

NENAD B. MILOSAVIĆ¹
RADIVOJE M. PRODANOVIĆ²
SLOBODAN M. JOVANOVIĆ³
VUK M. MAKSIMOVIĆ⁴
ZORAN M. VUJČIĆ²

¹IHTM, Centar za Hemiju,
Beograd

²Hemijski fakultet, Beograd

³Tehnološko-metalurški fakultet,
Beograd

⁴Centar za Multidisciplinarnu
Studiju, Beograd

NAUČNI RAD

547.458.68+66.094.941:664.2

KARAKTERIZACIJA I PRIMENA AMILOGLUKOZIDAZE IMOBILIZOVANE NA MAKROPOROZNOM POLI(GMA-co-EGDMA) U SIMULIRANIM INDUSTRIJSKIM USLOVIMA

U okviru ovoga rada prikazani su rezultati dobijeni izučavanjem termostabilnosti dva kovalentna imobilizata amiloglukozidaze na makroporoznom poli(GMA-co-EGDMA), kao i njihova primena za hidrolizu skroba pri simuliranim industrijskim uslovima. U svim eksperimentima sa reaktorima, bilo šaržnim, bilo da se radi o reaktoru sa napakovanim slojem kao supstrat korišćen je 20 % (m/m) industrijski hidrolizat skroba. Oba imobilizata su pokazala povećanu termostabilnost u odnosu na rastvoreni enzim, ali je ona značajno veća kod imobilizata dobijenog perijodatnom metodom. Prilikom upotrebe u bač reaktoru imobilizati su deset puta brže dali krajnje DE vrednosti slične onoj koju daje rastvorni enzim. Količina i sastav šećera je po završenoj hidrolizi analiziran i HPLC-om. Određena je operativna stabilnost perijodatno imobilizovane amiloglukozidaze u reaktoru sa napakovanim slojem i pri tome je konstatovano da imobilizat ne gubi aktivnost u trajanju od 28 dana.

Amiloglukozidaza (AMG, glukamilaza, E.C. 3.2.1.3) hidrolizuje alfa glukozidnu vezu u skrobu i njegovim parcijalnim hidrolizatima. Enzim je u rastvornom obliku jedan od najkorišćenijih industrijskih enzima. Prvenstveno se upotrebljava u industriji skroba, pri hidrolizi maltodekstrina u sirupe koji sadrže glukozu i maltozu. Navedeni sirupi imaju široku primenu u prehrambenoj industriji, a njihova potrošnja se iz godine u godinu uvećava. Široka primena AMG u prehrambenoj industriji je otežana visokom cenom enzima. Enzim se ne može lako odvojiti od proizvoda i nemoguće ga je koristiti više puta, a dolazi i do zaprljanja proizvoda enzimom [1].

Imobilizacija enzima je danas uobičajen prilaz za dobijanje derivata enzima koji se može koristiti više puta. Imobilizacija se generalno izvodi adsorpcijom ili kovalentnim vezivanjem za čvrsti nosač, zarobljavanjem u polimernim supstancijama kao što su poliakrilamid ili enkapsulacijom. Često, imobilizacija rezultuje povećanom stabilnošću enzima pri operativnim uslovima. Imobilizacija takođe dopušta upotrebu enzima u reaktorima različitog dizajna kao što su bač reaktor ili reaktor sa napakovanim slojem. Iz navedenih razloga dolazi do značajne uštede u kapitalnim i energetskim troškovima kao i do bolje logistike unutar samog procesa koji koristi imobilizovane enzime [2]. Dodatno imobilizacija povećava čistoću finalnog proizvoda, smanjuje potrošnju samog enzima kao i zapreminu suda u kome se odigrava enzimska reakcija.

