach substratu utrzymywano ten sam stosunek ilościowy do enzymu, tj. około 1,5 J/g s.m. roztworu. Hydrolizę prowadzono w temp. 50°C.

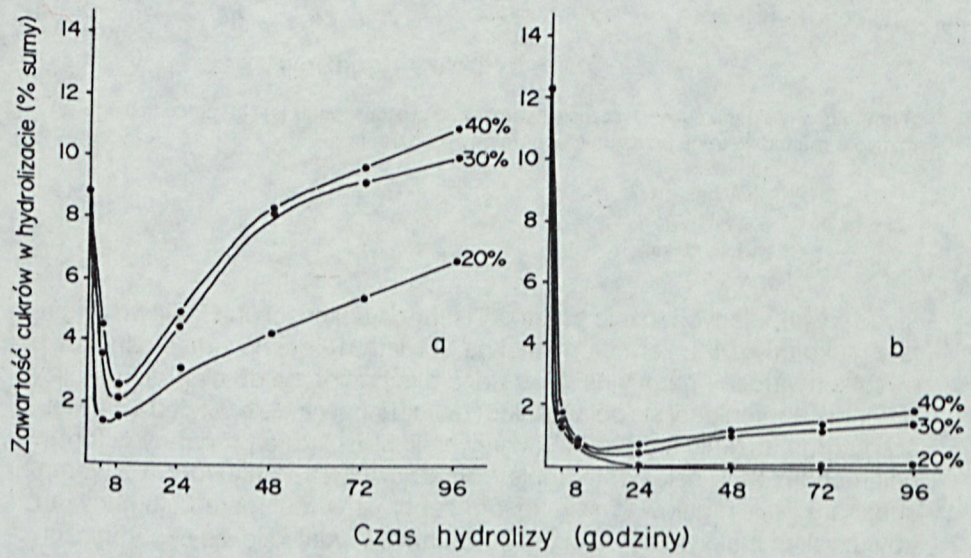
Najwyższą wartość DE i zawartość glukozy uzyskiwano po 24-48 godzinach działania rozpuszczalnych preparatów I i II. Maksymalne wartości scukrzenia uzyskiwano wcześniej, jeżeli stosowano 30-40-procentowe roztwory maltodekstryny. Najwyższy stopień hydrolizy 40-procentowego roztworu maltodekstryny po działaniu rozpuszczalnego preparatu I wynosił 94 DE i 91,2% glukozy, a po działaniu preparatu II 93 DE i 90,2% glukozy. Mimo więc, że preparat I był znacznie bardziej oczyszczony, nie stwierdzono wyraźnej różnicy wydajności hydrolizy po działaniu obu preparatów. Maksymalny stopień scukrzenia można uznać za zadawalający, ale był on niższy od tego, jaki uzyskuje się przy użyciu zagranicznych, handlowych rozpuszczalnych preparatów glukoamylazy.

Wydajność hydrolizy katalizowanej przez enzymy preparatu I i II po sprzężeniu z nośnikiem Vinylaff 818 badano w warunkach cyrkulacji przez złoże w termostatowanej kolumnie (50°C) 40-procentowego roztworu maltodekstryny o DE ok. 24. Maksymalną wartość hydrolizy (ok. 93 DE i 91% glukozy), zbliżoną do tej, jaką osiągano przy użyciu preparatów rozpuszczalnych, uzyskiwano po 19 godz., niezależnie od pochodzenia preparatu (tabela 3.). Obniżanie wydajności hydrolizy po dłuższym czasie działania rozpuszczalnych i unieruchomionych preparatów I i II można tłumaczyć występowaniem rewersji. Wyniki badań zależności między stężeniem substratu a zakresem rewersji przedstawiono na podstawie bardziej oczyszczonego rozpuszczalnego preparatu I (rys. 8.). W pierwszym etapie hydrolizy następował spadek,

