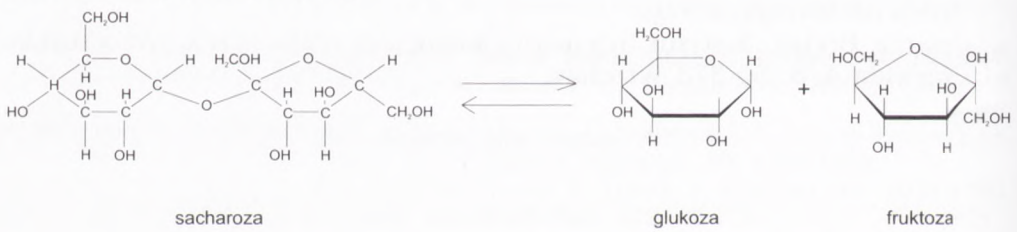
Zastosowanie immobilizowanej inwertazy do ciągłej produkcji inwertowanej sacharozy

Grażyna Ginalska[1]
Anna Belcarz[1]
Jerzy Łobarzewski[1]
Tadeusz Wolski[2]
[1]Zakład Biochemii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Lublin
[2]Zakład Farmakognozji
Akademia Medyczna
Lublin

1. Wprowadzenie

Jednym z pośrednich produktów przemysłu cukrowniczego jest inwert (cukier inwertowany) — mieszanina glukozy i fruktozy, powstająca na drodze hydrolizy sacharozy (rys. 1).



Rys. 1. Schemat hydrolizy sacharozy.

Inwert jest wykorzystywany przez wiele gałęzi przemysłu ze względu na jego lepszą rozpuszczalność oraz większą słodkość w porównaniu z sacharozą (1,3 w skali przyjmującej słodkość sacharozy jako 1,0). Jest on stosowany m.in. do produkcji czekolady oraz etanolu i kwasów organicznych, a także do dokarmiania pszczół (1).

Cukier inwertowany jest obecny w naturalnym surowym soku pochodzącym z buraków cukrowych, w którym jego zawartość wynosi około 1% suchej masy (według danych Michigan Sugar Company z lat 1966-1967 (2)). Występuje on

również w sacharozie produkowanej przemysłowo. Polska Norma PN-72/A-74850 dopuszcza zawartość 0,04% inwertu w suchej masie sacharozy (3).

Inwert otrzymywany jest na skalę przemysłową za pomocą trzech metod: z użyciem silnie kwasowego kationitu, na drodze inwersji kwasowej na gorąco oraz za pomocą inwersji enzymatycznej (2).

Najkorzystniejszą z nich jest metoda enzymatyczna, w której stosuje się inwertazę (β-fruktofuranozydazę, EC 3.2.1.26.). Enzym ten obniża energię aktywacji reakcji hydrolizy sacharozy do wartości 48,15 KJ/mol, podczas gdy wielkość ta dla reakcji przebiegającej bez udziału inwertazy, a jedynie w obecności jonów wodorowych wynosi 108,86 KJ/mol (4).

Przemysł cukrowniczy wykorzystuje zwykle do rozkładu sacharozy preparaty enzymatyczne zawierające inwertazę. Cukrownie otrzymują na skalę przemysłową tą drogą inwertowany cukier o zawartości 50% mieszaniny glukozy i fruktozy w suchej masie.

Stosując w procesie przemysłowym inwertazę rozpuszczalną, w każdym cyklu produkcyjnym traci się użytą porcję enzymu, który ulega inaktywacji termicznej podczas dalszej obróbki produktu. Postępem w zastosowaniu enzymów w procesach przemysłowych jest ich immobilizacja na nierozpuszczalnych matrycach, co pozwala na zmniejszone zużycie biokatalizatora przez jego wielokrotne wykorzystanie.

Metody unieruchamiania enzymów polegają na chemicznym wiązaniu aktywnych grup w białkach (NH_2, COOH) z aktywowanymi nośnikami. Stosowane w tym celu matryce różnią się m.in. pochodzeniem chemicznym, wielkością cząstek, ilością i średnicą porów, powierzchnią całkowitą i ilością aktywnych grup chemicznych zdolnych do wiązania enzymu na powierzchni cząstek. Nośnikami mogą być m.in. kuliste szkło porowate (CPG) i piasek szklarski, które posiadają dużą odporność na ścieranie mechaniczne.

Aby nośniki mogły efektywnie wiązać cząsteczki enzymów trzeba je specjalnie aktywować. Szkło porowate aktywuje się na przykład przez przyłączenie γ-aminopropyltrójetoksysilanu (APTES) i aldehydu glutarowego.

W wykonanych przez nas doświadczeniach zmierzaliśmy do obniżenia kosztów i usprawnienia produkcji cukru inwertowanego dzięki wykorzystaniu immobilizowanej inwertazy. Przeprowadziliśmy w tym celu optymalizację immobilizacji tego enzymu na wybranych nośnikach, a następnie zastosowaliśmy uzyskany unieruchomiony preparat do inwersji sacharozy. Badaniami objęliśmy także dobór najkorzystniejszych warunków ciągłej inwersji roztworu sacharozy techniką kolumnową z użyciem unieruchomionego enzymu.

