

IV. BIOTECHNOLOGIA, FERMENTI, PIZZEVIJE TEHNOLOGII

IV. BIOTECHNOLOGY, ENZYMES AND FOOD TECHNOLOGY

ИММОБИЛИЗАЦИЯ МАЛЬТОГЕНАЗЫ НА МИКРОСФЕРАХ ПРИВИТОГО ХИТОЗАНА

*С. Будрене**, *Т. Ромашкевич**, *И. Герасимчик**, *Ю. Амбразевичюте**,
*А. Любертене**, *А. Зубрене***, *Г. Денис***

*Вильнюсский университет, Вильнюс, Литва, E-mail: saulute.budriene@chf.vu.lt

**Биотехнологический институт, Вильнюс, Литва, E-mail: astzu@ibt.lt

IMMOBILIZATION OF MALTOGENASE ONTO GRAFTED CHITOSAN MICROSPHERES

*S. Budriene**, *T. Romaskevicius**, *I. Gerasimcik**, *J. Ambrazeviciute**,
*A. Liubertiene**, *A. Zubriene***, *G. Dienys***

*Vilnius University, Vilnius, Lithuania, E-mail: saulute.budriene@chf.vu.lt

**Institute of Biotechnology, Vilnius, Lithuania, E-mail: astzu@ibt.lt

ABSTRACT

Chitosan grafted copolymers were synthesized by initiating with cerium (IV) ammonium nitrate and using various molar ratios of chitosan and monomers such as poly(ethyleneglycol) methyl ether acrylate, poly(ethyleneglycol) methyl ether methacrylate and vinylpyrrolidone. Obtained grafted copolymers were used in immobilization of maltogenase. High activity of immobilized maltogenase was demonstrated.

Привитая сополимеризация различных мономеров на хитозане позволяет получить гибридные сополимеры, сочетающие свойства природного и синтетического полимера. Такие сополимеры в основном находят применение в качестве биоматериалов. Одна из перспектив в использовании хитозана и его привитых сополимеров – в качестве носителя для иммобилизации ферментов, применяемых в пищевой промышленности, так как они не токсичны, подвергаются биодеградации, биосовместимы с окружающей средой и отличаются антимикробными свойствами.

В данной работе для прививки на хитозан были использованы мономеры: поли(этиленгликоль)метилэфиракрилат (ПЭГМЭА, M_r 454), поли(этиленгликоль)метилэфирметакрилат (ПЭГМЭМА, M_r 300) и винилпирролидон (ВП, M_r 111). Реакцию проводили в инертной атмосфере в течении 2 ч при температуре 50°C, в качестве инициатора был использован церий аммоний нитрат (ЦАН). Извест-

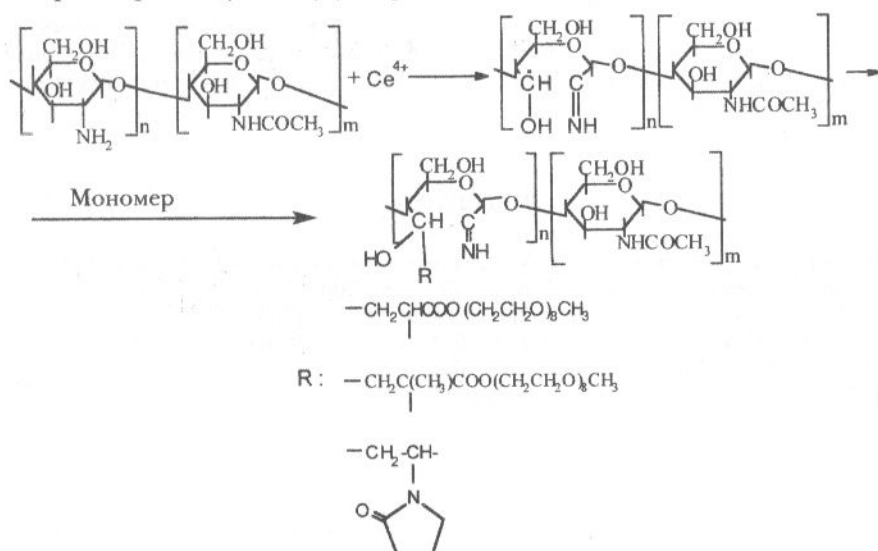
ны и другие инициаторы, такие, как пероксодисульфат калия [1], азобисизобутиронитрил [2], используемые в привитой сополимеризации на хитозан, однако преимущество ЦАН в том, что образование радикала в полимерной цепи хитозана и прививка мономера происходят селективно. Для прививки ПЭГМЭА и ВП был использован хитозан фирмы "Fluka", молекулярный вес которого 400000 и степень деацетилирования 72%, а в случае ПЭГМЭМА – хитозан (Fluka) с молекулярным весом 70000 и степенью деацетилирования 77%. В Таблице приведены результаты прививки мономеров на хитозан.

