

Studiul cinetic al procesului de zaharificare a maltodextrinei, utilizând amiloglucozidază immobilizată pe membrane prin legare covalentă

GHEORGHE BĂTRÎNESCU^{1*}, DANA GARGANCIUC², OVIDIU POPA³, MIHAELA OLTEANU⁴

¹ Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Ecologie Industrială, București, ^aos. Panduri, Nr. 90-92, 050663, București, România

² Agenția Regională pentru Protecția Mediului București, Str. Al. Borneanu, Nr. 4, 060758, București, România

³ Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară-Facultatea de Biotehnologii, Bdul. Mărăști, Nr. 59, 011464, București, România

⁴ Universitatea București, Facultatea de Chimie, Bdul. Regina Elisabeta, Nr. 4-12, 030018, București, România

The membranes with immobilized enzymes have a double role, as a separation barrier and a biocatalyst. The membranes immobilize the enzymes in insoluble state by direct binding (e.g. covalent binding) or in soluble state, by adsorption at the separation surface, depending on the polymer nature and the membrane structure. The researches purpose was to emphasize the biocatalytic activity of a membrane-immobilized enzyme system. This paper relates the original results from the kinetic study of maltodextrine saccharification process. The dextrines are obtained by enzymatic hydrolyse of starch with α -amilase. The process took place into an enzymatic membrane bioreactor equipped with an active membrane from brominated polyphenyleneoxide with 28% bromination degree, having amyloglucosidase covalently immobilized. In this bioreactor carries on the conversion of dextrines to maltose and glucose, under the biocatalytic action of amyloglucosidase.

Keywords: enzymes, maltodextrine saccharification process, starch, amilase, amyloglucosidase

Biocataliza enzimatică se aplică frecvent în diverse domenii de activitate: industria alimentară, chimico-farmaceutică, medicină umană și veterinară, în cercetare, pentru explicarea unor procese biochimice esențiale și altele [1].

În majoritatea proceselor în care intervine biocataliza enzimatică se utilizează enzime solubile și ca urmare procesele de acest fel decurg discontinuu. La sfârșitul procesului, catalizatorul introdus (enzima solubilă) nu mai poate fi recuperat. Apare astfel o diferență față de cataliza clasică în care un catalizator este utilizat de "n" ori, până la epuizarea acestuia [2].

Enzimele immobilizate au deschis noi perspective în domeniul proceselor în care intervin biocatalizatori enzimatici, făcând posibilă desfășurarea acestora în sistem continuu, tratarea în condiții optime a unor soluții diluate, dispariția enzimei din mediul rezultat după transformare și evitarea formării de produse secundare nedorite.

Rolul dublu al membranelor cu enzime immobilizate, de separare și de biocatalizator, le fac din ce în ce mai atractive pentru procesele de biocataliză enzimatică. În funcție de natura polimerului din care se obțin și de structura lor, membranele immobilizează enzimele în stare insolubilă prin legare directă sau în stare solubilă la suprafața de separare [3].

În lucrare sunt prezentate rezultate originale obținute la studiul cinetic al procesului de zaharificare a maltodextrinei. Procesul s-a realizat într-un bioreactor membranar enzimatic de concepție proprie din punct de vedere constructiv și funcțional, echipat cu o membrană activată din polifenilenoxid bromurat [4], cu grad de bromurare 28%, având amiloglucozidază immobilizată prin legare covalentă. Reacția care are loc în acest bioreactor este de transformare a dextrinelor (obținute prin hidroliza

enzimatică a amidonului, cu α -amilază), sub acțiunea amiloglucozidazei, în maltoză și glucoză [5]:

Scopul cercetărilor a fost acela de a evidenția capacitatea biocatalitică a sistemelor membrană-enzimă immobilizată.

Parte experimentală

Materiale utilizate

- Bioreactor prevăzut cu manta de încălzire și cu recirculare internă;

- Membrană funcționalizată (PPOBr 28%), cu amiloglucozidază immobilizată - activitate enzimatică 5,26 U/cm²;

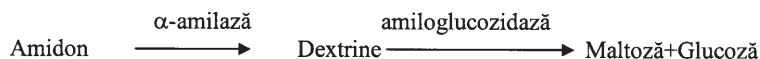
- Maltodextrină.

Metode

Determinarea activității amiloglucozidazice după metoda *SUMZYME* - Activitatea amiloglucozidazei sau puterea de zaharificare a amiloglucozidazei este echivalentă cu cantitatea de enzimă care eliberează 10 mg zahăr reducător (calculat ca glucoză, după metoda *SCHORL*) din soluția de amidon 2% în 10 min. la 42°C. .