Tabela 3. Wydajność hydrolizy 40–procentowego roztworu maltodekstryny przez unieruchomione preparaty I i II

Czas Hydrolizy godz.	Preparat I		Preparat II	
	DE	Glukoza*	DE	Glukoza*
0,5	77,4	66,7	68,8	57,7
1,0	85,4	79,1	75,5	68,1
2,0	88,1	80,6	83,5	75,6
4,0	90,3	87,8	87,3	81,2
19,0	93,3	91,1	93,1	91,3
44,0	—	—	89,3	84,7

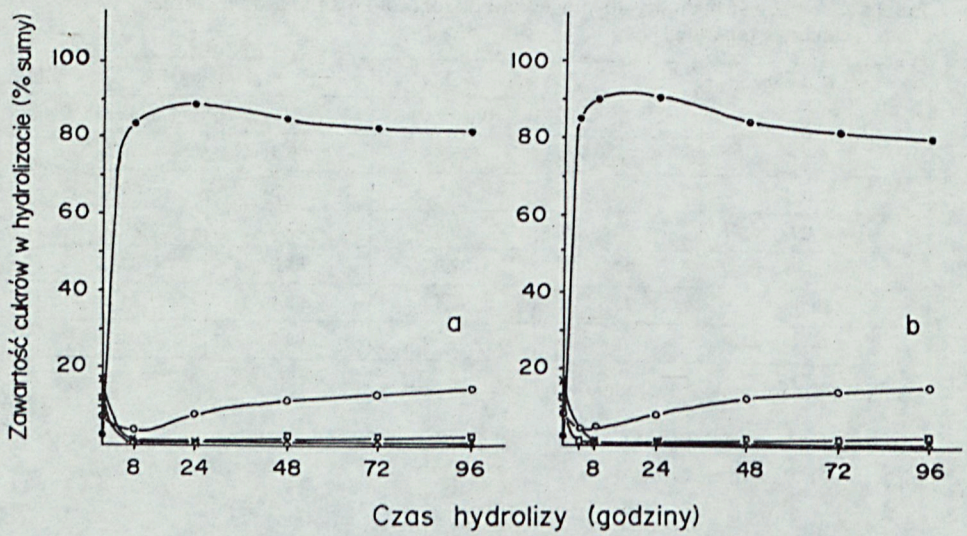
* Glukoza oznaczona bezpośrednio w hydrolizacie w % s.m.



Rys. 8. Powstawanie produktów rewersji w czasie hydrolizy roztworów maltodeksystryny o różnej zawartości suchej masy przez rozpuszczalny preparat I
a — disacharydy b — trisacharydy

a potem wzrost ilości oligosacharydów. Po osiągnięciu maksymalnego poziomu glukozy ilość disacharydów podwyższała się szybciej. W końcowych hydrolizatach widoczne były znaczne różnice zawartości oligosacharydów, zależnie od stężenia roztworu substratu.

Podobnie przebiegało gromadzenie się oligosacharydów po zastosowaniu unieruchomionego preparatu I, ale po 96 godzinach hydrolizy stężenie disacharydów było około 1,5 raza wyższe w porównaniu z ilością powstałą po działaniu preparatu rozpuszczalnego (rys. 9.). Większe ilości disacharydów były prawdopodobnie spowodowane występowaniem ograniczeń dyfuzyjnych dla działania glukoamylazy unieruchomionej na porowatym nośniku Vinylaff 818.