Imobilizat se sastoji od aktivnog enzima i inertnog nosača. Komponenta koja značajno doprinosi osobinama imobilizata je nosač [3]. Nosač bi morao biti netoksičan, sa velikom površinom koja je adekvatna za odvijanje enzimske reakcije, tj. da obezbedi što je moguće bolji difuzioni transport supstrata i proizvoda. Pobo-

ljanja koja su na polju imobilizacije postignuta poslednjih godina delom imaju oslonac u razvoju nosača za imobilizaciju. Generalno se nosači za imobilizaciju mogu podeliti na porozne i neporozne. Neporozni nosači imaju jako sitne čestice i veliku aktivnu površinu po masi nosača. Kod ovakvih tipova nosača difuzija supstrata i proizvoda je jako olakšana zato što se enzim nalazi na spojašnjoj površini nosača. Ogroman nedostatak ovoga tipa nosača je nemogućnost njihove primene u reaktorima sa napakovanim slojem, kao i otežanog odvajanja iz reakcionih smeša. Ovi nedostaci proizilaze iz veličine čestica koje moraju biti jako sitne kako bi obezbedile što je moguće veću aktivnu površinu za imobilizaciju enzima.

Drugi tip nosača za imobilizaciju enzima ili mikroorganizama su porozni neorganski i organski nosači. Od organskih nosača naročito su pogodni makroporozni kopolimeri. Ovaj tip nosača ima veoma veliku aktivnu površinu pogodnu za imobilizaciju enzima, kao i veličinu pora koju je moguće ciljano varirati u toku same sinteze nosača [16]. Ovaj tip nosača se najčešće dobija suspenzionom kopolimerizacijom izabranih monomera od kojih bar jedan ima dve ili više funkcionalnih grupa. Danas su dva najzastupljenija tipa makroporoznih nosača nosači na bazi polistirena i oni koji u osnovi svoje strukture imaju metakrilate. U poslednje vreme se kopolimeri na bazi metakrilata, a naročito glicidilmetakrilata, sve češće koriste kao nosači za imobilizaciju enzima zato što su otporni na mikrobiološku razgradnju, a imaju i veoma dobru hemijsku i mehaničku stabilnost [3–5]. Prednost makroporoznih kopolimera na bazi glicidilmetakrilata u odnosu na polistirenske nosače je povećana hidrofilitet i postojanje epoksidne grupe koja je jako podesna za naknadne modifikacije nosača.

Velika praktična važnost amiloglukozidaze opravdava veliki broj radova koji za tematiku imaju njenu imobilizaciju na raznim nosačima. Opisana je imobilizacija amiloglukozidaze adsorpcijom na aktivnom uglju [6], zarobljavanjem u gelovima [2,7–9], na jonoizmjenjivačkim

Adresa autora: N.B. Milosavić, IHTM, Centar za hemiju, Beograd

Rad primljen: Septembar 15, 2004

Rad prihvaćen: Oktobar 11, 2004

smolama [1], kao i kovalentnim vezivanjem za nosač [3,10]. Pokazano je da se imobilizacijom glukoamilaze značajno povećava njena stabilnost [11,12], kao i da se prelaskom sa rastvorne forme enzima na imobilizovanu u procesu proizvodnje ukupni troškovi smanjuju za 33% [13].

Kovalentna imobilizacija enzima dovodi do povećane termostabilnosti, kao i da smanjenja denaturacije tokom upotrebe. Kolika će ova poboljšanja biti zavisi od prirode enzima, vrste nosača i metode imobilizacije [10]. U ranijim radovima je pokazano da se na kopolimeru glicidil metakrilata i etilenglikoldimetakrilata – poli(GMA-co-EGDMA) pomoću glutaraldehida ili perjodatnog metodom može izvesti vrlo uspešna kovalentna imobilizacija invertaze i glukoamilaze [14,15]. U okviru ovoga rada je ispitana mogućnost primene već opisanih kovalentnih imobilizata glukoamilaze u različitim tipovima reaktora pri uslovima koji simuliraju one u industriji skroba.

EKSPERIMENTALNI DEO

Materijal i hemikalije

Industrijski preparat glukoamilaze (AMG 300L) je dobijen od firme Mapol (Varšava). Liofilizovani enzim je imao specifičnu aktivnost od 134 U/mg proteina.

Glicidil metakrilat i etilenglikoldimetakrilat su proizvodi firme Rohm (Darmstad).

Parcijalni hidrolizat skroba je dobijen od skrobare Jabuka (pančevo). Nosi oznaku "Slado sirup" i predstavlja komercijalni proizvod.

Natrijum hidroksid koji je korišćen za pripremu mobilne faze pri HPLC analizi nastalih šećera je bio sa niskim sadržajem karbonata i proizvod je firme J.T. Deventer (Holandija).