Mod de lucru

În incinta bioreactorului (fig. 1) la fiecare experiment în parte se introduc câte 500 mL maltodextrină de concentrație impusă, care se termostatează la temperatura dorită. Prin deschiderea celor două robinete și pornirea pompei de alimentare a bioreactorului se recirculă soluția de maltodextrină (MD) prin membrana cu enzimă immobilizată timp de 30 min. La sfârșitul timpului de reacție se ia o probă din masa de reacție și se determină conținutul de zaharuri reducătoare totale. Pe baza acestuia și a conținutului de zaharuri reducătoare inițiale (determinat la soluția cu care a fost alimentat bioreactorul) se calculează parametrii cinetici.



* email : ecoind@incdecoind.ro

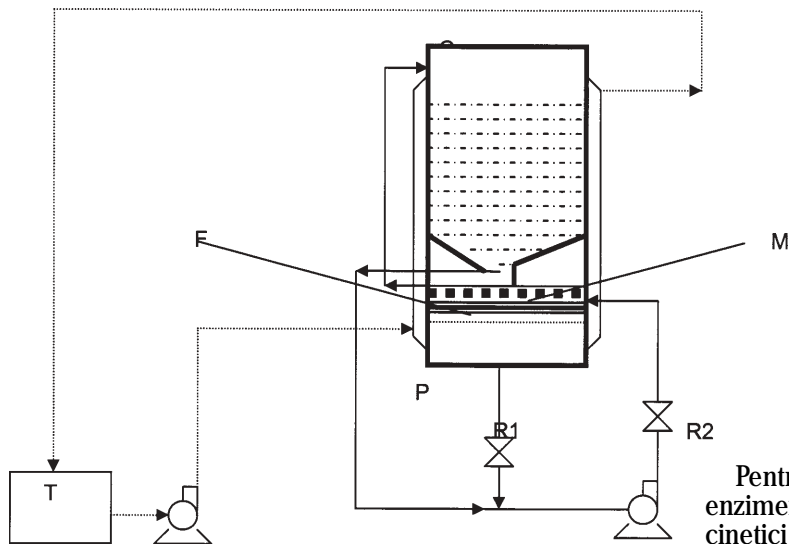


Fig. 1. Schema bioreactorului membranar enzimatic pentru zaharificarea maltodextrinei
M - membrană cu enzimă imobilizată; F - frită pentru susținerea membranei; C - concentrat;
P - permanent; T - vas termostatat
R1, R2 - robinete

Rezultate și discuții

Pentru studiul cinetic al reacției enzimaticе s-a plecat de la ecuația Michaelis-Menten. Viteza reacției enzimaticе este:

$$v = v_{\max} / (K_M / C_s + 1) \quad (1)$$

Această ecuație a permis determinarea valorilor v_{\max} și K_M pe baza variației vitezei inițiale de reacție prin modificarea concentrației de substrat.

Ecuația de mai sus a fost liniarizată sub forma ecuației Eadie-Hofstee:

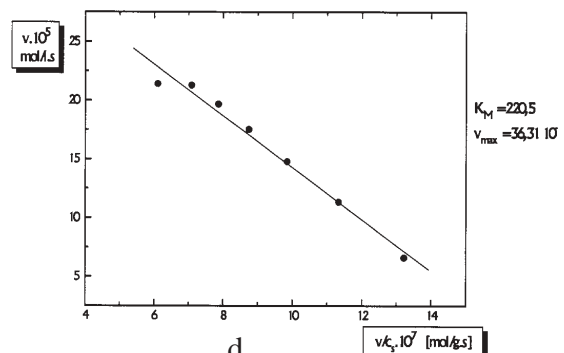
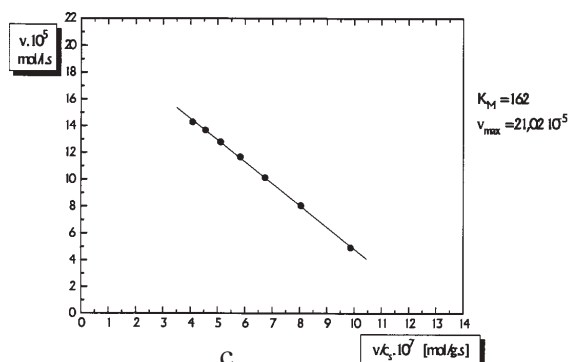
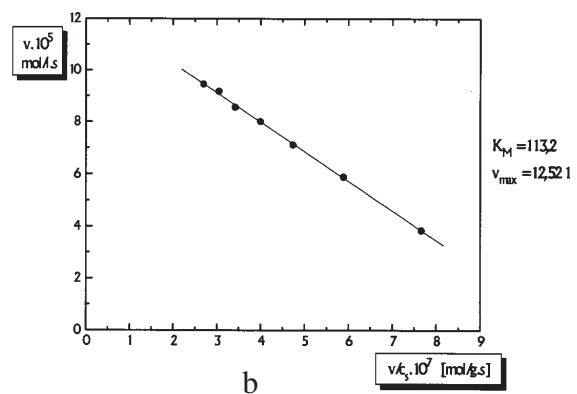
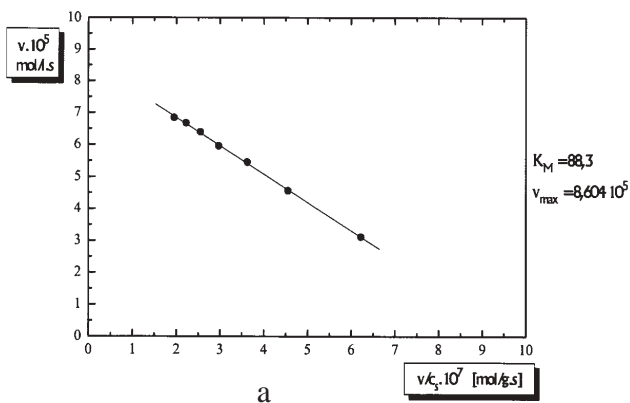
$$v = v_{\max} - v \cdot K_M / C_s \quad (2)$$