2. Materiały i metody

W przeprowadzonych badaniach używaliśmy handlowego preparatu inwertazy z drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* firmy Novo Nordisk (Dania). Preparat zawierał 19,1% białka oraz $(NH_4)_2SO_4$.

Nośnikami stosowanymi do immobilizacji inwertazy były: piasek szklarski (frakcja 380-430 μm), szkło porowate (CPG) (POCH Gliwice, frakcja 200-250 μm),

żel krzemionkowy (Si-Gel) (Lubelskie Przedsiębiorstwo Przemysłowo-Handlowe Odczynniki Chemiczne, frakcja 200-250 μm) oraz kruszony pumeks (Fluka, Germany). Na powierzchnię trzech pierwszych nośników wprowadzaliśmy grupy hydroksylowe. W tym celu gotowaliśmy 10-gramowe porcje nośnika z 5% HNO_3 przez 45 minut, pozostawialiśmy na 12-24 godziny w temperaturze pokojowej, po czym usuwaliśmy HNO_3 poprzez wielokrotne odpłukiwanie wodą destylowaną. Wszystkie nośniki po wysuszeniu aktywowaliśmy APTES (5), mieszając przez 30 minut 10-gramowe porcje każdego z nich z 50 ml 2% roztworu APTES w acetonie. Po tym czasie nośnik odsączaliśmy i suszyliśmy przez 24 godziny w temperaturze 45°C. Innym sposobem aktywacji nośników po wprowadzeniu na ich powierzchnię grup hydroksylowych było pokrywanie 7,5% poliakrylamidem (6). Na powierzchnię aktywowanych obiema metodami nośników wprowadzaliśmy aldehyd glutarowy jako łącznik przestrzenny pozwalający na związanie białka enzymatycznego poprzez jego grupy aminowe. W tym celu mieszaliśmy 1-gramowe porcje aktywowanego nośnika z 5 ml 5% aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 4,7 i przez 30 minut odpowietrzaliśmy przy użyciu pompy olejowej, po czym odstawialiśmy na 30 minut w zamkniętej kolbce. Następnie starannie odpłukiwaliśmy aldehyd glutarowy 0,01 M buforem fosforanowym o pH 4,7. Utworzone wiązania podwójne w powstałych związkach o charakterze zasad Schiffa redukowaliśmy przy użyciu $NaBH_4$ przez 5 minut w temperaturze 4°C. Następnie nośnik przepłukiwaliśmy 500 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 4,7. Tak przygotowane matryce sprzęgaliśmy z inwertazą, wykorzystując w tym procesie wolne grupy aminowe enzymu.

Sprzęganie nośnika z enzymem przeprowadzaliśmy w dwóch etapach. Pierwszy obejmował czterogodzinne wytrząsanie 1 grama nośnika z 5 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 4,7, zawierającego białko o aktywności inwertazy w ilości 15-40 mg. Proces ten prowadziliśmy w temperaturze pokojowej. W następnym etapie enzym wiązał się z nośnikiem w temperaturze 4°C przez 12 godzin. Po tym czasie pozostały w roztworze nie związany enzym oddzielaliśmy od nośnika za pomocą starannego odpłukiwania 0,1 M buforem fosforanowym o pH 4,7.

Część doświadczeń nad unieruchamianiem inwertazy na wybranych nośnikach przeprowadzaliśmy z użyciem enzymu uprzednio odsolonego na kolumnie wypełnionej Sephadeksem G-25 (10x25 cm). Na kolumnę nanieśliśmy 5 g firmowego preparatu inwertazy rozpuszczonego w 200 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 4,7, a następnie przemywaliśmy ją wodą destylowaną. Frakcje zawierające białko, a pozbawione soli łączyliśmy i liofilizowaliśmy.

Oznaczanie zawartości białka przeprowadzaliśmy metodą Lowry'ego w modyfikacji Schacterle i Pollacka (7).

Aktywność inwertazy oznaczaliśmy w temperaturze 30°C z użyciem sacharozy jako substratu. Stężenie glukozy uwolnionej z sacharozy przez inwertazę oznaczaliśmy spektrofotometrycznie za pomocą testu enzymatycznego (oksydaza glukozy, peroksydaza, O-dwuanizydyna) (8) lub metodą toluidynową (9). Aktywność immobilizowanej inwertazy wyrażaliśmy w nanokatalach (nkatal) w przeliczeniu na 1 g nośnika z immobilizowanym enzymem.