Ostale korišćene supstancije su bile od firme Merck (Nemačka).

Sinteza polimera

Makroporozni kopolimer je dobijen suspenzionom kopolimerizacijom glicidilmetakrilata i etilenglikoldimetakrilata po proceduri koja je detaljno opisana u ranije publikovanom radu [16]. Živin porozimetar, Model 2000 Carlo Erba je korišćen za određivanje parametara porozne structure sintetizovanog kopolimera.

Aktivacija polimera

Polimer veličine čestica od 150–500 μm je modifikovan 1 M 1,2-diaminoetanom na 60°C 4 h na pH 10. Nakon modifikacije polimer je ispran nekoliko puta vodom i određena mu je koncentracija amino grupa titracijom 0,01 M HCl u 0,5 M KCl.

Imobilizacija enzima

Rastvor glukoamilaze, nakon aktivacije glutaraldehidom, je inkubiran sa aktiviranim poli(GMA-co-EG-

DMA) po prethodno publikovanoj proceduri [17]. Drugi kovalentni imobilizat je dobijen tako što smo sam enzim aktivirali oksidujućim njegov ugljeno hidratni deo natrijummeta-perjodatom i tako aktivirani enzim pomešali sa aktiviranim poli(GMA-co-EGDMA), kao i u prethodnom slučaju. Detaljna procedura je objavljena ranije [15].

Merenje enzimske aktivnosti

Aktivnost rastvorne glukoamilaze je određivana tako što se u izabranim vremenskim intervalima uzima alikvot iz reakcione smeše i određuje mu se sadržaj nastalih redukujućih šećera dinitrosalicilatnom metodom [18]. Enzimska reakcija se odvijala na 60°C u 1% (m/v) rastvora skroba na pH 4,5.

Određivanje aktivnosti imobilizovanih preparata glukoamilaze, kako glutaraldehidnog tako i onog dobijenog perjodatnom metodom, je urađeno merenjem 25 mg određenog imobilizata koji se doda u 25 mL 4% (m/v) rastvora skroba u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5. Reakcija se odvija pri konstantnom mešanju i nakon određenog intervala se uzimaju alikvoti za određivanje nastalih redukujućih šećera. Nastali redukujući šećeri su određivani kao i u slučaju rastvornog enzima.

Jedna jedinica glukoamilaze je ona količina enzima koja oslobodi 1 μmol redukujućih šećera, obračunatih na glukozu, iz skroba za 1 minut na pH 4,5 i 60°C.

Određivanje termostabilnosti

Brzina inaktivacije rastvornog enzima i imobilizovanih preparata je ispitivana u 50 mM natrijum acetatnom puferu pH 4,5 na 60°C. U određenim vremenskim intervalima uzimani su alikvoti i u njima je određivana zaostala enzimska aktivnost.

Hidroliza skroba u šaržnom reaktoru

Hidroliza skroba je urađena inkubiranjem 10 mL 20% (m/m) rastvora hidrolizata skroba u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5 i 1 mg rastvorne glukoamilaze na 40°C pri konstantnom mešanju. Kada se radi o imobilizovanim preparatima glukoamilaze eksperiment je urađen pri istim uslovima kao i prethodni samo što je dodavano 0,3 g vlažnog imobilizata. U oba slučaja alikvoti od 10 μL su uzimani u određenim vremenskim intervalima za određivanje redukujućih šećera. Po završetku reakcije uzeti su i uzorci kojima je pored redukujućih šećera urađena i analiza saharidnog sastava pomoću HPLC.

Određivanje operativne stabilnosti u reaktoru sa napakovanim slojem

Eksperimenti su urađeni u termostatornoj staklenoj koloni zapremine 10 mL. U kolonu se uvodi 20% (m/m) hidrolizat skroba pri konstantnom protoku od 8 bV/h (bed volume/hours) na 40°C. Na dnevnoj bazi, u trajanju od 28 dana, se uzimaju alikvoti po prolasku sup-

strata kroz kolonu i određivan je sadržaj redukujućih šećera.