Rys.9. Zmiany składu cukrów w czasie hydrolizy 30-procentowego (a) i 40-procentowego (b) roztworu maltodekstryny przez unieruchomiony preparat I

— · — · — glukoza
— ◇ — ◇ — disacharydy
— □ — □ — trisacharydy
— x — x — wyższe dekstryny

Mimo występujących różnic czystości i termostabilności oba krajowe preparaty glukoamylazy unieruchomionej na Vinylaff 818 cechowała stosunkowo wysoka trwałość operacyjna. Mogą one być przydatne do ciągłej hydrolizy wstępnie upłynnionej skrobi w reaktorze kolumnowym. Ze względu na większe nagromadzanie się produktów rewersji, stosując te preparaty w formie unieruchomionej, należy starannie dobrać czas ich kontaktu z roztworem substratu i tak regulować szybkość przepływu w reaktorze kolumnowym, aby uzyskać maksymalny stopień scukrzania. Wydaje się, że ekonomicznie uzasadnione może być stosowanie reaktora ze złożem unieruchomionego preparatu II z przeznaczeniem np. do scukrzania odpadów produkcyjnych przetwórstwa skrobiowego o zawartości suchej masy poniżej 30%.

Literatura

1. B.Wawrzyniak, J.Krauze (1984) : *Własności unieruchomionych preparatów glukoamylazy.* Zesz. Nauk. AE w Poznaniu Seria I z. 112, 18.
2. B.Wawrzyniak (1983) : *Badanie amylolizy pod działaniem — amylazy i unieruchomionej glukoamylazy.* Zesz. Nauk. AE w Poznaniu Seria I z. 109, 15.
3. B.Wawrzyniak, J.Krauze (1985) : *Glukoamylaza unieruchomiona w żelatynie.* Zesz. Nauk. AE w Poznaniu Seria I z. 134, 29.
4. B.Wawrzyniak, J.Krauze (1986) : *Trwałość preparatów glukoamylazy unieruchomionej w cienkich warstwach żelatyny na różnych podłożach.* Zesz. Nauk. AE w Poznaniu Seria I z. 149, 140.
5. J.Krauze, B.Wawrzyniak (1988) : *Properties of Gel — Entrapped Glucoamylase.* Starch/Starke **40**, 319.
6. B.Wawrzyniak, J.Krauze: *Glucoamylase Covalently Bound to Acrylic Carriers.* Starch/Starke 43,283.
7. M.Kujawski, A.Zając (1974) : *A Proposition for a Unified Method of Glucoamylase Activity Determination in Microbial Material.* Starch/Starke **26**, 93.
8. H.R.Maurer (1971) : *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis.* Walter de Gruyter, Berlin, New York, s. 44.
9. B.C.Saha, J.G.Zeikus (1989) : *Microbial Glucoamylases : Biochemical and Biotechnological Features.* Starch/Starke **41**, 57.
10. W.M.Fogarty, C.T.Kelly (1979) : *Starch Degradating Enzymes of Microbial Origin.* [w:] *Progress in Industrial Microbiology.* Red. M.J.Bull. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, t.15, s.87.
11. A.Paszczyński, J.Fiedurek, J.Ilczuk, G.Ginalska (1985) : *The Influence of Proteases on the Activity of Glucoamylase from Aspergillus niger C.* Appl. Microbiol. Biotechnol. **22**, 434.
12. E.Yoshino, S.Hayashida (1978) : *Enzymatic Modification of Glucoamylase of Aspergillus avomori var. Kawachi.* J. Ferment. Technol. **56**, 289.
13. S.Hayashida, E.Yoshino (1978) : *Formation of Active Derivatives of Glucoamylase I During the Digestion with Fungal Acid Protease and — Mannosidase.* Agric. Biol. Chem. **42**, 927.
14. J.Holló, E.Laszló, A. Hoschke (1983) : *Enzyme Engineering in Starch Industry.* Starch/Stärke **35**, 169.
15. J.Holló, E.Laszló, A.Hoschke (1981) : *Biotechnical Problems of Isoglucose Production.* Part 4 : *Production and Characterization of Immobilized Glucoamylase.* Starch/Starke **33**, 52.
16. L.A.Iwanowa, S.W.Jelczic (1982) : *Swojstwa preparatów immocilizowanych glukoamyłaz.* Ukr. Biochim. Ż. **54**, 331.
17. J.Łobarzewski, A.Paszczyński, T.Wolski, J.Fiedurek (1984) : *Keratin and Polyamide-Coated Inorganic Matrices as Suppors for Glucoamylase Immobilization.* Biochem. Res. Comm. **121**, 220.
18. F.Shiraishi, K.Kawakami. K.Kusonoki (1985) : *Kinetics of Condensation of Glucose into Maltose and Isomaltose in Hydrolysis of Starch by Glucoamylase.* Biotech. Bioeng. **27**, 498.
19. S.Adachi, Y.Ueda, K.Hashimoto (1984) : *Kinetics of Formation of Maltose and Isomaltose through Condensation of Glucose by Glucoamylase.* Biotech. Bioeng. **26**, 121.
20. K.Kulp (1975) : *Carbohydrases.* [w:] *Enzymes in Food Processing.* Red. G.Reed. Academic Press, New York, Syn Francisco, London, s. 53.
21. J.F.Kennedy, J.M.S.Cabral, B.Kalogerakis (1985) : Comparison of Action Patterns of Degradet Substrate : a Critical Examination of Reversion Products. Enzyme Microb. Technol. 7, 22.
22. D.D.Lee, G.K.Lee, P.J.Reilly, Y.Y.Lee (1980) : *Effect of Pore Diffusion Limitation on Dextrin Hydrolysis by Immobilized Glucoamylase.* Biotech. Bioeng. **22**, 1.

Bożena Wawrzyniak, Jerzy Krauze, Jerzy Łobarzewski

UNIERUCHAMIANIE KRAJOWYCH PREPARATÓW GLUKOAMYLAZY NA AKRYLOWYM NOŚNIKU VINYLAFF 818

SUMMARY

An examination was carried out of Polish preparations of glucoamylase from A. niger (preparation I) and from A. awamori (preparation II) both in soluble forms and immobilized by covalent bonding on the Polish acrylic carrier Vinylaff 818. Preparation I was of higher purity,

ist specific activity being seven times as high as that of preparation II. Its stability at 50 and 55°C was lower, however. Immobilization of both preparations resulted in the increase of thermostability within the temperature range 50-70°C.

Both soluble and immobilized forms of preparations I and II hydrolyzed maltodextrin solutions (DE 24) with the yield 93-94%. This relatively low yield was due to the process of reversion, what was more pronounced with the immobilized preparations.

The operational stability of preparations I and II immobilized on Vinylaff 818 was relatively high. When applied in a column reactor for continuous hydrolysis of maltodextrin at 50°C they retained nearly 100% activity for 50 and 45 days, respectively. On 26-day usage in a stirred reactor preparation II was found to retain 90% of its initial activity. However some mechanical destruction of the carrier was observed.

РЕЗЮМЕ

Отечественные препараты глюкоамилазы, полученные из A.niger (препарат I) и A.awamori (препарат II), исследовались в растворимой форме и после иммобилизации их методом ковалентного связывания с акриловым носителем отечественного производства Vinylaff 818.

Препарат I характеризовался более высокой степенью очистки, а его удельная активность была в 7 раз выше активности Препарата II. После длительного воздействия температур 50° и 55°С более стабильным оказался Препарат II. Иммобилизация привела к росту термостабильности обоих препаратов в интервале температур 50° — 70°С.

Растворимыми и иммобилизованными препаратами I и II гидролизовался растворов мальтодекстрина (DE 24) с эффективностью 93—94%. Достижению более высокой эффективности препятствовали реверсивные процессы, которые после иммобилизации препаратов происходили более интенсивно.

Операционная стабильность препаратов I и II, иммобилизованных на носителе Vinylaff 818 была относительно высокой. В реакционной колонне для непрерывного гидролиза мальтодекстрина при темп. 50°С они сохраняли почти 100% активность в течение соответственно 50 и 45 дней. Активность Препарата II, примененного в реакторе с мешалкой, но произошло „раскрошение" носителя.