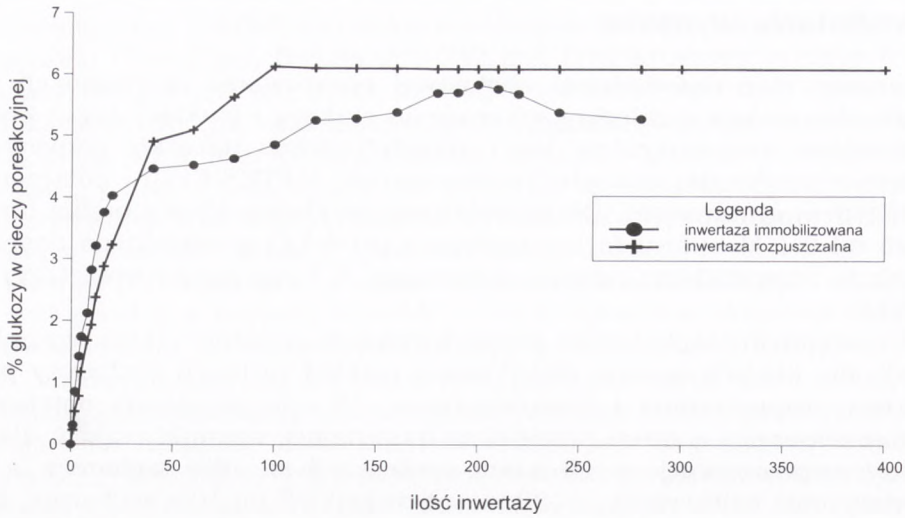
3. Omówienie wyników

Pierwszy etap doświadczeń obejmował opracowanie optymalnych warunków dla reakcji rozkładu sacharozy do glukozy i fruktozy przez inwertazę zarówno rozpuszczalną, jak i immobilizowaną na szkle porowatym, aktywowanym γ-aminopropyltrójetoksysilanem (APTES-CPG) i połączonym z aldehydem glutarowym. Do immobilizacji użyliśmy 15 mg białka inwertazy/5 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 4,7/1 g wilgotnego nośnika. W efekcie otrzymaliśmy nośnik zawierający 5,7 mg białka inwertazy/1 g matrycy.

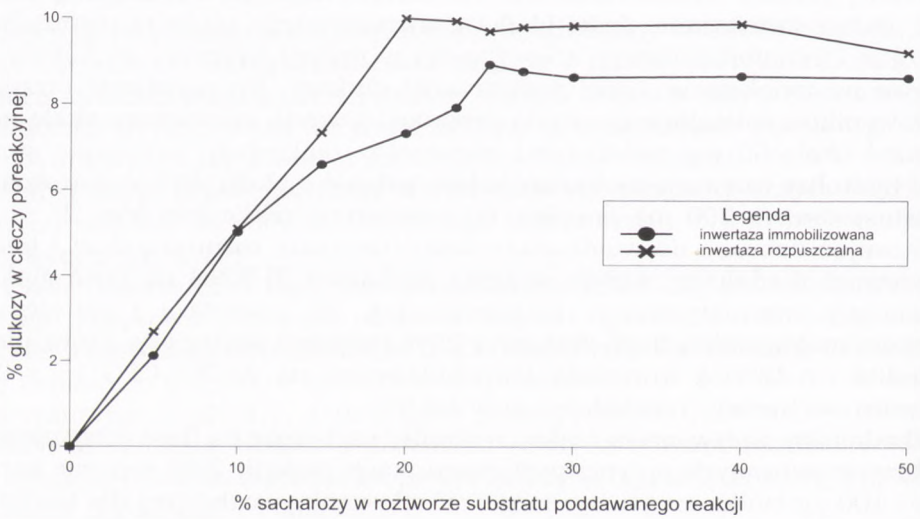
W następnym etapie badań przewidywaliśmy ustalenie takich warunków reakcji, dla których nastąpi maksymalny rozkład roztworu sacharozy przez inwertazę rozpuszczalną i immobilizowaną. W celu określenia optymalnej ilości stosowanego enzymu przyjęliśmy następujące warunki reakcji: dla inwertazy rozpuszczalnej — 15 minut reakcji z 5 ml 10% sacharozy, a dla inwertazy immobilizowanej — 30 minut reakcji z 5 ml 10% sacharozy, gdyż po wstępnych doświadczeniach okazało się, że 15-minutowy czas reakcji jest zbyt krótki dla przeprowadzenia efektywnego rozkładu substratu przez inwertazę unieruchomioną na nośniku. Wyniki doświadczeń przedstawione na rysunku 2 pozwalają stwierdzić, że w tych warunkach reakcji maksymalną ilość glukozy uwolnionej enzymatycznie z sacharozy osiąga się stosując odpowiednio 100 μg białka inwertazy rozpuszczalnej i 200 mg inwertazy immobilizowanej na 1 ml mieszaniny reakcyjnej. W obu przypadkach ilość wytworzonej glukozy wynosi około 5%, co stanowi około 50% rozłożonej sacharozy. Dalsze zwiększanie ilości białka enzymatycznego zarówno rozpuszczalnego jak i immobilizowanego stosowanego w reakcji hydrolizy sacharozy nie wpływa na zwiększanie ilości wytwarzanej glukozy. Na podstawie otrzymanych wyników wnioskujemy, że do produkcji inwertu na większą skalę można użyć około 50 mg nośnika/ml mieszaniny reakcyjnej, uzyskując wydajność hydrolizy roztworu sacharozy niższą jedynie o około 20% w porównaniu z zastosowaniem 200 mg nośnika/ml mieszaniny reakcyjnej (rys. 2).

Stosując dobrane doświadczalnie ilości inwertazy rozpuszczalnej i immobilizowanej zbadaliśmy wpływ stężenia sacharozy (5-50%) na ilość glukozy uwolnionej enzymatycznie z substratu (rys. 3). Inwertaza rozpuszczalna uwolniła maksymalną ilość glukozy z 20% roztworu sacharozy, która uległa hydrolizie w 48%, a inwertaza immobilizowana na APTES-CPG — z 25% roztworu sacharozy, rozkładając ją w 50,8%.