Analiza saharidnog sastava reakcione smeše pomoću HPLC

Kada se dostigne plato u hidrolizi skrobnog hidrolizata uzimani se uzorci za HPLC analizu tako što se početna reakciona smeša razblaži 7500 puta vodom i analizira. Korišćen je Waters Breeze hromatografski sistem (Waters, Milford, MA, USA) koji sadrži binarni sistem pumpi, termostatirani odeljak za kolonu i elektrohemijski detektor (Waters, Milford, MA, USA). Razdvajanje šećera je urađeno na koloni CarboPac PA 1 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) 250x4 mm sa odgovarajućom predkolonom. Šećeri su eluirani 200 mM rastvorom NaOH u trajanju od 20 minuta pri protoku od 1,0 mL/min i konstantnoj temperaturi od 30°C.

REZULTATI I DISKUSIJA

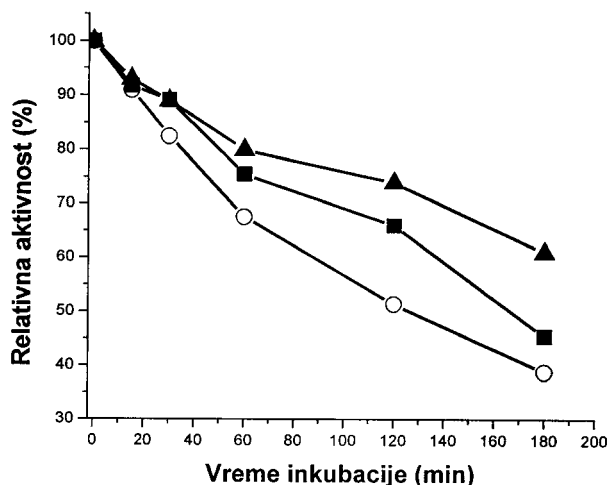
Za imobilizaciju amiloglukozidaze smo koristili čestice makroporoznog poli(GMA-co-EGDMA) od 150–500 um. Korišćeni makroporozni kopolimer nosi oznaku SGE 10/12 i ima srednji prečnik pora od 53 nm i specifičnu površinu od 50 m²/g. Nakon postupka aktivacije polimer je imao koncentraciju amino grupa od 1,2 mmol/g suvog polimera. Na polimer sa navedenim karakteristikama je imobilizovana amiloglukozidaza na dva različita načina po procedurama koje su objavljene ranije [15,16]. Karakteristike imobilizata i rastvorne glucoamilaze koje smo koristili u ovom radu su prikazane u tabeli 1.

Tabela 1. Karakteristike rastvorne i dva preparata imobilizovane amiloglukozidaze

Table 1. Properties of the soluble and two forms of immobilized amyloglucosidase

Amiloglukozidaza	Specifična aktivnost (U/g)	Vezani proteini (mg/g)	K _m (%)	Temperaturni optimum (°C)	pH optimum
Rastvorna	–	–	0,22	65	4,5
Glutaraldehidni imobilizat	750	35	1,28	70	4,5
Perjodadni imobilizat	1100	97	1,22	70	4,5

Iz tabele 1 se vidi da su dva kovalentna imobilizata amiloglukozidaze imala veće vrednosti za K_m (Michaelis–Menten–ova konstanta), kao i temperature optime od rastvornog enzima dok je pH optimum po imobilizaciji ostao nepromenjen. Imobilizat koji je dobijen nakon imobilizacije perjodatom oksidovane amiloglukozidaze pokazao je veću specifičnu aktivnost od onoga koji je dobijen imobilizacijom preko glutaraldehida, što je i potvrđeno većom količinom vezanih proteina.



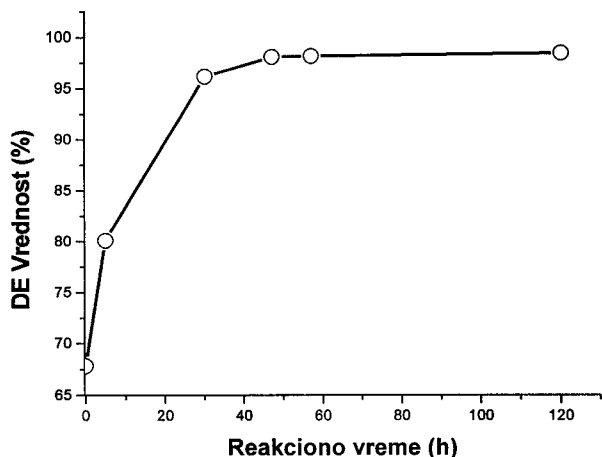
Slika 1. Zavisnost zaostale aktivnosti rastvorne i dve forme imobilizovane glucoamilaze od vremena inkubacije na 60°C, 50 mM acetatni pufer pH 4,5. ▲ – imobilizat dobijen perjodatom, ■ – imobilizat dobijen glutaraldehidnom metodom, ○ – rastvorna amiloglukozidaza