Din reprezentarea grafică pentru fiecare set de experimente a dependenței $v=f(v/C_s)$ se obține valoarea vitezei maxime prin intersecția dreptei obținute cu axa ordonatei și respectiv valoarea constantei Michaelis-Menten (K_M) din panta dreptei respective.

Pentru punerea în evidență a activității enzimaticе a enzimei imobilizate și pentru determinarea parametrilor cinetici s-a utilizat ca substrat maltodextrină (MD) cu un echivalent în dextroză (DE) de 20%, obținută prin hidroliza controlată a amidonului cu ajutorul enzimei α -amilază. În scopul asigurării reproductibilității și comparării rezultatelor s-a preparat o cantitate mai mare de MD necesară realizării tuturor experimentelor.

Viteza de reacție pentru fiecare experiment în parte s-a determinat prin măsurarea concentrației de zaharuri reducătoare totale obținute după realizarea hidrolizei enzimaticе a MD cu enzima imobilizată. În cadrul fiecărui experiment hidroliza s-a realizat la același pH (5,5) și în același timp de reacție (30 min.). Variabilele au fost temperatura de reacție (40 - 65°C) și concentrația de substrat (50 - 350 g/L). S-a utilizat această exprimare a concentrației datorită imposibilității determinării masei moleculare medii a MD obținute. Acesta este și motivul pentru care unitatea de măsură a K_M este g/L.

Din datele obținute privind variația vitezei de reacție în funcție de concentrația de substrat la temperaturile de 40, 45, 50, 55, 60 și 65°C și aplicând ecuația Eadie-Hofstee s-au trasat graficele $v = f(v/C_s)$, reprezentate în figurile 2(a-f).



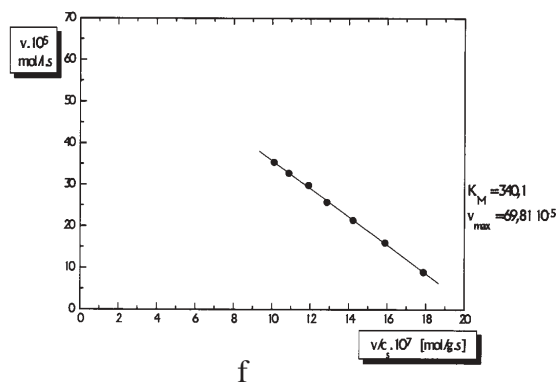
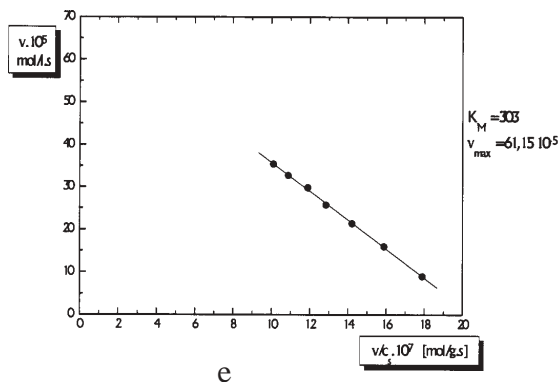


Fig. 2. Variația vitezei de reacție în funcție de concentrația de substrat
a) la 40°C; b) la 45°C; c) la 50°C; d) la 55°C; e) la 60°C; f) la 65°C

unde: v = viteza de reacție; C_s = concentrația de substrat.