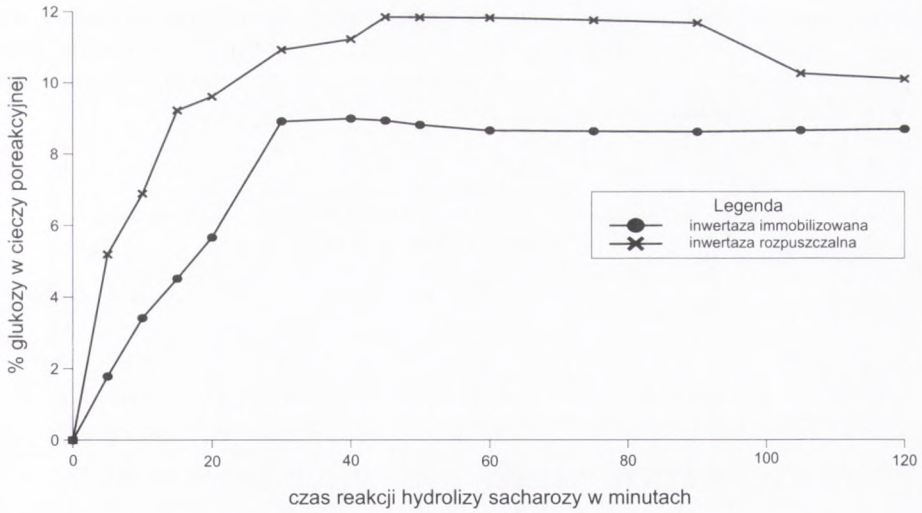
Zbadaliśmy wpływ czasu reakcji hydrolizy sacharozy na ilość otrzymywanej glukozy w wybranych optymalnych warunkach reakcji: 20% stężenie sacharozy i 100 μg białka enzymatycznego/ml mieszaniny reakcyjnej dla inwertazy rozpuszczalnej oraz 25% stężenie sacharozy i 200 mg APTES-CPG z immobilizowaną inwertazą/ml mieszaniny reakcyjnej. Wykazaliśmy, że maksymalne stężenie glukozy (około 11,5%) w płynie poreakcyjnym obserwuje się w przypadku enzymu rozpuszczalnego po upływie 45 minut, a w przypadku enzymu unieruchomionego (około 8,9%) po upływie 30 minut (rys. 4). Uzyskane wyniki świadczą, że reakcja przy użyciu rozpuszczalnej inwertazy z optymalnym dla



Rys. 2. Wpływ ilości inwertazy na ilość glukozy otrzymanej w reakcji hydrolizy sacharozy. Reakcje przeprowadzano w temperaturze pokojowej na wstrząsarce. Warunki reakcji: dla inwertazy rozpuszczalnej — 15 min reakcji z 5 ml 10% sacharozy, dla inwertazy immobilizowanej na APTES-CPG — 30 min reakcji z 5 ml 10% sacharozy. Ilość użytej inwertazy rozpuszczalnej podano w μg/ml mieszaniny reakcyjnej, a inwertazy immobilizowanej — w mg nośnika ze związanym enzymem/ml mieszaniny reakcyjnej.



Rys. 3. Wpływ stężenia sacharozy na ilość glukozy otrzymanej w reakcji hydrolizy sacharozy przez inwertazę rozpuszczalną i immobilizowaną na APTES-CPG. Reakcje przeprowadzano w temperaturze pokojowej na wstrząsarce z użyciem 5 ml roztworu sacharozy. Warunki reakcji: dla inwertazy rozpuszczalnej — 15 min reakcji i 100 μg enzymu/ml mieszaniny reakcyjnej, a dla inwertazy immobilizowanej na APTES-CPG — 30 min reakcji i 200 mg nośnika z immobilizowanym enzymem/ml mieszaniny reakcyjnej.



Rys. 4. Wpływ czasu reakcji inwertazy rozpuszczalnej i immobilizowanej na APTES-CPG na ilość glukozy otrzymanej w reakcji hydrolizy sacharozy. Reakcje przeprowadzano w temperaturze pokojowej na wstrząsarce. Warunki reakcji: dla inwertazy rozpuszczalnej — 5 ml 20% sacharozy i 100 μg inwertazy/ml mieszaniny reakcyjnej, dla inwertazy immobilizowanej na APTES-CPG — 5 ml 25% sacharozy i 200 mg nośnika ze związanym enzymem/ml mieszaniny reakcyjnej.

niej stężeniem substratu (20% sacharozy) trwa 45 minut, zanim stężenie produktu (mieszaniny glukozy i fruktozy) osiągnie maksimum, czyli o 15 minut dłużej niż przy użyciu inwertazy immobilizowanej (rys. 4).

Zoptymalizowane warunki reakcji wykorzystaliśmy w badaniach aktywności inwertazy immobilizowanej na różnych matrycach (tab. 1). Okazało się jednak, że dla niektórych prób enzymu unieruchomionego na piasku szklarskim i żelu krzemionkowym 25% stężenie sacharozy było zbyt wysokie. Obniżyliśmy je zatem do 10%. Ujednoliciliśmy także warunki reakcji: 1 g nośnika z immobilizowanym enzymem inkubowaliśmy w 30°C z 5 ml 10% roztworu sacharozy w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 4,7 w ciągu 30 minut.