Figure 1. The dependence of residual activity on the time of incubation at 60°C, 50 mM acetate buffer pH 4.5. ▲ – periodate immobilization, ■ – glutaraldehyde immobilization, ○ – soluble amyloglucosidase

Termostabilnost slobodne i dve forme imobilizovane amiloglukozidaze

Imobilizatima sa karakteristikama koje su navedene u tabeli 1 određena je termostabilnost i upoređena sa rastvornim enzimom. Određena promena relativne aktivnosti sa vremenom inkubacije, odnosno kinetika inaktivacije imobilizata kao i rastvornog enzima je prikazana na slici 1.

U odsustvu supstrata proces inaktivacije svih oblika enzima je relativno brz ali je ipak inaktivacija rastvornog enzima brža nego imobilizovanih formi. Da bi uporedili brzine inaktivacije, sa grafikom prikazanog na slici 1 očitana su vremena potrebna da određeni enzim izgubi 50% polazne aktivnosti. Te vrednosti su za rastvornu amiloglukozidazu 125 min, dok su za imobilizate 167 za glutaraldehidni, odnosno 250 minuta za perjodadni imobilizat. Podaci koji su dobijeni za rastvorni enzim su u skladu sa podacima koji su prijavljeni ranije [2,19], ali su u odnosu na pomenute autore dobijene značajno veće stabilnosti za imobilizovane oblike amiloglukozidaze. Termostabilnost se veoma često povećava kod kovalentnih imobilizata zato što je enzim zaštićen od denaturacije nastankom hemijske veze između enzima i nosača [20]. Stabilnost glutaraldehidnog preparata je dosta manja od one koju pokazuje perjodadni imobilizat. Povećana termostabilnost perjodatom oksidovane forme enzima je prijavljena u literaturi za invertazu [21]. Razlog za ovakvu razliku u termostabilnosti se verovatno nalazi u tome što pri oksidaciji perjodatom dolazi do dodatnog umrežavanja enzima što dovodi do njegove bolje stabilizacije.



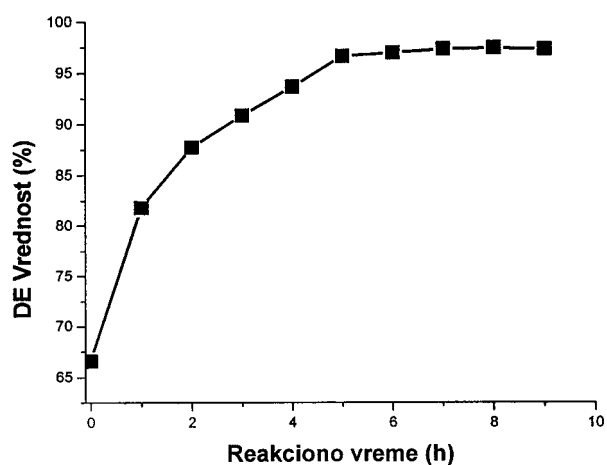
Slika 2. Kinetika hidrolize 20% (m/m) hidrolizata skroba rastvornom amiloglukozidazom na 40°C

Figure 2. Time course of 20% (w/w) starch hydrolysis with soluble amyloglucosidase at 40°C

Hidroliza skroba rastvornom i imobilizovanim amiloglukozidazama u šaržnom reaktoru