Tipul enzimei	t (°C)	$v_{max} \times 10^5$ (mol/l.s)	K_M (g/l)
AMG - imobilizată	40	8,604	88,3
	45	12,52	113,2
	50	21,02	162
	55	36,31	220,5
	60	61,15	303
65	69,814	340,1	
AMG - solubilă	60	48,5	163,4

Tabelul 1
VALORILE PARAMETRIILOR CINETICI
(V_{MAX} și K_M) AI
AMILOGLUCOZIDAZEI (AMG)
IMOBILIZATE ȘI SOLUBILE

Pe baza datelor obținute și a graficelor corespunzătoare au fost calculate valorile v_{max} și K_M . Comparativ au fost determinați și parametrii cinetici ai enzimei solubile, la temperatura optimă de acțiune a enzimei, de 60°C. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

În cadrul experimentelor s-a determinat și timpul total de utilizare a amiloglucozidazei imobilizate. Presiunea în bioreactor a fost menținută constantă la $p = 2,5$ bar. După 4 reacții succesive, experimentele au fost oprite deoarece se constată că în ultimul proces de zaharificare activitatea enzimatică scade sub 50% față de valoarea inițială, în concordanță cu scăderea gradului de zaharificare.

Numărul optim de utilizări repetate ale membranei cu amiloglucozidază imobilizată este de trei. La a patra folosire are loc o scădere puternică a gradului de zaharificare, acesta ajungând la o valoare de 49% din gradul de transformare corespunzător primei utilizări. Scăderea se datorează atât colmatării membranei cât și inactivării enzimei imobilizate. Colmatarea membranei este pusă în evidență de scăderea fluxului de permeat iar inactivarea enzimei imobilizate de atingerea unui palier în evoluția gradului de zaharificare.

Concluzii

Rezultatele studiului cinetic pun în evidență faptul că viteza de reacție în procesul de zaharificare a maltodextrinei crește pe de o parte cu creșterea concentrației substratului, iar de pe altă parte cu creșterea temperaturii de reacție, aspecte caracteristice majorității enzimelor, atât solubile cât și imobilizate.

Viteza de reacție crește puternic în domeniul valorilor mici ale concentrației substratului, ajungând ca la valori foarte mari ale acestui parametru să se atingă un palier (viteza rămâne constantă). De asemenea, la temperaturi

mari (60-65°C) viteza de reacție este de aproximativ 2-3 ori mai mare decât cea pentru temperatura de 40°C.

Valorile parametrilor cinetici (v_{max} și K_M) ai amiloglucozidazei (AMG) imobilizate, la temperatura optimă de acțiune a enzimei (60°C), sunt mai mari decât cei ai enzimei în stare solubilă. Acest aspect evidențiază faptul că enzima imobilizată are, la această temperatură, performanțe biocatalitice superioare enzimei în stare solubilă.

Rezultatele obținute pun în evidență și faptul că procesele de difuzie nu sunt limitative într-o măsură foarte mare pentru enzima imobilizată studiată, ca urmare a concepției originale a bioreactorului membranar, din punct de vedere constructiv și funcțional. Acesta permite menținerea constantă a parametrilor de lucru prin aplicarea sistemului de curgere în regim tangențial.

Studiul cinetic realizat demonstrează o comportare foarte bună ca sistem catalitic a elementului central al bioreactorului – biocatalizatorul imobilizat.

Bibliografie

- CHEETHAM P.S.J., Handbook of Enzyme Biotechnology, Ed Wiseman, A. Chichester –New York-Ontario-Brisbane, 1985, p.105
- HAGEN H.A., PEDERSON, S., Enzymes in Industries, Gerhartz, W., Ed. VCH Publishers, New York, 1990
- BĂTRÎNESCU, GH., GARGANCIUC, D., ROMAN, G., Enzymatic conversion with immobilized enzymes membranes, European Membrane Society, XVI Annual Summer School, Vezprem, Hungary, 1999
- GARGANCIUC, D., BĂTRÎNESCU, GH., NECHIFOR, GH., OLTEANU, M., Mat. Plast., in press 2008
- ZARNEA, G., MENCINICOPESCHI, Gh., BRĂGĂREA, Ț. Bioingineria preparatelor enzimactice microbiene, Ed. Tehnică, București, 1980, p.293

Întriat în redacție: 26.03.2007