Inwertazę unieruchamialiśmy na następujących nośnikach: szkle porowatym (CPG), piasku szklarskim, żelu krzemionkowym i kruszonym pumeksie. Stosowaliśmy dwa sposoby aktywacji nośników (pokrywanie γ-aminopropyltrójetoksysilanem lub poliakrylamidem), a do immobilizacji użyliśmy preparatu enzymatycznego firmowego i odsolonego na Sephadeksie G-25, ponieważ zaobserwowaliśmy, że handlowy enzym, zawierający $(NH_4)_2SO_4$, wytrąca się w trakcie immobilizacji. Dla każdego unieruchomionego preparatu określaliśmy ilość związanego białka, wydajność immobilizacji oraz aktywność uzyskanego preparatu natychmiast i po 12 godzinach od ukończenia procesu unieruchamiania. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń ujęliśmy w tabeli 1. Spośród badanych nośników najlepszą zdolność wiązania białka enzymatycznego wykazało szkło porowate aktywowane γ-aminopropyltrójetoksysilanem (APTES-CPG), które wiązało 6-12 mg białka enzymatycznego/1 g

matrycy (zależnie od rodzaju użytego preparatu). Kruszony pumeks wiązał około 4 mg białka enzymatycznego/1 g nośnika, natomiast pozostałe nośniki (żel krzemionkowy i piasek szklarski) immobilizowały znacznie mniej inwertazy niż szkło porowate (tab. 1).

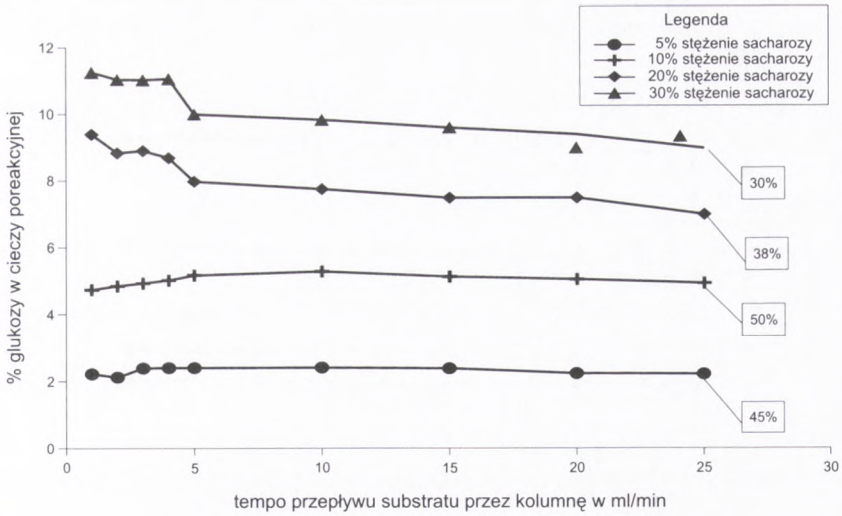
TABELA 1
OPTYMALIZACJA IMMOBILIZACJI INWERTAZY (PREPARAT FIRMOWY ORAZ ODSOLONY) NA CZTERECH WYBRANYCH NOŚNIKACH

Rodzaj nośnika	Rodzaj aktywacji	Preparat firmowy				Preparat odsolony			
		A	B	C	D	A	B	C	D
piasek szklarski	APTES	0	0	0	0	0,75	4,10	0,8	0,8
	poliakrylamid	0,52	3,20	2,3	1,7	0,00	0,00	0	0
pumeks kruszony	APTES	3,37	24,33	246	240,8	4,17	25,49	295	295,8
	poliakrylamid	0,79	5,34	105	75,4	1,00	5,88	121	71,1
żel krzemionkowy	APTES	2,38	16,29	20,3	18,8	4,20	25,67	27,8	26,5
	poliakrylamid	1,57	12,29	14,3	0	3,65	24,14	23,1	0,8
szkło porowate	APTES	5,70	30,97	446	437,1	11,83	72,03	451	443,9
	poliakrylamid	6,57	51,45	462	18,8	6,30	41,66	412	82,3

Każdorazowo do immobilizacji użyto enzym w proporcji 15 mg białka/1 g wilgotnego nośnika. Aktywność inwertazy oznaczano, inkubując 1 g wilgotnego nośnika z immobilizowanym enzymem z 5 ml 10% roztworu sacharozy w ciągu 30 minut, ze wstrząsaniem. A — ilość białka związanego z nośnikiem w mg/g nośnika; B — wydajność immobilizacji w %; C — aktywność immobilizowanej inwertazy mierzona bezpośrednio; D — po upływie 12 godzin od procesu unieruchamiania, wyrażona w nkatalach/g nośnika.