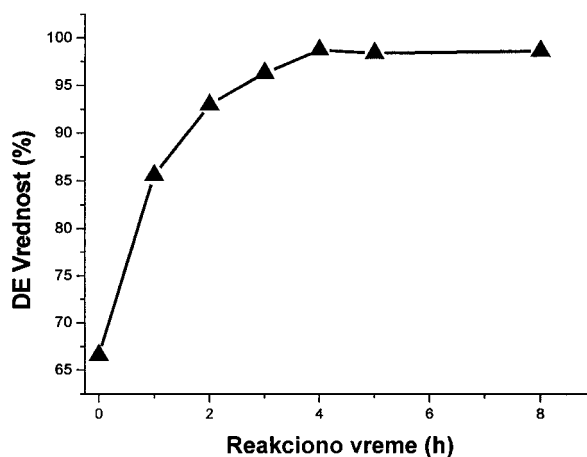
Hidroliza skroba do glukoze amiloglukozidazom kao i imobilizovanim preparatima je proučavana pod uslovima koji su slični onima na velikoj skali u industriji [21]. Promena DE-vrednosti sa vremenom, odnosno kinetika hidrolize skrobnog supstrata rastvornom amiloglukozidazom je prikazana na slici 2. DE-vrednost je dekstrozni ekvivalent, koji predstavlja meru redukujuće sposobnosti rastvora saharida obračunate na čistu glukozu. Skrob ima DE=0, a rastvor čiste glukoze DE=100.

Sa grafika se može uočiti da se plato u hidrolizi postiže nakon nekih 50-tak sati dajući DE vrednost od 98,5 što je u skladu sa kinetikom hidrolize u industriji [23]. Pri istim uslovima izučena je i kinetika hidrolize



Slika 3. Kinetika hidrolize 20% (m/m) hidrolizata skroba imobilizatom amiloglukozidaze dobijenim glutaraldehidnom metodom na 40°C

Figure 3. Time course of 20% (w/w) starch hydrolysis with glutaraldehyde immobilized amyloglucosidase at 40°C



Slika 4. Kinetika hidrolize 20% (m/m) hidrolizata skroba imobilizatom amiloglukozidaze dobijenim perijodatnom metodom na 40°C

Figure 4. Time course of 20% (w/w) starch hydrolysis with periodate immobilized amyloglucosidase at 40°C

skroba imobilizovanim enzimima i dobijeni rezultati su prikazani na slikama 3 i 4.

Sa slika 3 i 4 se može zaključiti da je promena DE-vrednosti sa vremenom pri hidrolizi delimično razgrađenog skroba imobilizovanim enzimima jako slične i da se dobijaju finalne DE vrednosti od 97,5 za glutaraldehidni imobilizat i 98,6 za imobilizat dobijen perijodatnom metodom. Iz navedenog se vidi da se sa perijodnim imobilizatom dobija za 1% veća DE-vrednost nego kada se koristi imobilizat glukoamilaze koji je dobijen imobilizacijom pomoću glutaraldehida, kao i da su obe DE-vrednosti bliske onim koje se dobijaju pri korišćenju rastvornog enzima [23].

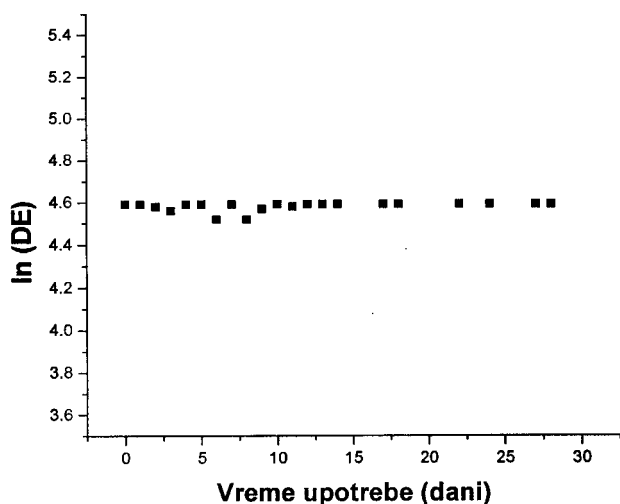
Operativna stabilnost

Za ovaj eksperiment korišćen je imobilizat dobijen perijodatnom metodom. Odabran je ovaj imobilizat zato što je imao veću specifičnu aktivnost, bolju konverziju (daje veću finalnu DE vrednost) i pokazao je veću termostabilnost. Operativna stabilnost je određivana pod uslovima opisanim u eksperimentalnom delu rada. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 5 u obliku zavisnosti prirodnog logaritma DE-vrednosti od vremena upotrebe imobilizata.