Результаты прививки мономеров на хитозан

Сополимер	Соотношение хитозана и мономера, мол. соотн.	ОН, %	NH ₂ , %	Степень прививки, %	Выход продукта, %
Хитозан-графт-	1:1	18,9	6,2	3,5	22,8
ПЭГМЭА	1:5	18,1	4,9	56,3	9,4
–”–	1:10	17,6	4,0	93,9	6,0
Хитозан-графт-	1:1	22,4	6,8	–	38,3
ПЭГМЭМА	1:3	19,7	6,3	36,8	24,8
–”–	1:5	18,5	5,8	92,3	17,5
–”–	1:10	18,0	5,1	155,8	12,2
Хитозан-графт-	1:1	6,9	5,6	–	54,5
ПВП	1:3	4,1	5,2	19,0	40,0
–”–	1:5	3,1	4,9	20,2	28,1
–”–	1:10	2,8	4,6	41,0	18,6

Из полученных результатов видно, что полностью выделить сополимеры не удалось. Вероятно, в реакционной смеси присутствует низкомолекулярная фракция, растворимая в воде, к тому же большая степень прививки водорастворимых мономеров способствует водорастворимости привитых сополимеров хитозана, чем и обуславливается низкий выход продукта.

Основываясь на химическом (результатах, полученных при установлении гидроксид- и аминогрупп, таблица), а также ИК-спектральном анализе сополимеров, установлено, что прививка ПЭГМЭМА, ПЭГМЭА и ПВП на хитозан происходит аналогично целлюлозе [3, 4], с открытием пиранозного кольца и присоединением мономера к третьему атому углерода (см. схему).



Синтез привитых сополимеров хитозана

В данной работе методом коацервации были приготовлены микросферы хитозана и его привитых сополимеров, которые были использованы для ковалентной иммобилизации мальтогеназы. Такие иммобилизованные ферментные препараты могут быть применимы для получения мальтозного сиропа из крахмала. Перед иммобилизацией эти микросферы были активированы и сшиты глутаровым альдегидом. К готовому для иммобилизации носителю добавляли раствор нативного фермента. Смесь перемешивали 30 мин. при температуре 37°C и оставляли на 12 ч при температуре 4°C. Иммобилизованный фермент несколько раз промывали буфером и измеряли выход иммобилизации. Выход иммобилизации определяется в % как соотношение активности иммобилизованного препарата с активностью нативного фермента, взятого для иммобилизации. Для сравнения, активность нативной и иммобилизированной мальтогеназы определяли, используя в качестве субстрата амилопектин или частично гидролизированный крахмал. Количество восстанавливающих сахаридов определяли спектрофотометрически с помощью метода Сомоджий–Нельсона [5, 6].

Как видно из рис. 1, наиболее подходящими носителями для иммобилизации мальтогеназы являются хитозан-графт-ПЭГМЭА сополимеры, так как выход иммобилизации на них был самым высоким (достигает 98 %). Это может быть обусловлено тем, что именно в этих сополимерах образуются поры, диаметр которых наиболее оптимальный как для фермента, так и для субстрата. Молекулярный вес, а также и разветвленность частично гидролизованного крахмала значительно ниже амилопектина; соответственно, активность фермента, используя его, выше.

Используя в качестве субстрата амилопектин (рис. 2), выходы иммобилизации мальтогеназы на привитых сополимерах хитозана значительно выше, чем на его гомополимере. Вероятнее всего этому способствуют более большие поры в микросферах сополимеров.

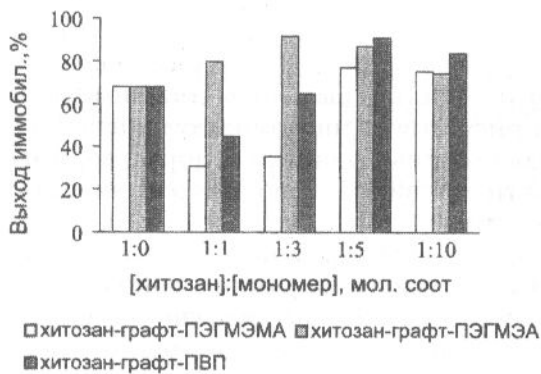


Рис. 1. Влияние исходного состава хитозана и мономера на выход иммобилизации (субстрат – частично гидролизированный крахмал)

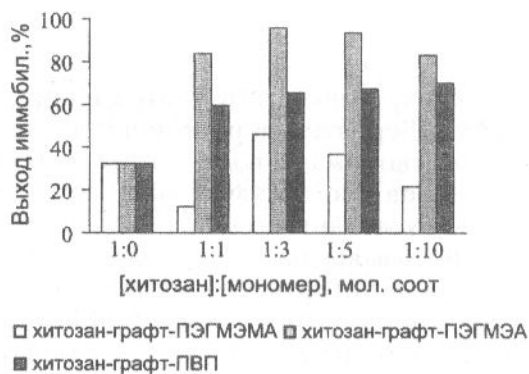


Рис. 2. Влияние исходного состава хитозана и мономера на выход иммобилизации (субстрат – амилопектин)

ЛИТЕРАТУРА

1. Harish Prashanth K. V., Tharanathan R. N. // Carbohydr. Polym. 2003. V. 54. P. 343–351.
2. Ding W., Lian Q., Samuels R. J., Polk M. B. // Polymer. 2003. V. 44. P. 547–556.
3. Ciziunaite E. // Polimeru cheminis modifikavimas. Vilnius, 1980. 114.
4. Halab-Kessira L., Ricadr A. // Eur. Pol. J. 1999. V. 35. P. 1065–1071.
5. Nelson, N. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. P. 378.
6. Somogyi, M. // J. Biol. Chem. 1952. V. 195. P. 19–23.