Wykazaliśmy, że sposób aktywacji nośnika ma bardzo istotny wpływ na trwałość unieruchamianego enzymu. Stwierdziliśmy na przykład, że pokrywanie szkła porowatego bądź żelu krzemionkowego poliakrylamidem powoduje szybką utratę aktywności inwertazy unieruchomionej na tak przygotowanym nośniku. Spada ona do kilku procent aktywności początkowej w ciągu 12 godzin po procesie immobilizacji. Dla porównania, inwertaza unieruchomiona na APTES-CPG zachowuje w ciągu co najmniej 12 godzin pełną aktywność początkową (tab. 1).

Zauważyliśmy, że w przypadku stosowania odsolonego preparatu inwertazy ilość enzymu związanego przez nośnik jest większa w porównaniu z enzymem nieodsolonym (tab. 1). Mając to na względzie przeprowadziliśmy próby immobilizacji inwertazy na APTES-CPG, stosując różne stężenia roztworu enzymu odsolonego (15-40 mg/1 g nośnika, tab. 2). Zaobserwowaliśmy, że najwyższą wydajność (72,03%) uzyskaliśmy używając 15 mg białka/1 g nośnika, zaś dużą ilość unieruchomionego białka (19,49 mg/1 g nośnika) stwierdziliśmy już przy zastosowaniu 25 mg enzymu/1 g wilgotnego nośnika. Wyższe stężenia enzymu (30 i 40 mg/1 g nośnika) nie powodowały znaczącego wzrostu ilości immobilizowanej inwertazy, zaś wydajność procesu ulegała znacznemu obniżeniu.



Rys. 5. Wpływ tempa przepływu substratu (roztwór sacharozy w wybranych stężeniach) przez kolumnę o wymiarach 0,7 × 27 cm wypełnioną inwertazą immobilizowaną (10,4 mg enzymu/1 g APTES-CPG) na stężenie glukozy powstałej w reakcji enzymatycznej. Reakcję przeprowadzano w temperaturze pokojowej. Wartości liczbowe podane w ramkach przedstawiają średnie ilości sacharozy rozłożonej do glukozy i fruktozy w stosunku do całkowitej ilości sacharozy poddawanej reakcji.

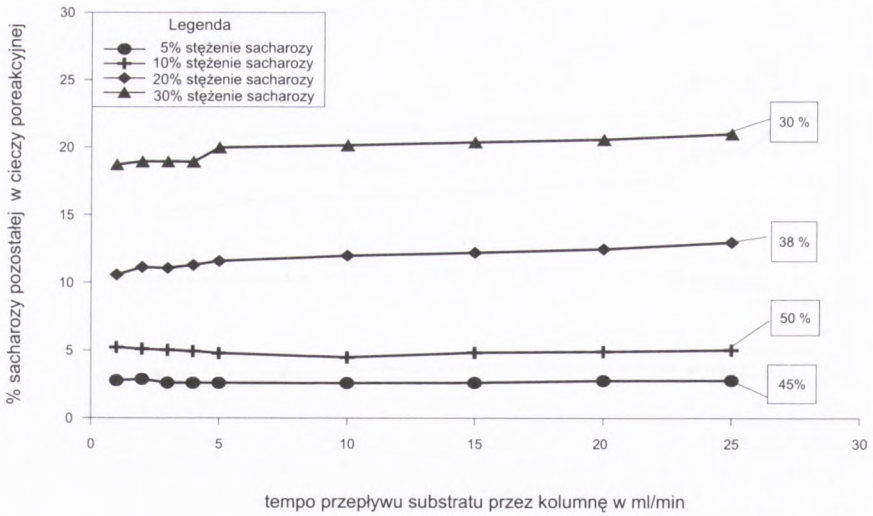
TABELA 2

WPŁYW STĘŻENIA ROZTWORU INWERTAZY UŻYTEJ DO IMMOBILIZACJI NA SZKLE POROWATYM POKRYTYM SILANEM I AKTYWOWANYM ALDEHYDEM GLUTAROWYM (APTES-CPG) NA WYDAJNOŚĆ PROCESU

	Ilość odsolonego enzymu użytego do immobilizacji, w mg/1 g nośnika			
	15	25	30	40
ilość białka inwertazy związanego z nośnikiem w mg/g nośnika	11,83	19,49	22,02	24,22
wydajność procesu immobilizacji w %	72,03	67,49	63,90	56,36

W kolejnych doświadczeniach wykorzystaliśmy kolumnę (0,7 × 27 cm) z immobilizowaną inwertazą. Produkcja cukru inwertowanego zachodziła wówczas podczas przemywania kolumny roztworem sacharozy. Do formowania kolumny użyliśmy szkła porowatego (APTES-CPG) zawierającego 10,4 mg białka inwertazy/1 g nośnika. Zbadaliśmy zdolność tej kolumny do produkcji cukru inwertowanego z roztworów sacharozy o stężeniach 5,10,20 i 30%, przy szybkości przepływu substratu przez kolumnę wynoszącym 1-25 ml na minutę (rys. 5 i 6).