Rezultati prikazani na slici 5 ukazuju da korišćeni imobilizat ne pokazuje gubitak aktivnosti u navedenim uslovima primene u toku 28 dana. Uslovi pod kojima je hidroliza izvedena dobro simuliraju one u industriji. Određena operativna stabilnost korišćenog imobilizata u okviru ovoga rada je mnogo bolja od odgovarajućih vrednosti koje su navođene u do sada publikovanim radovima [24–26].

Rezultati analize hidrolizata skroba HPLC metodom

Karakterizaciju imobilizata smo uradili i HPLC analizom šećera nakon hidrolize polaznog supstrata rastvor-



Slika 5. Operativna stabilnost imobilizovane amiloglukozidaze u reaktoru sa napakovanim slojem

Figure 5. Operational stability of immobilized amyloglucosidase in a packed bed reactor

Tabela 2. HPLC analiza šećera nakon hidrolize rastvornom i imobilizovanim oblicima amiloglukozidaze

Table 2. Sugars HPLC analysis after hydrolysis with soluble and two forms of immobilized amyloglucosidase

Oznaka uzorka	Sadržaj maltoze % (m/m)	Sadržaj glukoze % (m/m)	Ostali di- i trisaharidi % (m/m)	DE
Početni uzorak	26,87	72,23	0,9	63±5
Rastvorni enzim	1,9	98,05	–	98,5
Glutaraldehidni imobilizat	3,1	96,9	–	97,3
Perjodatni imobilizat	2,8	97,1	–	98,6

nim i imobilizovanim glukoamilazama. Sumarno su rezultati dati u tabeli 2.

Iz tabele 2 se vidi da nakon hidrolize polaznog supstrata rastvorni enzim daje u proizvodu hidrolize najveći sadržaj glukoze, dok je imobilizat dobijen imobilizacijom glukoamilaze perjodatnom metodom nešto bolji od onoga koji je dobijen imobilizacijom sa glutaraldehidom.

ZAKLJUČAK

U radu je pokazano da se imobilizacijom glukoamilaze pomoću glutaraldehida i perjodatnom metodom na makroporoznom poli(GMA-co-EGDMA) dobijaju imobilizati sa povećanom termostabilnošću u odnosu na rastvorni enzim. Perjodatni imobilizat amiloglukozidaze je pokazao dva puta veću termostabilnost u odnosu na rastvorni enzim i nešto bolje karakteristike u bač reaktoru

od glutaraldehidnog imobilizata. Imobilizati amiloglukozidaze na poli(GMA-co-EGDMA) su tokom upotrebe pokazali dobre kako mehaničke tako i hemijske osobine i pri primeni u reaktoru sa napakovnim slojem u trajanju od 28 dana imobilizat nije pokazao promenu aktivnosti.

Dobra svojstva amiloglukozidaze imobilizovane perjodatnom metodom na makroporoznom kopolimeru poli (GMA-co-EGDMA) ukazuju na mogućnost primene ovog imobilizata u industrijskoj proizvodnji glukoze iz skroba.

LITERATURA

- [1] I.D. Ruadza, N.A. Zhrebtsov, Y.I. Slepokurova, V.F. Selmenev, I.V. Shkutina, O.F. Stoyanova, *Appl. Biochem. Microb.* **37** (2) (2001) 178.
- [2] I. Roy, N. M. Gupta, *Enzyme Microb. Technol.* **34** (2003) 26.
- [3] M.Y. Arica, N.G. Alaeddinoglu, V. Hasirci, *Enzyme Microb. Technol.* **22** (1998) 152.
- [4] R. Prodanović, S. Jovanović, Z. Vujčić, *Biotechnol. Lett.* **23** (2001) 1171.
- [5] R.M. Prodanović, N.B. Milosavić, S.M. Jovanović, Z.M. Vujčić, *Hemijska industrija* **57** (11) (2003) 536.
- [6] A.S. Rani, M.L.M. Das, S. Satyanarayana, *J. Mol. Catal. B* **10** (2000) 471.
- [7] A. Tanriseven, Y.B. Uludag, S. Dogan, *Enzyme Microb. Technol.* **30** (2002) 406.
- [8] V.H. Vandel, M.D. Janić, M. Milosavljević, V. Đermanović, A.S. Galineo, *Glasnik Hemijskog društva Beograd*, **43** (9) (1978) 579.
- [9] Y. Ge, Y. Wang, H. Zhou, S. Wang, Y.Tong, W.Li, *J. of Biotech.* **67** (1999) 33.
- [10] M.Y. Arica, H. Yavuz, S. Patir, A. Denizli, *J.Mol.Catal. B* **11** (2000) 127.
- [11] A.A. Klyosov, V.B. Gerasimas, *Biochim. Biophys. Acta.* **571** (1979) 162.
- [12] K.B. Storey, J.A. Duncan, A.C. Charkabarti, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **23** (1990) 221.
- [13] G.A. Kovalenko, O.V. Komova, A.V. Simakov, V.V. Khomov, N.A. Rudina, *J. Mol. Catal.* **182-183** (2002) 73.
- [14] R. Prodanović, S. Jovanović, Z. Vujčić, *Acta Periodic.Technol.* **32** (2001) 151.
- [15] N. Milosavić, R. Prodanović, S. Jovanović, I. Novaković, Z. Vujčić, *J. Ser. Chem. Soc.*, in press
- [16] S.M. Jovanović, A. Nastasović, N.N. Jovanović, K. Jeremić *Mater. Sci. Forum* **214** (1996) 155.
- [17] N. Milosavić, R. Prodanović, S. Jovanović, Z. Vujčić, *Acta Periodic. Technol.*, in press
- [18] G.L. Miller, *Anal. Chem.* **31** (1959) 426
- [19] B. Szajani, G. Klamar, L. Ludvig, *Enzyme Microb. Technol.* **7** (1985) 488.
- [20] M.F. Chaplin, C. Bucke, *Fundamentals of enzyme kinetics in enzyme technology*, Cambridge University Press, London 1990, 13-16.
- [21] R. Prodanović, M. Simić, Z. Vujčić, *J. Ser. Chem. Soc.* **68** (2003) 819.
- [22] B. Solomon, Y. Lewin, *Biotechnol. Bioeng.* **16** (1974) 1161.

- [23] C. Carpio, P. Gonzalez, J. Ruales, F. Batista-Viera, *Food Chemistry* **68** (2000) 403.
- [24] P.J. Slininger, G.F. Fanta, T.P. Abbott, *Biotechnol. Bioeng.* **31** (1988) 759.
- [25] A. Wojcik, J. Loberzewski, T. Blaszcynska, J. Fiedurek, *Biotechnol. Bioeng.* **30** (1987) 983.
- [26] E. Miller, H. Sugier, *Acta Biotechnol.* **8** (1988) 503.

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF AMYLOGLucosidase IMMOBILIZED ON THE COPOLYMER OF ETHYLENE GLYCOL DIMETHACRYLATE AND GLYCIDYL METHACRYLATE IN SIMULATED INDUSTRIAL CONDITIONS

(Scientific paper)

Nanad B. Milosavić¹, Radivoje M. Prodanović², Slobodan M. Jovanović³,
Vuk M. Maksimović⁴, Zoran M. Vujčić²

¹Department of Chemistry, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Belgrade

²Faculty of Chemistry, Belgrade

³Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade

⁴Center for Multidisciplinary Studies, Belgrade

The application of amyloglucosidase immobilized on the macroporous copolymer of ethylene glycol dimethacrylate and glycidyl methacrylate (poly (GMA-co-EGDMA)) in an enzyme reactor was shown. The higher thermostability of immobilized glucoamylases than the soluble one was demonstrated. Immobilized amyloglucosidase obtained by the periodate method shows two times higher thermostability than the soluble form. Glucoamylases immobilized on poly (GMA-co-EGDMA) have good mechanical and chemical features in the reactor and when applied in a continuous flow reactor for 28 days no changes are observed. In this period periodate immobilized amyloglucosidase shows no decrease in activity. It showed potential for the continuous production of glucose from starch over a prolonged period of time.

Key words: Glucoamylase • Enzyme reactor • Periodate • Poly(GMA-co-EGDMA) • Immobilization • Stability •

Ključne reči: Glukoamilaza • Enzimski reaktor • Perjodat • Poli (GMA-co-EGDMA) • Imobilizacija • Stabilnost •