Najlepsze rezultaty uzyskaliśmy dla roztworów substratu o stężeniach z zakresu 10-20%. Dla tych stężeń sacharozy przy tempie przepływu substratu przez kolumnę równym 5 ml/min otrzymano odpowiednio 53 i 43% wydaj-

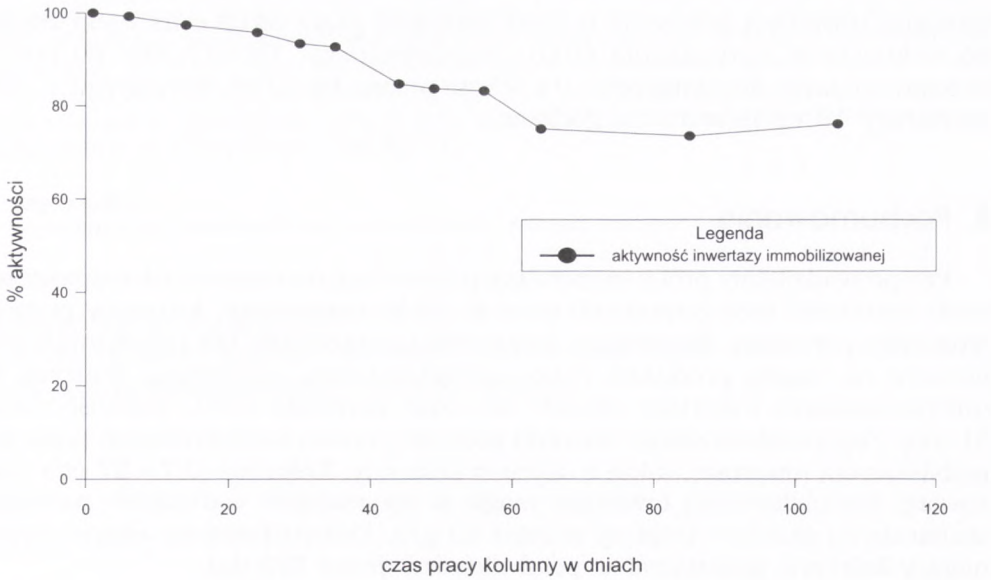


Rys. 6. Wpływ tempa przepływu substratu (roztwór sacharozy w wybranych stężeniach) przez kolumnę o wymiarach 0,7 × 27 cm wypełnioną inwertazą immobilizowaną (10,4 mg enzymu/1 g APTES-CPG) na stężenie sacharozy pozostałej w płynie poreakcyjnym. Reakcję przeprowadzano w temperaturze pokojowej. Wartości liczbowe podane w ramkach przedstawiają średnie ilości sacharozy rozłożonej do glukozy i fruktozy w stosunku do całkowitej ilości sacharozy poddawanej reakcji.

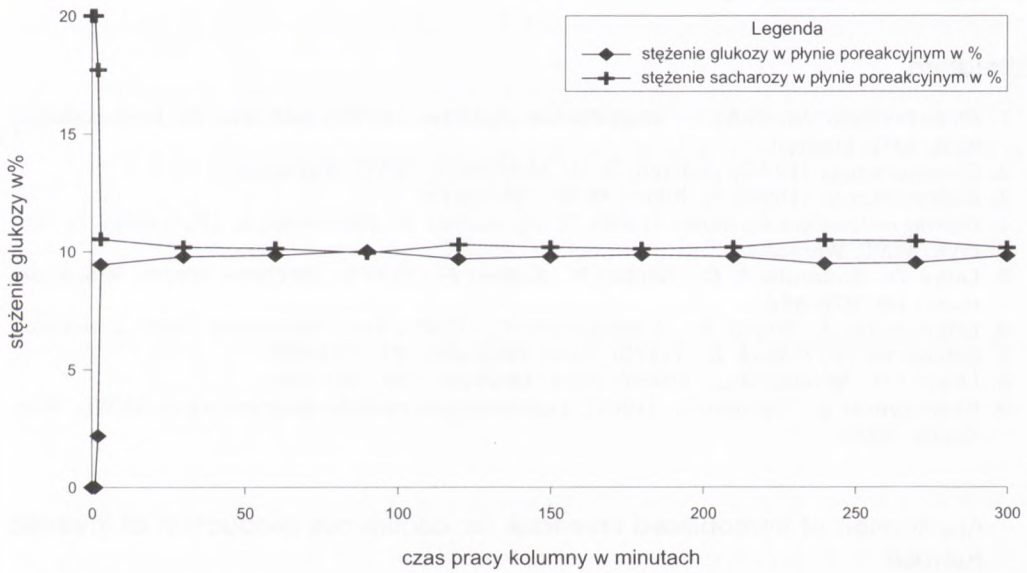
ność hydrolizy (rys. 5 i 6). Zwiększenie stężenia sacharozy do 30% spowodowało obniżenie wydajności reakcji do 33%. Niewiele niższy stopień rozkładu sacharozy uzyskuje się utrzymując tempo przepływu w zakresie 10 – – 20 ml/min (rys. 5 i 6). Powyżej tych wartości tempa przepływu, stężenia glukozy w eluacie dalej nieznacznie maleją, szczególnie w przypadku stężeń substratu powyżej 10% (rys. 5). Tempo przepływu wynoszące 20 ml/min uznaliśmy zatem za zadowalające.

Stwierdziliśmy, że inwertaza unieruchomiona na APTES-CPG badana w doświadczeniach z użyciem kolumny wykazuje dużą stabilność i w warunkach eksperymentalnych zachowuje 80% swej początkowej aktywności po upływie 120 dni (rys. 7).

Biorąc pod uwagę, że podczas długotrwałego i wielokrotnego używania kolumny z immobilizowaną inwertazą możliwa jest inaktywacja tego enzymu, zbadaliśmy stopień utraty aktywności inwertazy immobilizowanej na APTES-CPG w trakcie ciągłej pracy kolumny (0,7 × 27 cm) przez 5 godzin, przepuszczając przez nią 10% roztwór sacharozy w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 4,7 w tempie 20 ml/min. W tych warunkach inwertaza w sposób ciągły przeprowadzała inwersję sacharozy w 50% (rys. 8). Dało to 60 g cukru inwertowanego w ciągu 1 godziny. Uzyskany wynik wskazuje na utrzymanie się aktywności immobilizowanej inwertazy na tym samym poziomie w czasie trwania doświadczenia. Eksperyment powtórzyliśmy po tygodniu, a następnie po dwóch, uzyskując te same wyniki. Potwierdza to, że kolumna z immobi-



Rys. 7. Stabilność operacyjna inwertazy immobilizowanej na APTES-CPG upakowanej w kolumnie o wymiarach 0,7 × 27 cm. Początkowa aktywność wynosiła 446,5 nkatala/1 g nośnika.



Rys. 8. Aktywność inwertazy immobilizowanej (10,4 mg/1 g APTES-CPG) wypełniającej kolumnę o wymiarach 0,7 × 27 cm określana wobec 20% sacharozy. W doświadczeniu stosowano ciągłe tempo przepływu substratu przez kolumnę wynoszące 20 ml/min i utrzymywano je przez 5 godzin.

lizowaną inwertazą pozostaje w pełni aktywna przez długi czas i jest zdolna do efektywnego wytwarzania cukru inwertowanego. Teoretycznie po powiększeniu kolumny do wymiarów 10 × 50 cm można by zatem otrzymywać z 10% sacharozy 10 kg inwertu na godzinę.

4. Podsumowanie

Przeprowadziliśmy próby immobilizacji inwertazy na czterech nierozpuszczalnych nośnikach nieorganicznych (piasek, żel krzemionkowy, kruszony pumeks oraz szkło porowate). Zbadaliśmy możliwość zastosowania tak uzyskanych preparatów do ciągłej produkcji cukru inwertowanego. Optymalną matrycą do unieruchamiania inwertazy okazało się szkło porowate (CPG, wielkość porów 31 μm). Zoptymalizowaliśmy warunki produkcji cukru inwertowanego przez immobilizowaną inwertazę, także z użyciem kolumny. Kolumna (0,7 × 27 cm) upakowana immobilizowaną inwertazą mogła w optymalnych warunkach rozkładać sacharozę do glukozy i fruktozy w ilości 60 g/h. Unieruchomiony enzym wypełniający kolumnę pozostawał w pełni aktywny przez 120 dni.

Wyniki uzyskane w przeprowadzonych doświadczeniach świadczą o tym, że możliwa jest szybka i skuteczna hydroliza roztworów sacharozy do glukozy i fruktozy przez inwertazę immobilizowaną. Zachęcają one do dalszych badań w kierunku poszukiwania innych, tanich i nietoksycznych nośników, które mogłyby być wykorzystane na skalę przemysłową do ciągłej produkcji inwertu metodą kolumnową.

Literatura

1. *Biotechnologia żywności — zagadnienia wybrane*, (1993), pod red. W. Bednarskiego, Wyd. ART, Olsztyn.
2. *Cukrownictwo*, (1976), pod red. R. A. McGinnisa, WNT, Warszawa.
3. *Cukrownictwo*, (1996), S. Nikiel, WSiP, Warszawa.
4. *Ogólna technologia żywności*, (1996), E. Pijanowski, M. Dłużewski, A. Dłużewska, A. Jarczyk, WNT, Warszawa.
5. Lappi D., Stolzenbach G., Kaplan N., Kamen M., (1976), Biochem. Bioph. Res. Commun., 69, 878-884.
6. Łobarzewski J., Wójcik A., Błaszczyńska T., (1989), Acta Biotechnol., 9(3), 239-246.
7. Schacterle G., Pollack R., (1973), Anal. Biochem., 51, 654-655.
8. Lloyd J.B., Whelan W.J., (1969), Anal. Biochem., 30, 467-490.
9. Krawczyński J., Osiński T., (1967), *Laboratoryjne metody diagnostyczne*, PZWL, Warszawa, 283.

Application of immobilized invertase for continuous production of inverted sucrose

Summary

Four inorganic supports (sand, silica gel, crushed pumice and controlled-pore glass) were used for immobilization of invertase. The possibility of application of thus obtained immobilized

enzyme in continuous production of inverted sugar was tested. The best support for immobilization of invertase was controlled-pore glass (CPG, average pore size of 31 mm). The conditions of production of inverted sugar by immobilized enzyme were optimised (also in column). Under the optimised the column (dimensions: 0.7×27 cm) with immobilized invertase was able to degrade sucrose to glucose and fructose in an amount of 60 g/h. Immobilized invertase in the column remained fully active for 120 days.

Key words:
immobilization, invertase, inorganic supports, column, sucrose degradation.

Adres do korespondencji:
Anna Belcarz, Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, pl. M. Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin.