



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

**Gliukoamilazių imobilizavimo būdų palyginimas ir panaudojimas
krakmolingos žaliavos fermentinei hidrolizei**
Baigiamasis magistro projektas

Laura Prakopavičiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Dalia Čižeikienė

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Gliukoamilazių imobilizavimo būdų palyginimas ir panaudojimas
krakmolingos žaliavos fermentinei hidrolizei**

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija 6211FX010

Laura Prakopavičiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Dalia Čižeikienė

Vadovė

m. d. dr. Darius Černauskas

Recenzentas

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Laura Prakopavičiūtė

Gliukoamilazių imobilizavimo būdų palyginimas ir panaudojimas krakmolingos žaliavos fermentinei hidrolizei

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Lauros Prakopavičiūtės, baigiamasis projektas tema „Gliukoamilazių imobilizavimo būdų palyginimas ir panaudojimas krakmolingos žaliavos fermentinei hidrolizei“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

Laura Prakopavičiūtė

Prakopavičiūtė, Laura. Gliukoamilazių imobilizavimo būdų palyginimas ir panaudojimas krakmolingos žaliavos fermentinei hidrolizei. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Dalia Čižeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: gliukoamilazės, imobilizacija, fermentinis aktyvumas, kinetiniai parametrai

Kaunas, 2020. 67 p.

Santrauka

Šio magistrinio darbo metu komercinės gliukoamilazės buvo imobilizuotos trimis skirtingais būdais: (a) įterpiant į polimero – alginato struktūrą, (b) kovalentiškai prijungiant ant polimerinio nešiklio (alginato) ir (c) sudarant skersiniais ryšiais susiūtus fermentų agregatus. Pirmiausia buvo nustatytos optimalios komercinių gliukoamilazių aktyvumo sąlygos: temperatūra, terpės pH bei parinkta hidrolizės trukmė. Tolimesniems tyrimams naudotos nustatytos optimalios sąlygos – 60 °C ir pH 4,5. Nustatyta kaip surišėjo, fermento tirpalo ar nešiklio koncentracija, turintys įtakos imobilizavimo efektyvumui. Gliukoamilazių įterpimui į polimero – alginato – struktūrą labiausiai tinkanti koncentracija buvo 4 % alginato. Kovalentiniu būdu imobilizuojant gliukoamilazes nustatyta, kad imobilizavimo efektyvumas buvo didžiausias, kai kapsulių aktyvavimui nenaudotas glutaro aldehidas, kapsulių išlaikymo fermentiniame tirpale trukmė – 2,5 val., o fermentinio tirpalo koncentracija – 18 AV/ml. Naudojant 0,8 % glutaro aldehido tirpalą buvo gauti gliukoamilazės agregatai kurių imobilizavimo efektyvumas buvo didžiausias. Įvertinta, kad skersiniais ryšiais susiūti agregatai pasižymėjo didžiausiu aktyvumu (84 AV/g), tačiau vertinant stabilumą, didžiausią aktyvumą išlaikė kapsulės su įterptomis gliukoamilazėmis, nes imobilizuotas fermentas per 30 dienų išlaikė net 85 % fermentinio aktyvumo. Taip pat įvertinus kinetinius imobilizuotų gliukoamilazių parametrus nustatyta, kad didžiausiu pradinio reakcijos greičiu (4,29 $\mu\text{M}/\text{min}$) pasižymėjo fermento agregatai, mažiausia Michaelio konstantos K_M verte ($K_M=0,09 \mu\text{M}$, kai laisvo fermento $K_M=0,08 \mu\text{M}$) – kovalentiškai imobilizuotos gliukoamilazės ir didžiausiu maksimaliu reakcijos greičiu (22,9 $\mu\text{M}/\text{min}$) – fermento agregatai. Įvertintas imobilizuotų gliukoamilazių optimali veikimo temperatūra, pH bei termostabilumas ir pH įtaka. Nustatyta, kad imobilizuotų gliukoamilazių optimali temperatūra yra 60 °C, o optimali pH kinta priklausomai nuo imobilizacijos būdo t. y. įkapsuliuotų gliukoamilazių optimali terpės pH reikšmė yra 5, kovalentiškai prijungtų gliukoamilazių – pH 4,5, o gliukoamilazių agregatų – pH 4. Prie 100 °C termostabilumu pasižymėjo gliukoamilazės įterptos 5 % alginato gelyje ir išlaikė 94,4 % fermento aktyvumo bei 25 % glutaro aldehidu kovalentiniu ryšiu prijungtos gliukoamilazės ir išlaikė 69,2 % pradinio aktyvumo. Agregatai nepasižymėjo temperatūriniu stabilumu. Rūgštinėje pH terpėje (pH=2) įterptos gliukoamilazės 5 % alginato tirpale išlaikė 93,8 % pradinio aktyvumo, o šarminėje pH terpėje (pH=8) didžiausiu aktyvumu pasižymėjo gliukoamilazės įterptos 4 % alginato gelyje ir išlaikė 75,3 % fermentinio aktyvumo. Kovalentiniu būdu imobilizuotos gliukoamilazės pasižymėjo pH stabilumu tik rūgštinėje terpėje (pH 2) ir išlaikė vidutiniškai 88,0 % fermentinio aktyvumo.

Agregatai, kurių sudarymui naudojamas 0,5 % ir 2,5 % glutaro aldehidas, pasižymėjo pH stabilumu prie pH 2 ir pH 10 ir išlaikė atitinkamai 81,3 % ir 54,7 % pradinio aktyvumo. Įvertintos krakmolingos žaliavos (kukurūzų miltai) hidrolizės galimybės ir nustatyta, kad kukurūzų miltų hidrolizę greičiausiai atliko gliukoamilazės gautos skersiniais ryšiais sujungiant į agregatus. Įterptos gliukoamilazės alginato struktūrose po 10 ciklų vis dar išlaikė 49,8 % pradinio imobilizuoto fermento aktyvumo, kai tuo tarpu gliukoamilazių agregatai po 10 panaudojimo ciklų išlaikė 3,3 %.

Prakopavičiūtė, Laura. Comparison of glucoamylase immobilization methods and their application for enzymatic hydrolysis of starchy raw material. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Dalia Čižeikienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological sciences.

Keywords: glucoamylase, immobilization, enzyme activity, kinetic parameters

Kaunas, 2020. 67 pages.

Summary

In this master's thesis was tested three immobilization methodologies for commercial glucoamylase: (i) Entrapment, (ii) Covalent bonding and (iii) Cross-Linked aggregating. First of all, enzymatic reaction conditions which are optimal were selected. Commercial glucoamylase show the highest activity at 60 °C when the pH of reaction medium was adjusted to 4,5. Secondly, immobilization methods were carried out and the reaction parameters that influence the immobilization efficiency were evaluated. The most suitable concentration of alginate solution was 4 %. Using covalent bonding technique for enzyme immobilization the results showed that the most effective immobilization was when the capsules were not activated with glutaraldehyde, the optimum coupling time was 2,5 h and enzyme solution concentration - 18 AV/ml. Cross-linked glucoamylase aggregates show the highest immobilization efficiency using glutaraldehyde solution at 0,8 %. It was estimated that cross-linked aggregates had the highest activity (84 U/g), however, the entrapped glucoamylase retained highest activity (85 %) within 30 days. Afterwards, kinetic parameters for immobilized glucoamylase were estimated. The supreme initial reaction rate (4,33 $\mu\text{M}/\text{min}$) was estimated for glucoamylase aggregates, the lowest Michael constant ($K_M=0,09 \mu\text{M}$, free enzyme $K_M=0,08 \mu\text{M}$) was estimated for covalently immobilized glucoamylase and highest maximum reaction rate (22,9 $\mu\text{M}/\text{min}$) for glucoamylase aggregates. Impact of temperature and pH for immobilized glucoamylase was determined. Optimal temperature for immobilized glucoamylase was 60 °C, however, optimal pH value varies depending on the method of immobilization, i.e. entrapped glucoamylase's optimal pH is 5, covalently bonded - 4.5 and glucoamylase aggregate's - 4. Under 100 °C entrapped glucoamylases into 5 % alginate retained 94.4 % its activity, covalently bonded with 25 % glutaraldehyde glucoamylases retained 69,2 % its initial activity. Glucoamylase aggregates were not thermostable at critical temperatures, however, under medium pH 2 and pH 10 aggregates that was generated with 0,5 % or 2,5 % glutaraldehyde solutions retained respectively 81,3 % and 54,7 % its initial activity. Entrapped glucoamylases under pH 2 and pH 8 retained respectively 93,8 % (with 5 % alginate) and 75,3 % (with 4 % alginate) its initial activity. Covalently bonded glucoamylases was active under pH 2 and retained at an average 88,0 % enzyme activity. Possibilities of starch raw material (corn flour) hydrolysis were investigated. Glucoamylase aggregates showed highest hydrolysis rate of corn flour. Entrapped glucoamylase retained 49,8 % initial enzyme activity after 10 used cycles, while the cross-linked aggregates maintained 3,3 % initial activity after 10 cycles.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas.....	9
Įvadas.....	10
1. Literatūros apžvalga.....	12
1.1. Fermentų struktūra, savybės, jų veikimo mechanizmas bei panaudojimas.....	12
1.2. Amilazių ir gliukoamilazių šaltiniai, savybės ir panaudojimas.....	13
1.3. Fermentų imobilizavimo būdai.....	16
1.3.1. Imobilizacija įjungiant į erdvinę struktūras.....	16
1.3.2. Adsorbicija ir imobilizavimas kovalentiniu ryšiu.....	17
1.3.3. Imobilizacija susiuvant.....	18
1.3.4. Imobilizuotų fermentų aktyvumo įvertinimas.....	19
1.4. Imobilizuotų gliukoamilazių savybės.....	21
1.5. Imobilizuotų gliukoamilazių panaudojimas.....	25
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	26
2.1. Tyrimams naudotos medžiagos ir įranga.....	26
2.2. Gliukoamilazių aktyvumo nustatymas pagal krakmolą.....	27
2.2.1. Gliukoamilazių aktyvumo priklausomybės nuo aplinkos temperatūros nustatymas.....	29
2.2.2. Gliukoamilazių aktyvumo priklausomybės nuo terpės pH nustatymas.....	29
2.3. Gliukoamilazių imobilizacija.....	29
2.3.1. Gliukoamilazių įkapsuliavimas kalcio alginata.....	29
2.3.2. Gliukoamilazių imobilizavimas kovalentiniu būdu.....	30
2.3.3. Skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių agregatų sudarymas.....	31
2.3.4. Temperatūros ir terpės pH įtaka imobilizuotoms gliukoamilazėms.....	31
2.3.5. Imobilizuotų gliukoamilazių kinetinių parametrų nustatymas.....	32
2.3.6. Imobilizuotų gliukoamilazių stabilumo nustatymas.....	32
2.4. Imobilizuotų gliukoamilazių panaudojimo galimybės krakmolingos žaliavos hidrolizei.....	33
2.4.1. Imobilizuotų gliukoamilazių aktyvumo nustatymas pagal redukuojančių sacharidų kiekį.....	33
2.4.2. Krakmolingos žaliavos paruošimo būdas.....	34
2.4.3. Krakmolingos žaliavos hidrolizės trukmės vertinimas imobilizuotomis gliukoamilazėmis.....	34
2.4.4. Imobilizuotų gliukoamilazių panaudojimo ciklų skaičiaus nustatymas.....	35
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	36
3.1. Temperatūros ir terpės pH vertės įtaka komercinių gliukoamilazių aktyvumui.....	36
3.2. Gliukoamilazių įterptų alginato struktūroje savybės.....	37
3.2.1. Alginato ir fermento koncentracijos įtaka gliukoamilazių savybėms.....	37
3.2.2. Temperatūros ir pH įtaka gliukoamilazių, įterptų alginato struktūroje, aktyvumui.....	38
3.2.3. Alginata įterptų gliukoamilazių katalizės kinetiniai parametrai.....	39
3.2.4. Natrio alginato koncentracijos ir laikymo trukmės įtaka įterptų gliukoamilazių aktyvumui.....	41
3.3. Kovalentiškai imobilizuotų gliukoamilazių savybės.....	42
3.3.1. Glutaraldehido, fermento koncentracijos ir kapsulių išlaikymo fermentiniame tirpale trukmės įtaka gliukoamilazių savybėms.....	42
3.3.2. Temperatūros ir terpės pH įtaka kovalentiškai imobilizuotų gliukoamilazių aktyvumui.....	44
3.3.3. Kovalentiniu ryšiu prijungtų gliukoamilazių katalizės kinetiniai parametrai.....	46

3.3.4. Laikymo trukmės ir glutaro aldehido koncentracijos įtaka kovalentiškai imobilizuotoms gliukoamilazėms	48
3.4. Skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių agregatų savybės.....	48
3.4.1. Glutaro aldehido ir fermento kiekio įtaka skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių agregatų aktyvumui	48
3.4.2. Temperatūros ir pH įtaka skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių aktyvumui.....	50
3.4.3. Skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių katalizės kinetiniai parametrai.....	51
3.4.4. Glutaro aldehido koncentracijos ir laikymo trukmės įtaka skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių agregatų aktyvumui	53
3.5. Imobilizuotų gliukoamilazių panaudojimo galimybės krakmolingos žaliavos fermentinei hidrolizei.....	54
3.5.1. Krakmolingos žaliavos hidrolizės trukmės nustatymas.....	54
3.5.2. Imobilizuotų gliukoamilazių panaudojimo ciklą skaičius krakmolingos žaliavos hidrolizei	55
4. Rekomendacijų dalis	57
Išvados	59
Literatūros sąrašas	61

Santrumpų ir terminų sąrašas

GLA – gliukoamilazė

KEV – krakmolo ekvivalento vertė

GEV – gliukozės ekvivalento vertė

K_M – Michaelio konstanta

V_0 – pradinis reakcijos greitis

V_{max} – maksimalus reakcijos greitis

DNS – 3,5-dinitrosalicilo rūgšties reagentas

SRA – skersiniais ryšiais susiūti agregatai

Įvadas

Amilazės yra plačiausiai pramonėje naudojami fermentai. Amilazės naudoja tokios pramonės šakos: tekstilės, popieriaus, maisto ir gėrimų, valymo priemonių, krakmolo perdirbimo technologijos, taip pat bioetanolio gamyba panaudojant grūdinę žaliavą. Tačiau fermentų naudojimas tirpioje formoje (t. y. laisvųjų fermentų) gali būti traktuojamas kaip fermento švaistymas, nes po fermentinės reakcijos, fermentas nebegali būti išgautas ir panaudotas kitose reakcijose. Todėl pastaruoju metu didelio mokslininkų susidomėjimo tiek tarptautiniu, tiek ir nacionaliniu mastu sulaukė fermentų imobilizavimo ir imobilizuotų fermentų panaudojimo tyrimai. Tai nauja biotechnologijos sritis, susijusi su fermentų imobilizavimu ant netirpiųjų polimerų, tokių kaip membranos ar dalelės, veikiančios kaip fermentinio aktyvumo nešikliai. Pritvirtinti prie kietų paviršių (arba imobilizuoti juose) fermentai gali būti naudojami katalitiniuose procesuose pakartotinai, kadangi nesudėtingai gali būti išskirti iš reakcijos mišinio. Daugkartinis fermentų panaudojimas stipriai padidina technologinio proceso ekonomiškumą, nes fermentų imobilizavimas ant kieto nešiklio įgalina fermentus naudoti pakartotinai ir ilgesnį laiką – padidėja jų efektyvumas. Kita priežastis imobilizuoti fermentus yra jų stabilumo padidinimas. Fermentai tam tikromis terpės pH ir temperatūros sąlygomis yra nestabilūs ir netenka aktyvumo, arba jis labai sumažėja, tačiau juos pritvirtinus prie inertinio polimerinio paviršiaus tampa stabiliais, o jų fermentinis aktyvumas laikymo metu kinta mažiau. Dabartiniu metu imobilizuoti fermentai pramoniniu būdu panaudojami maisto pramonėje, biomedicinoje, biodyzelino gamyboje, ploviklių pramonėje. Nors imobilizuotus fermentus galima naudoti pakartotinai, tačiau jų aktyvumas po kelių panaudojimo kartų mažėja. Tam įtakos gali turėti ir imobilizavimo parametrai tokie kaip polimero (nešiklio), susiuvimo agento, fermento koncentracijos, o ypač imobilizavimo būdas. Todėl svarbu ištirti įvairių imobilizavimo metodų taikymo galimybes gliukoamilazių, plačiai naudojamų krakmolingos žaliavos hidrolizei, imobilizavimui. Šio mokslinio tyrimo metu bus išbandyti trys skirtingi amilazių imobilizavimo metodai ir nustatytos imobilizuotų ir laisvųjų gliukoamilazių savybės (jų aktyvumas esant skirtingoms temperatūroms, pH vertei, aktyvumo priklausomybė nuo panaudojimo kartų ir kt.), taip pat nustatytas imobilizavimo efektyvumas. Skirtingais būdais imobilizuoti fermentai išbandyti grūdinės žaliavos fermentinei hidrolizei imituojant gamybines sąlygas mažo našumo įranga.

Šio mokslinio **darbo tikslas** – ištirti skirtingais būdais imobilizuotų komercinių gliukoamilazių savybes ir jų panaudojimo galimybes krakmolingos grūdinės žaliavos hidrolizei. Tikslui pasiekti suformuluoti šie **darbo uždaviniai**:

1. ištirti temperatūros ir terpės pH vertės įtaka komercinių gliukoamilazių aktyvumui ir parinkti optimalias sąlygas fermentinei hidrolizei,
2. skirtingais būdais imobilizuoti komercines gliukoamilazes: (a) įterpiant į polimero – alginato struktūrą, (b) kovalentiškai prijungiant ant polimerinio nešiklio (alginato) ir (c) sudarant skersiniais ryšiais susiūtus agregatus ir nustatyti imobilizavimo efektyvumą,

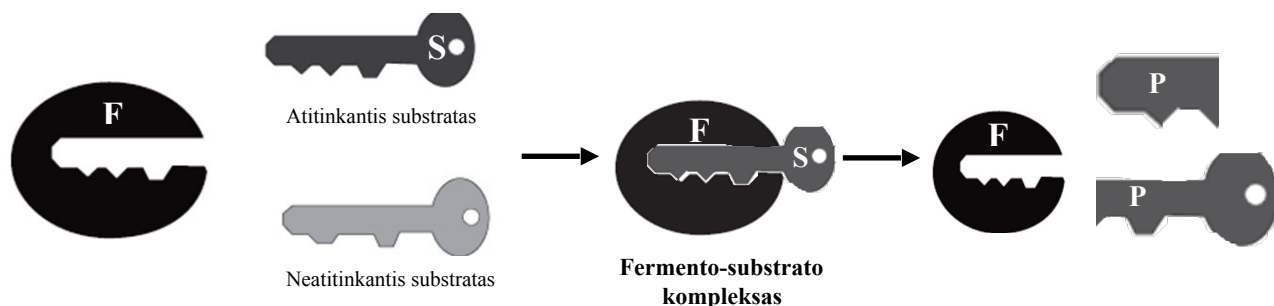
3. ištirti imobilizuotų fermentų savybes: pH ir temperatūros įtaką, stabilumą laikymo metu bei nustatyti pagrindinius kinetinius parametrus, tokius kaip Michaelio konstantą, pradinį ir maksimalų reakcijos greitį,
4. palyginti skirtingais būdais imobilizuotų amilazių panaudojimo galimybes krakmolingos žaliavos fermentinei hidrolizei.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Fermentų struktūra, savybės, jų veikimo mechanizmas bei panaudojimas

Fermentai yra kataliziškai aktyvūs baltymai, kurie gyvame organizme vykdo metabolizmo procesus. Tiksliau, juos galima apibūdinti kaip natūralios būsenos aktyvią polipeptidinę grandinę ar grandinių visumą, greitinančią reakcijas. Tai yra sudėtingas kopolimeras, sudarytas iš aminorūgščių monomerų. Be baltyminės dalies vadinamos apofermentu, fermentas turi ir nebaltyminį fragmentą, vadinamą kofermentu. Baltyminėje dalyje peptidinės grandinės išsidėsto tam tikra erdvine tvarka ir sudaro fermento aktyvųjį centrą, kuris lemia fermento specifiškumą substratui. Fermento aktyvųjį centrą sudaro aminorūgštys ir jų funkcinės grupės, kai vienos nulemia fermento–substrato, kitos fermento–produkto komplekso susidarymą.

Aminorūgščių seka ar baltymo pirminė struktūra lemia antrinę ir tretinę peptidinės grandinės struktūras. Susidaro erdvinė makromolekulė, kur tiksliai yra apibrėžta ertmė substratui. Paprastai tariant, fermento ir substrato sąveika atitinka „rakto ir spynos“ modelį, kai substratas labai tiksliai atitinka fermento aktyviojo centro erdvinę struktūrą, kaip raktas - spyną. 1.1 paveiksle iliustruota, kaip susiformuoja substrato–fermento kompleksas priartėjus substratui (S) prie fermento aktyviojo centro (tarpinis junginys), kuriame vyksta katalizės reakcija. Nuo fermento molekulės po reakcijos atskiriami susidarę produktai (P), o atsilaisvinęs fermentas vėl gali sudaryti substrato–fermento kompleksas, t.y. sąveikauti su kitu substratu [1,2].



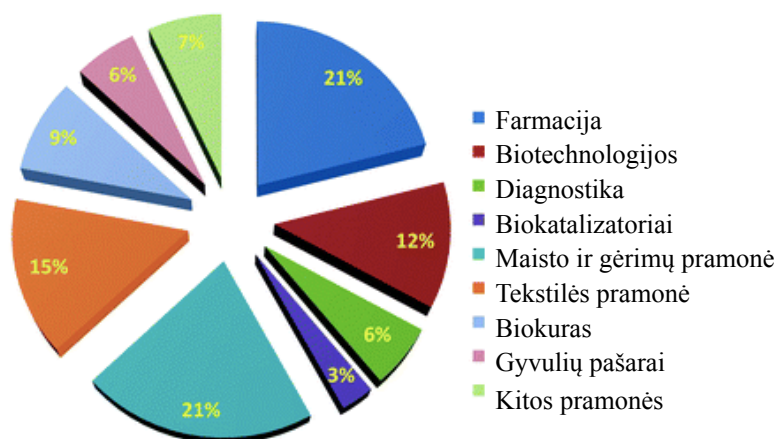
1.1 pav. Sąveika tarp fermento ir substrato paremta „spynos ir rakto“ modeliu, čia fermentas (F), substratas (S), substrato ir fermento kompleksas (FS), reakcijos metu gauti produktai (P)

Taip pat pastebimas indukuoto modelio mechanizmas, kai fermento aktyviojo centro struktūros yra kintančios, priklausomai nuo substrato formos. Fermento erdvinės struktūros pokyčiai sukeliama substratui priartėjus prie fermento aktyviojo centro. Šių pokyčių metu aminorūgščių liekanos, sudarančios aktyvųjį centrą, suformuoja palankią padėtį substrato–fermento kompleksui sudaryti [1,2].

Fermentų savybės yra itin jautrios įvairiems aplinkos poveikiams. Poveikis skiriasi priklausomai nuo naudojamo fermento ir atitinkamo parametro keitimo [1]. Kylant temperatūrai tam tikrame apibrėžtame intervale didėja fermentinės reakcijos greitis. Tačiau dauguma fermentų aukštesnėje nei 50 °C temperatūroje negrįžtamai denatūruoja, todėl prarandamas jų aktyvumas. Reikia paminėti,

jog yra išimtinių fermentų, kurie išlaiko tam tikrą aktyvumą ir esant aukštomis (arba itin žemoms) temperatūroms, pvz., ksilanazės išskirtos iš *Penicillium sp.* aktyviausios 7–100 °C temperatūroje [3]. Fermento stabilumui ir aktyvumui didelės įtakos turi terpės pH, kuri nulemia fermento aktyviojo centro rūgštinių bei bazinių funkcinų grupių ir likusių apofermento dalių disociaciją. pH reikšmė, kuriai esant fermentas yra aktyviausias, laikoma optimalia. Taip pat įvairūs efektoriai, kaip sunkieji metalai (Cu, Ag, Hg, Pb), inhibitoriai (jodacetamidas, N–etilmaleinimidas ir kt.) arba aktyvikliai (metalų jonai, PAM ir kt.) veikia fermento veiklą teigiamai arba neigiamai. Efektoriai susiriša su aktyviojo centro svarbiomis funkcinėmis grupėmis ir slopina arba aktyvina fermento veikimą [4,5].

Pagrindiniai fermentų panaudojimo rinkos segmentai pateikti 1.2 paveiksle [6]. Kiekvienais metais didėjantis gyventojų skaičius, besikeičiantis gyvenimo būdas, didina pramoninių fermentų poreikį gamybos įvairiuose pramonės sektoriuose, tame tarpe ir maisto pramonėje. Vieni iš plačiai naudojamų maisto pramonėje fermentų yra gliukoamilazės ir imobilizuotos šio fermento formos.



1.2 pav. Fermentų panaudojimas pramonėje [6]

1.2. Amilazių ir gliukoamilazių šaltiniai, savybės ir panaudojimas

Amilazė (E.C. 3.2.1.1), kurios sisteminis pavadinimas 4- α -D-gliukan-gliukanohidrolazė, turi didelį selektyvumą krakmolo hidrolizei. Tokios fermentinės hidrolizės reakcijos rezultatas yra monosacharidas – gliukozė [7].

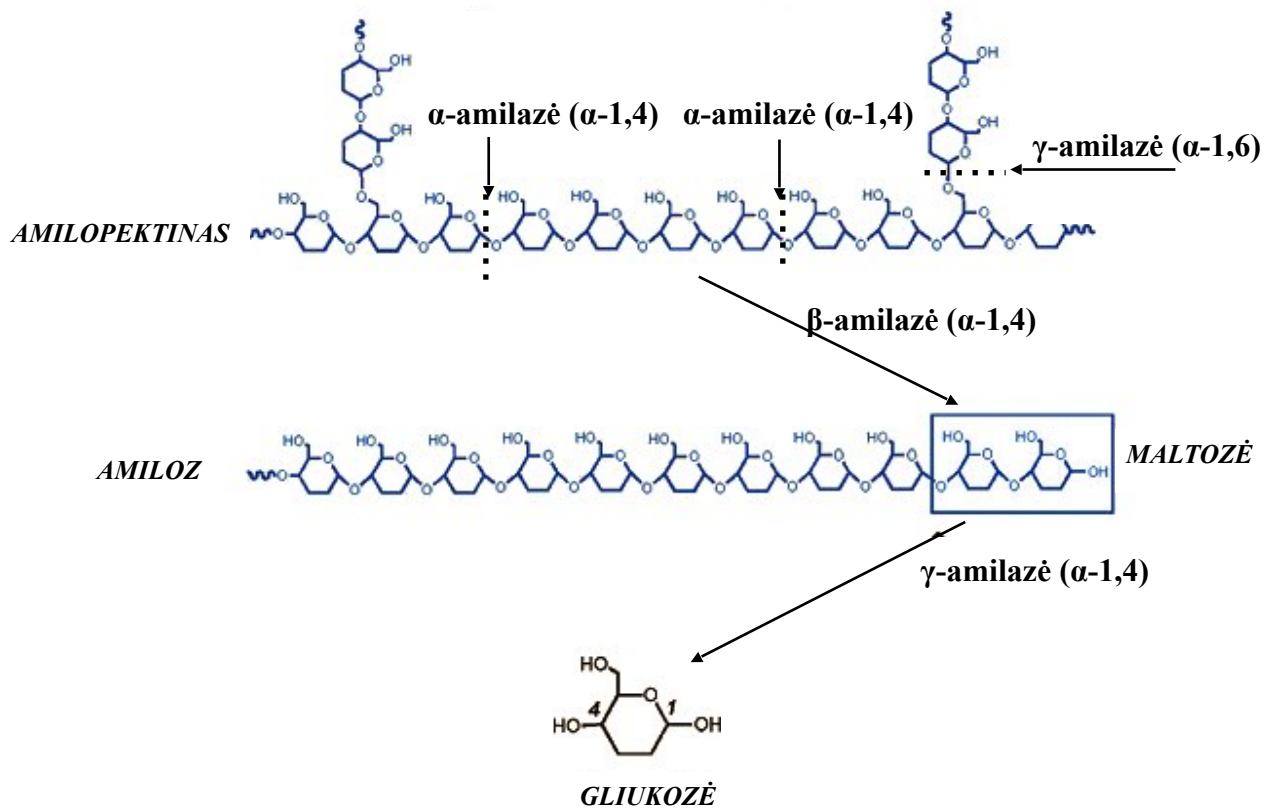
Amilazės plačiai paplitusios gamtoje, jos aptinkamos augaluose, gyvūnų seilėse, yra gaminamos bakterijų ir mikroskopinių grybelių. Amilazes gamina daugybė mikroorganizmų, tačiau pramonėje amilazės išgaunamos daugiausia iš *Bacillus* genties bakterijų – *B. licheniformis*, *B. stearothermophiles* ir *B.amyloliquefaciens*. Mikrobinės amilazės gamyba iš bakterijų priklauso nuo bakterijų kamieno tipo, terpės sudėties, auginimo sąlygų, maistinių medžiagų kompozicijos, inkubacijos laikotarpio, pH, temperatūros, metalo jonų ir pačių bakterijų savybių (pvz., termostabilumo) [8]. Kadangi amilazes gamina daugybė mikroorganizmų, skiriasi jų optimali temperatūra (30–80 °C) ir pH reikšmės (5,5–9), kurioms esant fermentas aktyviausias. 1.1 lentelėje pateikti fermento šaltiniai ir būdingos savybės.

1.1 lentelė. Amilazių šaltiniai ir būdingos temperatūros bei pH reikšmės

Amilazių šaltinis	Štamai	Opt. temperatūra, °C	Opt. pH	Nuoroda
Bakterijos	<i>B. thermooleovorans</i> , <i>B. pseudofirmus</i> , <i>B. cohnii</i> , <i>B. vedderi</i> , <i>B. agaradhaerens</i> , <i>N. halobia</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Holobacillus sp.</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C.</i> <i>taiwanensis</i> , <i>A. amylolyticus</i> , <i>B.</i> <i>sphaericus</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Chromohalobacter sp.</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. agaradhaerens</i> , <i>Gracilibacillus sp.</i> , <i>P. luteola</i> , <i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> , <i>C. alkanolyticum</i>	40-60	7	[9,10,11]
Aktinomicetai	<i>S. albidoflavus</i> , <i>N. aegyptia</i> , <i>S. gulbargensis</i> , <i>S. erumpens</i> , <i>S. clavifer</i> , <i>S. lonarensis</i> , <i>Nocardiosis sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i>	45	9	[12,13]
Archejos	<i>T. profundus</i> , <i>Thermus sp.</i> , <i>Thermococcus</i> <i>sp.</i>	7-80	5,5 - 6,5	[14,15]
Mikroskopiniai grybeliai	<i>P. fellutanum</i> , <i>P. rugulosum</i> , <i>P.</i> <i>janthinellum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>A. niger</i> <i>P. microspora</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>P.</i> <i>chrysogenum</i> , <i>F. incarnatum</i> , <i>P.</i> <i>polonicum</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>	30-35	5,5-7,5	[16,17,18]
Gyvūnų seilės	-	63–70 °C	7	[19,20,21]
Augalai	-	40	5,5-8	[20, 21]

Mokslininkai ilgainiui manė, kad amilazės yra vienos rūšies hidrolazės. Tačiau vėliau nustatyta, kad skirtingi mikro organizmai sintetina skirtingo tipo amilazes: gyvūnai gamina α -amilazes, augalai gamina β -amilazes, mikroorganizmai gamina visų tipų amilazes taip pat ir trečiąją amilazių grupę – γ -amilazes. Visų tipų amilazės vykdo krakmolo hidrolizę. Krakmolo hidrolizės reakcija dalyvaujant α - β - γ -amilazės fermentams pateikta 1.3 paveiksle, tačiau skiriasi šių amilazių veikimo principas. Amilazės skaldo α -1,4-glikozidinius ryšius, iš kurių α -amilazės skaldo atsitiktinius α -1,4-glikozidinius ryšius iki dekstrinų, β -amilazės skaldo dekstrinus iki disacharido – maltozės ir γ -amilazės skaldo maltozę iki gliukozės molekulių bei α -1,6-glikozidinius ryšius atskeliant amilopektino šakas.

γ -amilazės dar kitaip vadinamos gliukoamilazėmis (E.C. 3.2.1.3) yra amilolitinis fermentas, galintis hidrolizuoti β -D-gliukozės vienetus nuo neredukuoto krakmolo molekulės galo. Taip pat gliukoamilazės lizuoja α -1,6-glikozidinius ryšius amilopektino atsišakojimų vietose, tokiu būdu baigiant visą krakmolo hidrolizę iki gliukozės produkto.



1.3 pav. Krakmolo hidrolizės reakcija dalyvaujant α - β - γ -amilazės fermentams

Amilazės yra vienos iš daugiausia pramonėje naudojamų fermentų. Dėl gebėjimo hidrolizuoti krakmolą ar krakmolingas medžiagas amilazės naudojamos tekstilės, popieriaus, maisto ir gėrimų pramonėje, valymo priemonių gamyboje bei krakmolo perdirbimo technologiniuose procesuose [22]. Kadangi visos amilazių rūšys (α - β - γ -amilazės) geba hidrolizuoti krakmolą ar krakmolingas medžiagas, pramonėje naudojamas jų mišinys. Tokiu būdu užtikrinama visiška krakmolo hidrolizė iki gliukozės produkto.

Amilazės dažniausiai naudojamos krakmolo perdirbimo pramonėje – krakmolo sirupo gamyboje, kuris panaudojamas maisto, gėrimų pramonėje [23] kaip saldiklis. Reikėtų paminėti, kad pagrindinės amilazės naudojamos sirupo gamybai yra α - ir gliuko-amilazių mišinys. Šiuo mišiniu galima pasiekti net 96–98 % gliukozės krakmolo sirupo produkte. Proceso hidrolizatai toliau naudojami kaip anglies šaltinis fermentacijos procesuose arba kitais atvejais jie gali būti galutinio produkto, pavyzdžiui, gaiviųjų gėrimų, ledų, padažų, konservuotų vaisių, duonos ir kt. gaminių dalis [24]. Taip pat amilazės plačiai naudojamos konditerijos/kepinių pramonėje kaip priedas, padedantis greičiau suskaidyti krakmolą iki dektrinų ir taip suaktyvinantis mielių fermentavimo savybes, pagreitinantis kildinimo procesą. Konditerijoje naudojamas amilazių mišinys suteikia produktui specifinį papildomų cukrų skonį bei prailgina tokio produkto galiojimo laiką [25]. Amilazės naudojamos gėrimų pramonėje kaip skaidrinimo agentas. Vokiečių mokslininkų straipsnyje tirta žmogaus jautra atskiroms amilazių rūšims ir nustatyta, kad kildinimo milteliuose naudojamos α -amilazės yra mažesnis dirgiklis nei gliukoamilazės (γ -amilazės), todėl galima teigti, kad maisto pramonėje iš amilazių dažniausiai pritaikomos α -amilazės [26].

Amilazės naudojamos tekstilės pramonėje pašalinti glitui (*ang.* desizing). Prieš audinio gamybą audinio siūlai padengiami krakmolo glitu, siekiant išvengti siūlų nutrūkimo audimo metu. Išaustam audiniui amilazės selektyviai pašalina glitą ir nepažeidžia pačio pluošto [27].

Popieriaus pramonėje amilazės talkina kaip krakmolo modifikatoriai, kurie padeda sudaryti mažos klampos krakmolo dangą. Toks modifikuoto krakmolo sluoksnis dengiamas ant popieriaus paviršiaus – popierius tampa pakankamai lygus ir tvirtas taip pagerinama ir popieriaus rašymo kokybė [28].

Viena naujausių bei pasaulyje didėjanti pramonė yra ekologiškų detergentų (valymo priemonių) pramonės šaka. Fermentų naudojimas skalbiklių pramonėje padidina galimybes pašalinti neįveikiamas dėmes bei pats skalbiklis yra ekologiškas. Detergentų sudėtyje didžiausia dalį sudaro amilazių mišinys t.y. 90 % visų fermentų dalį. Šie fermentai naudojami skalbinių, indų plovikliuose, kad suskaidytų krakmolingų maisto produktų, tokių kaip bulvės, kruopos, varškė, šokoladas ir kt., liekanas iki dekstrinų ir kitų mažesnių oligosacharidų [29, 30]. Jau dabar parduotuvėse bei e-parduotuvėse galima rasti daugybę ekologiškų valymo priemonių, pagamintų tokiu fermentų pagrindu – *Balance, Amway, Ecozone, Persil, Ecover* ir kt.

1.3. Fermentų imobilizavimo būdai

Per praėjusį dešimtmetį fermentų imobilizavimas sulaukia vis daugiau pramonės dėmesio. Maisto, gėrimų pramonėje imobilizuoti fermentai naudojami dėl mažų gamybos sąnaudų, dėl pakartotinio naudojimo, o tai ypač svarbu nepertraukiamos gamybos technologijose. Taip pat imobilizuoti fermentai yra stabilesni temperatūros pokyčiams, terpės pH, organinių tirpiklių poveikiui bei yra rentabilūs, o galutinis produktas neužteršiamas šalutiniais produktais [31].

Fermentų imobilizavimo metodikas galima suskirstyti į fizikinius arba cheminius metodus:

1. fermento įjungimas į erdvines polimero struktūras, nesudarant cheminių ryšių,
2. fermento prijungimas prie kietojo nešiklio paviršiaus, sudarant chemines arba fizikines sąveikas (adsorbicija, kovalentinis ryšys),
3. fermento susiuvimas bifunkciniais reagentais.

Dabartiniai pasaulio biotechnologijų pramonės poreikiai siekia didinti gamybos produktyvumą pritaikant naujus metodus. Būtent fermentų imobilizavimas suteikia produkto gamybos linijai nepertraukiamą produkto gamybą, prailgina jo galiojimo laiką ir aplenkia ilgus produkto gryninimo procesus. Taip pat imobilizuotą fermentą lengva atskirti nuo produkto ir pakartotinai naudoti daugybę kartų. Tačiau nereiktų pamiršti, jog imobilizuoti fermentai praranda dalį savo aktyvumo bei imobilizacijos procesas pritraukia papildomas išlaidas.

1.3.1. Imobilizacija įjungiant į erdvines struktūras

Tai fermento įjungimas į erdvinę polimero (dažniausiai alginato) struktūrą, kuri pasižymi poringumu. Fermentas yra įstriginamas minėtame poringame nešiklio tinkle ir fiksuojamas papildomai susidariusiomis kovalentinėmis ar nekovalentinėmis jungtimis. Vieni efektyviausių

žinomų nešiklių yra alginatas, želatina, kerageninas, poliakrilamidas, hitozanas, kolagenas, celiuliozės triacetatas, nailonas, polisulfonas, polivinilo alkoholis ar modifikuotas polivinilo alkoholio alginatas, agaras bei poliuretanai ir kt., kurie užkerta kelią fermentų nutekėjimui ir užtikrina mechaninį fermento stabilumą. Taip pat imobilizacijai įjungiant į erdvines struktūras gali būti naudojami kieti nešikliai, kaip aktyvuota anglis, porėtos keramikinės medžiagos [33, 34]. Gamtiniai polimerai sudaro gelius tiesiog pakeitus temperatūrą, kartu kintant tirpalo joninei jėgai bei keičiant tirpiklį. Gelio struktūra išlieka patvari dėl vandenilinių jungčių, kurios, pakitus temperatūrai, suyra ir gelis suskystėja. Tačiau šiuo metu didžiausią imobilizacijos nešiklių revoliuciją sukėlė fermentų įjungimas į nanostruktūras (nanoplūštus) dėl itin didelio pastarųjų paviršiaus ploto ir palankios nešiklio sandaros ir savybių. Todėl nanostruktūrose imobilizuoti fermentai dabar pritaikomi chemijos, biomedicinos srityse bei biojutiklių, biodegalų gamyboje.

Fermentai ar mikroorganizmų, gaminančių tikslią fermentą, ląstelės, nėra tiesiogiai tvirtinamos prie atraminio paviršiaus, o tiesiog įjungiamos į polimero tinklą. Taip sudaromas fizinis barjeras tarp substrato molekulių esančių reakcijos terpėje ir fermento. Tačiau tobulinant imobilizacijos metodiką fermentą apsupusi membrana dažnai yra pralaidi substratui ir nelėtina fermentinio proceso. Svarbiausias aspektas, į kurį atsižvelgiama imobilizuojant fermentą į matricos struktūras - tai pastarosios poringumas. Membranos poringumas yra griežtai parenkamas pagal naudojamus fermentus ir substrato molekulių dydžius [35].

1.3.2. Adsorbcija ir imobilizavimas kovalentiniu ryšiu

Šis fermento imobilizavimo metodas yra pagrįstas fermento fizikine adsorbcija ant vandenyje netirpaus nešiklio paviršiaus. Dėl šio metodo fermento konformaciniai ar aktyvaus centro pokyčiai yra nedideli arba visiškai nepasireiškia. Atrinkus tinkamą nešiklį, šis metodas gali būti itin paprastas ir pigus. Tačiau pagrindinis šio imobilizacijos metodo trūkumas yra adsorbuoto fermento išplovimas nuo nešiklio paviršiaus dėl silpnų fermento-nešiklio adsorbcijos jėgų, kurios pasireiškia tokiais fizikinėmis sąveikomis: Van Der Valso jėgos, hidrofobinė sąveika, joninės bei vandenilinės jungtys [36].

Fermento adsorbcijai naudojami nešikliai:

- neorganinės kilmės medžiagos (kaolinas, silikagelis ir kt.), kurių didelis paplitimas, lengva gavyba;
- baltymai (želatina, kolagenas), pasižymi specifiskumu, naudojami afininėje imobilizacijoje;
- polisacharidai (agarozė, karagenanai, celiuliozė ir kt.), kurie naudojami beveik visų fermentų imobilizacijai dėl savo plataus pritaikomumo;
- akrilo bei stireno kopolimerai, kurie turi didelį paviršiaus plotą labai tinkantį oksidacijos redukcijos reakcijoms;
- ekologiški nešikliai kaip kokoso pluoštas ar medienos atplaišos, kurių ekopluoštas palaiko vandens kiekį reikalingą fermento funkcionalumui [37-41].

Fermentų imobilizavimas kovalentiniu ryšiu yra plačiai pramonėje naudojamas metodas. Sudarytas kovalentinis ryšys tarp fermento ir nešiklio sudaro stabilius jų kompleksus. Kovalentinė jungtis yra

itin stipri cheminė jungtis, todėl taip imobilizuotas fermentas nėra išplaunamas nuo nešiklio paviršiaus net tuomet kai šalia fermento atkeliauja substratas ar aukštos joninės jėgos tirpiklio molekulės. Kovalentinis prisijungimas prie atraminės matricos turi apimti tik tas fermento funkcinės grupės, kurios nėra būtinos kataliziniam veikimui. Kovalentinis fermento imobilizavimas vis dėlto nėra lengvai suvaldomas dėl kovalentinio ryšio sudarymui naudojamų cheminių surišimo agentų. Dažnai mokslininkai aprašo nesėkmingos kovalentinės imobilizacijos rezultatus, kai imobilizuotas fermentas praranda fermentinį aktyvumą arba pakeičia fermento molekulės struktūrinius elementus ir sukelia fermento denatūraciją [42, 43].

Vykdamas kovalentinę imobilizaciją labai svarbu teisingai įvertinti fermento savybes (funkcinės grupės). Prijungiant fermentą prie nešiklio negali pakisti fermento aktyvusis centras t. y. fermentas prie nešiklio turi būti prijungiamas per šonines jungtis, kurios nereikalingos fermento aktyvumo palaikymui. Pagrindinės šoninės grupės galėtų būti: amino rūgštis (argininas, asparto rūgštis, histidinas) funkcinės grupės, imidazolo žiedas, serino ir treonino hidroksilinės grupės, cisteino merkaptido grupė, sulfhidrilo grupė ir kt [43].

Taip pat itin svarbu įvertinti nešiklio savybes. Jei atraminė matrica turi pakankamai reaktinių funkcinę grupių, tokią matricą galima imobilizacijai panaudoti iš karto. Tačiau, kitu atveju, kad pritaikyti sėkmingą kovalentinę imobilizaciją, nešiklis papildomai aktyvuojamas bifunkciniais reagentais. Nešiklio aktyvavimas vyksta keičiant nereaktingas funkcinės nešiklio grupės į kitas – labiau reaktingas: karboksi (-COOH) grupė keičiama acilhalogenido (-COX) arba acilazido (-CON₃) grupe, fenilamino (-C₆H₅NH₂) grupė gali būti keičiama izocianato (-N=C=S) grupe, hidroksilo (-OH) grupės keičiamos į imidokarbonato grupę [43,44]. Nešiklio paviršiaus reaktinumo pakeitimui dažnai naudojami reagentai, turintys dvi vienodas funkcinės grupės. Labiausiai žinomas kovalentinės imobilizacijos surišėjas - glutaro aldehidas (OHC(CH₂)₃CHO), kuris kartais pakeičiamas karbodiimidais (RN=C=NR) ar kitais surišimo agentais. Bifunkciniais reagentais gali būti aktyvinamos amino ir karboksilo funkcinės grupės [45].

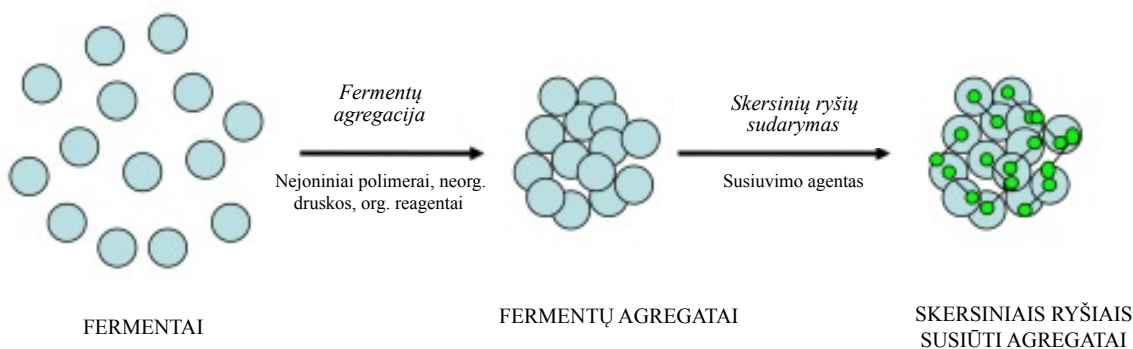
1.3.3. Imobilizacija susiuvant

Fermento imobilizavimas susiuvant yra vienas naujausių metodų, kuris taikomas biologinėje svarbių chemikalų ir vaistų gamyboje. Šiuo būdu fermentai yra sujungiami vienas su kitu bifunkciniais ar daugiafunkciniais reagentais, sudarydami cheminius ryšius tarpusavyje. Taip imobilizuoti fermentai vadinami skersiniais ryšiais susiūti fermento agregatai. Šis metodas yra bene patys efektyviausias iš darbe išvardytų būdų, nes cheminė jungtis tarp fermentų užtikrina nepakitusių fermento aktyvųjį centrą, fermento veiklai įtakos gali turėti tik jo suvaržytas lankstumas. Tačiau lankstumo nebuvimas užkerta kelią bet kokiam svetimkūnio įsibrovimui į agregatų vidų ir taip sukeltantį pašalinių reakcijų grandinę.

Dažniausiai naudojamas susiuvimo agentas yra glutaro aldehidas, kurio reaktingosios aldehido grupės, esančios glutaro aldehido galuose, reaguoja su laisvosiomis fermento aminorūgščių grupėmis. Glutaro aldehidas naudojamas imobilizavimo procesuose dėl nedidelės kainos, stabilumo

bei efektyvumo [46]. Tačiau glutaro aldehidas yra pritaikomas ne visų fermentų imobilizacijai, nes gali inaktyvuoti fermento aktyvųjį centrą [47] arba sujungti fermentus į supermolekulę ir taip užslėpti aktyvųjį centrą jos viduje. Taip pat glutaroaldehido likučiai yra metami arba išplaunami į aplinką, todėl gali neigiamai paveikti žmogaus sveikatą bei vandens ekosistemą. Siekiant aplenkti glutaroaldehido sukeliamas kliūtis, jau kelis metus yra išbandomi kiti susiuvimo agentai, tokie kaip polialdehido dekstranas, aktyvuotas chitozanas, L-lizinas, pektinas ir kt. Mokslininkų teigimu, šiais susiuvimo reagentais išvengiama agreguotų fermentų inaktyvavimo, lizinas bei chitozanas – natūralios kilmės biomolekulės išsprendžia riziką užteršti vandens ekosistemą, agreguojant pektinu – pasiekti dideli fermento aktyvumai lyginant su glutaroaldehidu [48,49,50].

Pirmiausia, kad įvykdyti šią imobilizaciją fermentas yra išsodinamas panaudojant specifinius organinius agentus, neorganines druskas ar nejonizuotus polimerus. Išsodinti fermentai tampa netirpūs ir iškrenta nuosėdomis. Taip paveikti fermentai surišami bifunkciniais reagentais ir gaunami skersiniais ryšiais susiūti fermento agregatai (angl. Crossed-linked enzyme aggregates, *CLEA*) (1.4 pav.). *CLEA* yra fermento imobilizavimo forma, kuri yra veikli vandeniniuose tirpaluose. Taip susiūti fermentai gali būti pakartotinai panaudoti, taip pat pasižymi ganėtinu stabilumu ir efektyvumu.



1.4 pav. Skersiniais ryšiais susiūtų fermentų agregatų imobilizacijos mechanizmas [50]

1.3.4. Imobilizuotų fermentų aktyvumo įvertinimas

Fermentai, fiksuoti erdvinėse struktūrose ar ant jų paviršiaus, pasižymi stabilumu. Tačiau žinoma, kad dalis fermentų praranda savo aktyvumą. Imobilizuoto fermento aktyvumo įvertinimui ir charakterizavimui naudojami tokie pagrindiniai parametrai:

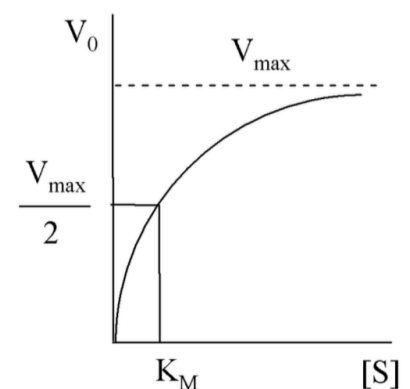
1. *Imobilizacijos efektyvumo koeficientas* ($I\%$), kuris parodo fermento kiekį, kuris sėkmingai imobilizavosi naudojtoje matricoje. Įprastai išreiškiamas imobilizuotų ir pradiniam tirpale fermentų kiekio santykiu procentais: $I\% = AV_{\text{imobilizutas}} / AV_{\text{pradinis}} * 100\%$.
2. *Fermentinis aktyvumas* rodo, kokių greičiu fermentas geba katalizuoti substrato vartimą produktą. Fermento aktyvumas išreiškiamas susidariusio produkto ar panaudoto substrato

koncentracijos pokyčiu per laiko vienetą, dažniausiai per minutę ar sekundę. Fizikine prasme fermentinis aktyvumas yra greitis, kuris dažniausiai yra išreiškiamas μmol susidariusio produkto (arba sunaudoto substrato) per minutę ($\mu\text{mol}/\text{min}$). Jis vadinamas tarptautiniu fermentiniu aktyvumo vienetu ir žymimas simboliais AV (ang. *International unit, IU*) bei apibrėžiamas kaip fermento kiekis, kuris katalizuoja 1 μmol substrato vartimą į produktą per vieną minutę, esant optimalioms reakcijos sąlygoms. Optimalios reakcijos sąlygos yra optimali terpės pH vertė ir optimali temperatūra, tačiau šios sąlygos kiekvienam fermentui gali būti skirtingos. Dažnai fermento aktyvumas išreiškiamas fermento specifiniu aktyvumu, kuris parodo fermento vienetų skaičių viename masės arba tūrio baltymų vienetė (AV/mg , AV/ml) [22].

3. *Kinetiniai reakcijos parametrai* – pradinis reakcijos greitis, Michaelio konstanta, maksimalus reakcijos greitis yra esminiai indikatoriai įvertinantys imobilizacijos sėkmę. Pradinio reakcijos greičio reikšmė leidžia spėti apie galimą hidrolizės pabaigą t.y. kuo didesnė reikšmė tuo fermentinės reakcijos metu greičiau pagaminamas produktas ir nusistovi produkto kiekio pusiausvyra. Michaelio konstantos reikšmė leidžia nustatyti imobilizuoto fermento giminingumą substratui t.y. kuo reikšmė mažesnė tuo fermento giminingumas substratui didėja, todėl galimai fermentinė reakcija vyks sklandžiau bei greičiau. Maksimalaus reakcijos greičio reikšmė leidžia nustatyti fermento katalizinį efektyvumą.

a) Pradinis reakcijos greitis apibūdinamas pastoviu greičiu t.y. vienodai didėjančiu reakcijos produkto kiekiu. Kai substrato kiekis reakcijos terpėje mažas, reakcijos greitis priklauso nuo substrato koncentracijos. Esant bet kuriam pradiniam greičiui, tik dalis fermento molekulių aktyviųjų centrų sudaro kompleksus su substratu. Taigi fermento-substrato kompleksų kiekis tiesiogiai priklauso nuo substrato kiekio. Didinant substrato kiekį reakcijos terpėje, reakcijos greitis didėja neproporcingai tol, kol pasiekia beveik pastovią reikšmę [51].

b) Michaelio konstanta (K_M) yra lygi substrato koncentracijai, kuriai esant reakcijos greitis yra lygus pusei didžiausio greičio (V_{\max}). K_M galima nustatyti iš grafiko pažymėjus reakcijos greičio priklausomybę nuo substrato koncentracijos (1.5 pav.), tačiau ši reikšmė yra netiksli, nes neįmanoma tiksliai nustatyti V_{\max} . K_M ir V_{\max} reikšmės nustatomos iš atvirkštinių Lainuivero ir Berko (ang. Lineweaver-Burk) koordinačių [51]. Šis metodas aprašytas 2.3.5 skyrelyje.



1.5 pav. Fermentinės reakcijos greičio priklausomybė nuo substrato koncentracijos [51]

c) Maksimalus reakcijos greitis (V_{\max}). Didinant substrato kiekį reakcijos terpėje, reakcijos greitis didėja neproporcingai tol, kol pasiekia beveik pastovią reikšmę. Tuo atveju, kai substrato koncentracija yra tiek didelė, kad visas reakcijoje dalyvaujantis fermento kiekis sudaro fermento ir substrato kompleksą, reakcija vyksta didžiausiu greičiu – V_{\max} [51].

1.4. Imobilizuotų gliukoamilazių savybės

Gliukoamilazių imobilizavimas ant kietojo nešiklio yra vienas pirmųjų metodų aprašytas moksliniuose straipsniuose, kurį 1972 m. aprašė Japonijos mokslininkų grupė [33]. Mokslininkai fiziškai adsorbavo gliukoamilazę ant celiuliozės pluošto (DEAE-C) ir nustatė, kad tokiu būdu imobilizuotos gliukoamilazės išlaiko savo fermentinį aktyvumą.

Praėjusiu daugiau nei 40 metų nuo vieno iš pirmojo gliukoamilazių imobilizavimo – technologijos patobulėjo, todėl dabar galima rasti ištirtus ir mokslinėje literatūroje aprašytus naujus, taip pat efektyvius gliukoamilazių imobilizavimo būdus. Gliukoamilazės gali būti imobilizuojamos kovalentiškai, adsorbcijos būdu, įterpiant į polimerų/gelių struktūras, taip pat susiuvant skersiniais ryšiais ir gaunant gliukoamilazių agregatus. Metodas, kai imobilizavimui naudojamas susiuvimas skersiniais ryšiais yra naujas, todėl sulaukia vis daugiau susidomėjimo [49, 68, 70, 99].

1.3 lentelėje pateikti gliukoamilazių (GLA) imobilizavimo būdai, naudoti nešikliai ar bifunkciniai reagentai kiekvienam imobilizacijos metodui bei pakitusios imobilizuotų gliukoamilazių savybės. Dažniausias imobilizacijos metodas yra gliukoamilazės prijungtos kovaleniais ryšiais prie nešiklio. Imobilizacijai naudojami nešikliai: k-karageninas [52], aldehydinė celiuliozė [53], hidrogeliai [54], alginatas kt. Tai polisacharidiniai dariniai, turintys savybę tirštėti ir sudaryti gelio struktūras. Tokie geliai pasižymi itin stipriomis mechaninėmis savybėmis, dideliu paviršiaus plotu, kuriame yra prieinamų funkcinių grupių prisijungti fermentui, taip pat pasižymi mikrobiniu atsparumu ir yra pigūs.

1.3 lentelė. GLA imobilizacijos būdai, naudojami nešikliai, bifunkciniai reagentai ir pagerintos imobilizuotų GLA savybės. Čia K-kovalentinės imobilizacijos metodas, A-adsorbcija, ĮK-įkapsuliavimas į erdvines struktūras, SRA-skersiniais ryšiais susiūti GLA agregatai, PEI-polietileniminas, GA-glutaraldehydas, NS-nanostruktūra, APTES-3-aminopropiltrioksilanas, EDC-1-3-dimetilaminopropil-3-etilkarbodiimido hidrochloridas, GO-glioksalis, TFE-trifluoretilo alkoholis

Nešiklis/bifunkciniai reagentai	Imobilizacijos būdas	Imobilizuotų GLA savybės	Nuoroda
K-karagenino kapsulės aktyvuotos PEI ir GA	K	1. Terminis stabilumas 60–80 °C 2. pH stabilumas rūgštinėse sąlygose 3. 100% fermentinis aktyvumas po 11 ciklų	[52]
Celiuliozė aktyvuota NaIO ₄	K	1. Terminis stabilumas 50-75 °C 2. 70% fermentinis aktyvumas po 30 ciklų	[53]
Hidrogeliai aktyvuoti GA	A, K	1. Fermentinis aktyvumas 20-30 °C 2. Padidėjęs fermentinis aktyvumas veikiant UV 3. pH stabilumas rūgštinėse sąlygose 4. 80% fermentinis aktyvumas po 1 mėn. sandėliavimo	[54]
Fe ₃ O ₄ /grafeno oksidas NS	K	1. Terminis stabilumas 2. Daugkartinis panaudojimas	[55]

Ag/Fe oksidas NS	K	<ol style="list-style-type: none"> 11 kartų padidėjęs specifinis fermentinis aktyvumas $K_m=3$ mM, laisvo fermento $K_m=6$ mM NS su fermentu pasižymi antimikrobinėmis savybėmis 97% fermentinis aktyvumas po 8 ciklų 95% fermentinis aktyvumas po 1 mėn. sandėliavimo 	[56]
Grafitas/ Fe_3O_4 NS aktyvuotos APTES ir GA	K	<ol style="list-style-type: none"> Terminis, pH stabilumas Daugkartinis panaudojimas 	[57]
Fitocheminėmis medž. padengtos sidabro nanodalelės, aktyvuotos EDC	K	<ol style="list-style-type: none"> Terminis, pH stabilumas 60% fermentinis aktyvumas po 10 ciklų 	[58]
Silicio tipo mezoporringa medžiaga	A	<ol style="list-style-type: none"> Sumažėjęs fermentinis aktyvumas Terminis ir pH stabilumas 	[59]
DEAE-agarozė, Q1A-Sepabeads, Sepabeads EC-EP3 aktyvuoti PEI	A	<ol style="list-style-type: none"> Terminis stabilumas Daugkartinis panaudojimas 	[60]
GA ir apsauginiai agentai - dektrino/ksantano guma	SRA	<ol style="list-style-type: none"> Terminis stabilumas 55–75 °C pH stabilumas intervale nuo 3–8 55% fermentinis aktyvumas po 24 ciklų 60% fermentinis aktyvumas po 3 mėn. sandėliavimo 	[61]
Magnetinė NS ir aldehydinis pektinas	SRA	<ol style="list-style-type: none"> 95,4% fermentinis aktyvumas Terminis stabilumas Pagerintas substrato pernašos mechanizmas 84% fermentinis aktyvumas po 10 ciklų Nepakito fermento giminingumas 	[26]
GO, TFE	SRA	Čia pateikiami GLA struktūriniai kitimai, svarbūs SRA susidarymui. GLA struktūra kinta iš tretinės į antrinę, iš antrinės į β struktūrą. β struktūros indukcija labiausiai skatina baltymų agregaciją.	[62]
Cinko acetatas ir 2-metilimidazolas	SRA	<ol style="list-style-type: none"> Padidėjęs V_{max} 52% fermentinis aktyvumas po 5 ciklų 95% fermentinis aktyvumas po 24 dienų sandėliavimo 	[63]

Kinijos mokslininkų grupė imobilizavo GLA kovalentiniais ryšiais prijungiant fermentą prie k- karagenino kapsulių, aktyvuotų polietileniminu (PEI) ir glutaroaldehydu (GA). Manoma, kad PEI ir GA nešiklio paviršiuje suformavo *Šifo bazę* (-N=CH-), prie kurios buvo jungiamas fermentas. Taip imobilizuotos GLA pasižymėjo terminiu stabilumu 60–80 °C temperatūroje (laisvos GLA buvo aktyvios tik 60 °C), pH stabilumas rūgštinėje terpėje, padidėjusia Michaelio konstanta (K_m) ir sumažėjusiu maksimaliu reakcijos greičiu (V_{max}). Čia aprašytos imobilizuotos GLA po 11 hidrolizės ciklų išlaikė 100 % aktyvumą [52].

Azijos mokslininkai imobilizavo GLA ant cukranendrių išspaudų celiuliozinio pluošto. Celiuliozė buvo oksiduota natrio perjodato ir sieros rūgšties terpe, taip celiuliozinio pluošto paviršių aktyvinant aldehidinėmis grupėmis, per kurias sudarytas kovalentinis ryšis su GLA amino grupėmis. Taip imobilizuotos GLA pasižymėjo itin aukštu stabilumu ir aktyvumu (70 %) net po 30-ties panaudojimo kartų. Mokslininkai teigia, kad toks stabilus fermento aktyvumas per 30 hidrolizės ciklų pasireiškia dėl stipraus sudaryto kovalentinio ryšio tarp celiuliozės nešiklio ir fermento [53].

Kinijos mokslininkų grupė imobilizavo GLA, prijungiant kovalentiniu ryšiu fermentą prie N-izopropilakrilamido hidrogelių. Mokslininkai teigia, jog tyrime naudoti hidrogeliai pasižymi žemesne krizine temperatūra (*ang.* lower critical solution temperature, LCST) ir yra atsparūs šviesai (ultravioletinė spinduliuotė, UV). Keičiant temperatūrą į didėjimo ar mažėjimo pusę nuo LCST hidrogelis irgi keičiasi t. y. hidrogelio struktūra arba išbrinksta, arba susitraukia – taip mechanškai padidinamas arba sumažinamas nešiklio paviršiaus plotas, prie kurio jungiamas fermentas ir hidrolizės metu atkeliauja bei tvirtinasi didelės substrato molekulės. Naudojant tokį hidrogelį kaip nešiklį GLA imobilizavimui, galima grįžtamai valdyti hidrolizės reakciją keičiant tik temperatūrą. Tokie hidrogeliai buvo aktyvuoti glutaraldehidu. Nustatyti trys imobilizuotų GLA aktyvumui darantys įtaką veiksniai: temperatūra, UV spinduliuotė ir terpės pH. Hidrogelių LCST temperatūra yra 35,4 °C – 37,7 °C, todėl vykdant hidrolizės reakciją 20 – 30 °C temperatūroje imobilizuotų GLA aktyvumas buvo didžiausias. Veikiant hidrolizės reakciją UV spinduliuote GLA aktyvumas padidėjo. Manoma, nes UV spinduliuotė keičia kopolimero trans konfigūraciją į cis, rezultate nešiklis išbrinksta ir susidaro didelis paviršiaus plotas vyksti hidrolizės reakcijai. Imobilizuotos GLA pasižymėjo stabilumu rūgštinėje pH terpėje [54].

Naujausiais duomenimis gliukoamilazės kovalentiniais ryšiais prijungiamos prie nanostruktūrų: nanokompozitų, nanodalelių, magnetinių dalelių. Nanostruktūros naudojamos kaip nešikliai fermentų imobilizacijai dėl pastarųjų specifinių savybių, kurios pranoksta organinių ar neorganinių nešiklių savybes. Nano-nešikliai pasižymi dideliu paviršiaus plotu, substrato trumpu difuzijos keliu, yra nepavojingi sveikatai bei dėl savo inertiškumo nesudaro tiesioginių kovalentinių ryšių su fermentu, tam naudojami įvairūs surišėjai. Dabar ypač tyrinėjami sidabro-gležies oksidų, grafito, grafeno ir kt. nanonešikliai [55,56,57,58]. GLA prijungiamos kovalentiniu būdu prie nanonešiklių, kurie aktyvuojami glutaraldehidu, ksilano dariniais, polietilenglikoliu, chitozanu ir kt. surišėjais [64,55,65]. Ant nanostruktūrų imobilizuotos GLA pasižymi terminiu ir pH stabilumu, didesniu specifiniu aktyvumu t.y. grynumu, didesniu gyminingumu substratui (mažesniu K_m nei laisvo fermento). Didžiausias pranašumas imobilizuojant GLA ant nanostruktūrų yra daugkartinis panaudojimas su minimaliu 5 % pradinio fermento aktyvumo pradimu.

Indonezijos mokslininkų grupė tyrė silicio tipo mezoporingos medžiagos kaip imobilizatoriaus savybes. Nustatyta, kad temperatūra, pH ir maišymo greitis turi didelės įtakos imobilizacijos efektyvumui, todėl ir mezofilinės silicio tipo medžiagos savybėms, tačiau sėkmingai nustačius optimalius adsorbcijos parametrus, hidrolizės procesui temperatūra bei maišymo greitis įtakos nebeturėjo [59].

Ispanijos mokslininkų grupė tyrė gliukoamilazių jonų adsorbcijos imobilizacijos metodą ant mikrokapsulių SepaBeads, aktyvuotomis polietileniminu (PEI). Nustatyta, jog PEI jungiasi prie gliukoamilazių funkcinių grupių ir sudaro fermento-PEI darinius, kurie jungiasi stipriomis adsorbcijos jėgomis prie mikrokapsulių. Gauti rezultatai nesiekia stulbinančių imobilizacijos ar fermento aktyvumo verčių, tačiau pasiektas aukštas fermento stabilumas naudojant PEI – tai pakartotinai leidžiančia naudoti imobilizuotą darinį daugelį ciklų, o po inaktyvavimo lengvai atskirti fermentą nuo kietojo nešiklio [60].

Šiuo metu labiausiai žinomi trys tradiciniai ir daugiausiai aprašyti mokslininkų gliukoamilazių imobilizacijos metodai – kovalentinė, adsorbcija, įkapsuliavimas gelinėse struktūrose panaudojant įvairias matricas paminėtas anksčiau. Fermentai prie netirpios matricos sujungiami cheminėmis jungtimis ir sukuriama labai stabilūs fermento-nešiklio dariniai. Tačiau tradiciniais metodais imobilizuoti fermentai praranda dalį katalizinio aktyvumo dėl galimo fermento išplovimo iš nešiklio ar nuo jo priešais hidrolizės metu. Fermentas išplaunamas nuo nešiklio ar iš nešiklio struktūros dėl galimai silpnų fermento-nešiklio ryšių ar pačio nešiklio per didelio poringumo. Taigi, dabar ypač tyrinėjamas netradicinis skersiniais ryšiais susiūtų fermentų agregatų (SRA) imobilizacijos metodas. Pirmiausia sudarant SRA fermentai yra „apdorojami“ t. y. išsodinami neorganinėmis druskomis ar organiniais tirpikliais iš fermentinio tirpalo taip išgryninat ir kartu agreguojant tiriamąjį fermentą. Fermentų agregatai yra susiuvami bifunkciniais reagentais, todėl pasižymi mechaniniu stabilumu. Dėl didelio fermentų agregatų stabilumo fermento išplovimo galimybė yra labai maža.

Kinijos mokslininkai sudarė GLA agregatus panaudodami standartinį imobilizacijos surišėją – glutaro aldehidą bei papildomus apsauginius reagentus – ksantano gumą ir dekstriną. Straipsnyje teigiama, jog fermentų agregavimas trukdo fermentui visiškai atverti aktyvius centrus (dėl kintančios pastarojo konformacijos) ir jungtis su substrato molekulėmis, rezultate – fermentinis aktyvumas krinta. Šiuo atveju dekstrinas veikia kaip papildomas substratas, kuris veiksmingai apsaugo aktyvius GLA centrus ir gali išlaikyti fermentą katalitiškai aktyvioje formoje, o ksantano guma hidrolizės terpėje sudaro poringą struktūrą, kuri dar padidina GLA skersinių ryšių skaičių ir agregatų stabilumą [61].

Indų mokslininkų grupė savo straipsnyje iliustruoja magnetinių makromolekulinių gliukoamilazių SRA paruošimą naudojant dialdehidinį pektiną, vietoje tradicinio glutaraldehido. Teigiama, jog glutaroaldehidas nėra tinkamiausias agregatų surišėjas, nes: suriša fermentų agregatus per lizino (Lys) amino rūgšties liekaną, kuri dažnai įeina į fermento aktyvųjį centrą; būdama maža molekule (100 Da) gali įsiskverbti į fermento vidinę struktūrą, susijungti su kitomis aktyviojo centro amino grupėmis; yra toksinis. Šios priežastys gali mažinti fermento katalitinį aktyvumą. Taigi, šio tyrimo metu naudotas alternatyvus surišėjas – pektinas. Skanuojamosios elektroninės mikroskopijos (SEM) nuotraukos iliustravo glutaroaldehido suformuotą neporingą, lygaus paviršiaus magnetinių makromolekulinių dalelių ir GLA agregatų darinius, kurie pasižymėjo 85,3 % fermentiniu aktyvumu, kai tuo tarpu pektinas suformavo poringą, nelygią magnetinių makromolekulinių dalelių

ir GLA agregatų darinius, kurie pasižymėjo 95,4 % fermentiniu aktyvumu. Straipsnyje nustatytas agregatų terminis, pH terpės, kinetinis stabilumas [26].

SRA imobilizacijos metodas gana naujas, tačiau šiuo metu jau galima rasti ne tik tradicinį glutaraldehido, kaip agregatus surišančio reagento, bet ir kitus pavyzdžius. Moksliniuose straipsniuose aprašytos glutaraldehido alternatyvos: glioksalis ir trifluoretilo alkoholis [62], cinko acetatas ir 2-metilimidazolas [63], pektinas [26].

1.5. Imobilizuotų gliukoamilazių panaudojimas

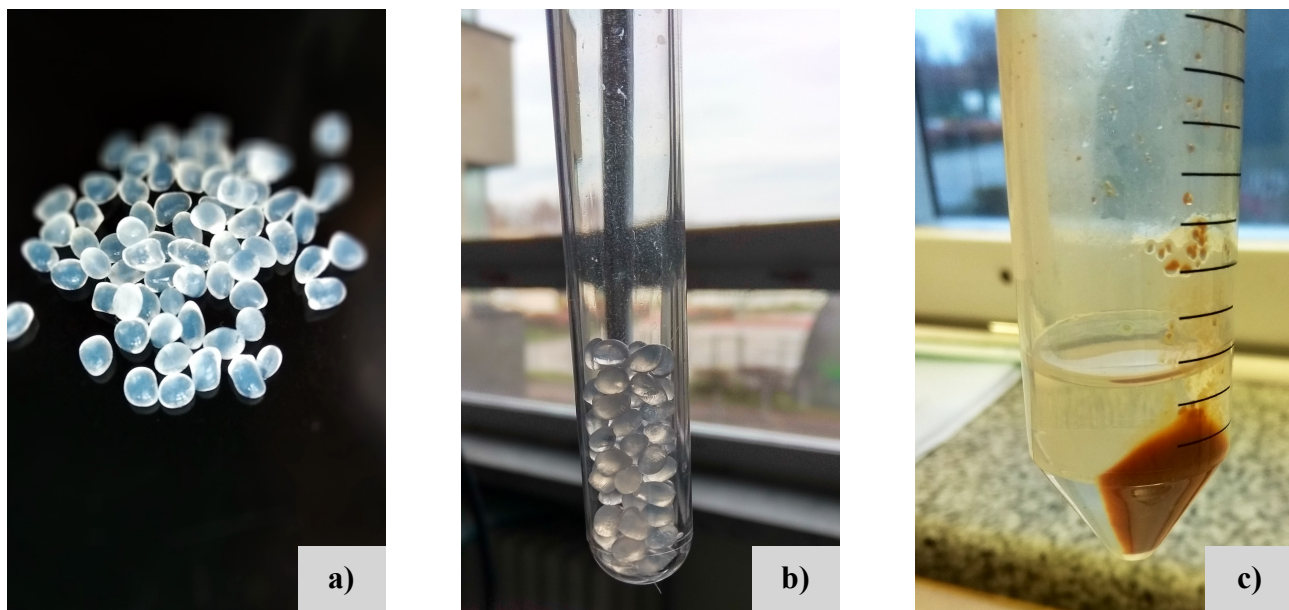
Kad pramoninis gliukoamilazių panaudojimas būtų ekonomiškai dažnai fermentas yra imobilizuojamas. Imobilizuotos gliukoamilazės yra stabilesnės kritinėse sąlygose bei jų panaudojimas yra daugkartinis.

Imobilizuotos gliukoamilazės yra naudojamos invertinio sirupo gamyboje. Imobilizuotos gliukoamilazės didelės fruktozės koncentracijos sirupo gamyboje padidina fruktozės kiekį mišinyje, maltozės sirupo gamyboje - maltozės kiekį ir t.t. Nors invertinio sirupo koncentravimui naudojamas chromatografijos metodas, tačiau tikslinės gliukoamilazės šį procesą supaprastina. Pagrindiniai pranašumai, kuriuos suteikia cukrinimo procesui imobilizuotos gliukoamilazės yra nedidelis reaktoriaus tūris, geresnis karbohidratų kontroliavimas nuolatinio veikimo sraute. Cukrinimo procese valdant imobilizuotų gliukoamilazių aktyvumą (keičiant temperatūrą, terpės pH, srauto greitį, substrato koncentraciją ir kt.) galima lengvai sustadyti procesą tam tikrame gliukozės koncentracijos taške, taip pat imobilizuotas gliukoamilazes lengva atskirti iš reakcijos mišinio ir taip produktas neužsiteršia fermento likučiais.

Tarptautinė Danijos farmacijos bendrovė *Novo Nordisk* atsižvelgiant į rinkos norus pakeisti cukraus sirupo gamyboje naudojamas tirpias gliukoamilazes sukūrė imobilizuotų gliukoamilazių produktą *Dextrozyme*[®]. Tačiau dėl žemos dekstrozės ekvivalento vertės imobilizuotos gliukoamilazės negali vienos dalyvauti invertinio sirupo gamyboje, todėl cukrinimo procesuose panaudojamos kartu su kitais fermentais [101].

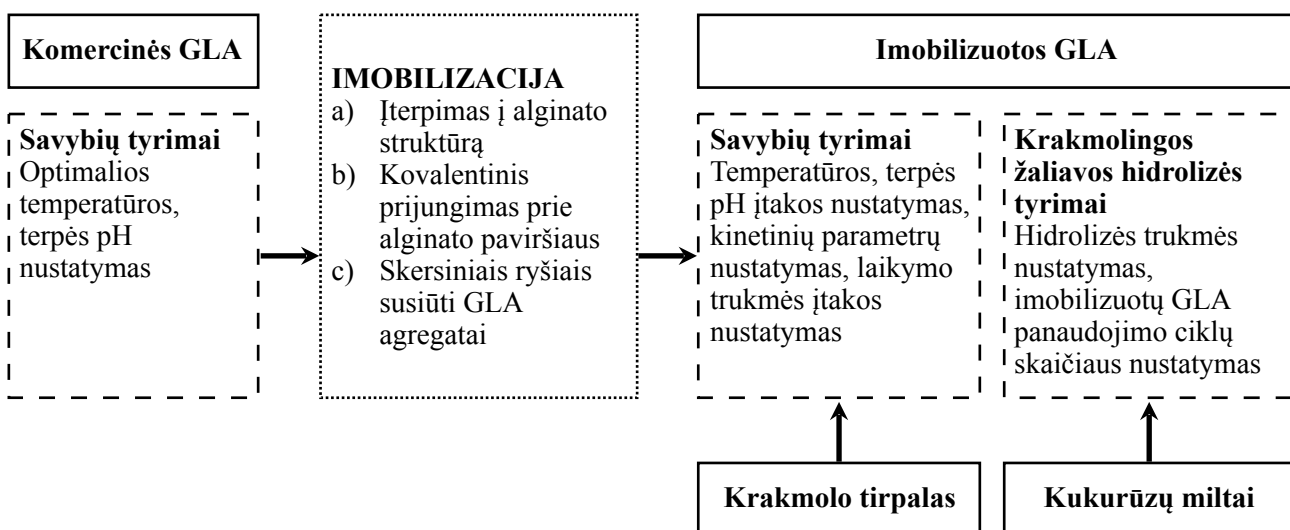
2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Tyrimo objektas – komercinės gliukoamilazės (GLA), imobilizuotos kovalentiniu būdu, įterpimu į polimero struktūras bei agregatus, gautus susiuvant skersiniais ryšiais (2.1 pav.).



2.1 pav. Skirtingais būdais imobilizuoti GLA fermentai: (a) GLA įterptos alginato alginato struktūroje (kapsulėse), (b) kovalentiškai, naudojant glutaro aldehidą, imobilizuotos GLA bei (c) GLA agregatai susiūti skersiniais ryšiais

Tyrimų schema sudaro komercinių gliukoamilazių (GLA) savybių tyrimai, imobilizacija, gliukoamilazių savybių tyrimai po imobilizacijos bei krakmolingos žaliavos hidrolizės galimybės imobilizuotomis gliukoamilazėmis.



2.1. Tyrimams naudotos medžiagos ir įranga

Komercinių gliukoamilazių (GLA) mišinys gautas iš UAB Baltijos enzimai. Komercinės gliukoamilazės išgautos fermentuojant ne genetiškai modifikuotą *Aspergillus niger* rūšį. Tai ekzoglikozidazė hidrolizuojanti tiek alfa-D-(1,6) gliukozidines jungtis šakotoje krakmolo

grandinėje, tiek alfa-D-(1,4) gliukozidines jungtis linijinėje krakmolo grandinėje. Tyrimų metu naudotos medžiagos ir įranga pateikta 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Tyrimų metu eksperimentui atlikti naudotos medžiagos ir įranga

Medžiagos pavadinimas	Cheminė formulė	Gamintojas / pardavėjas
Amonio sulfatas	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	UAB Eurochemicals, Vilnius
Druskos rūgštis (37 %)	HCl	Barta a Cihlar, Čekija
Citrinos rūgštis bevandenė an.gr.	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	UAB Eurochemicals, Vilnius
Glutaro aldehidas (25 %)	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$	UAB Eurochemicals, Vilnius
Jodas	I_2	Sigma-Aldrich, Vokietija
Kalio jodidas	KI	Sigma-Aldrich, Vokietija
3,5-dinitrosalicilo rūgštis	$\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$	Sigma-Aldrich, Vokietija
Natrio-kalio tartratas	$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, Vokietija
Natrio šarmas	NaOH	UAB Eurochemicals, Vilnius
Kukurūzų krakmolas (grynas)	$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$	Carl Roth, Vokietija
Kalio dihidrofosfatas	KH_2PO_4	Sigma-Aldrich, Vokietija
Kalio hidrofosfatas	K_2HPO_4	Sigma-Aldrich, Vokietija
Natrio alginatas	$(\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6)_n$	Sigma-Aldrich, Vokietija
Kukurūzų miltai		Melvit S.A., Lenkija
Kalcio chloridas dvivandenis an.gr.	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	UAB Eurochemicals, Vilnius
Įranga		
Centrifuga „MPW 260 RH“, „VWR MiniStar“, „Ortoalsera“, pH-metras „Sartorius PB-11“; Magnetinė maišyklė su kaitinimu „MSH-300“; Purtyklė „IKA KS 130 basic“; Spektrofotometras „Termo Scientific GENESYS 10 UV“; Analitinės svarstyklės „KERN G6“; Vandens vonia „Mettler WNB 22“;		

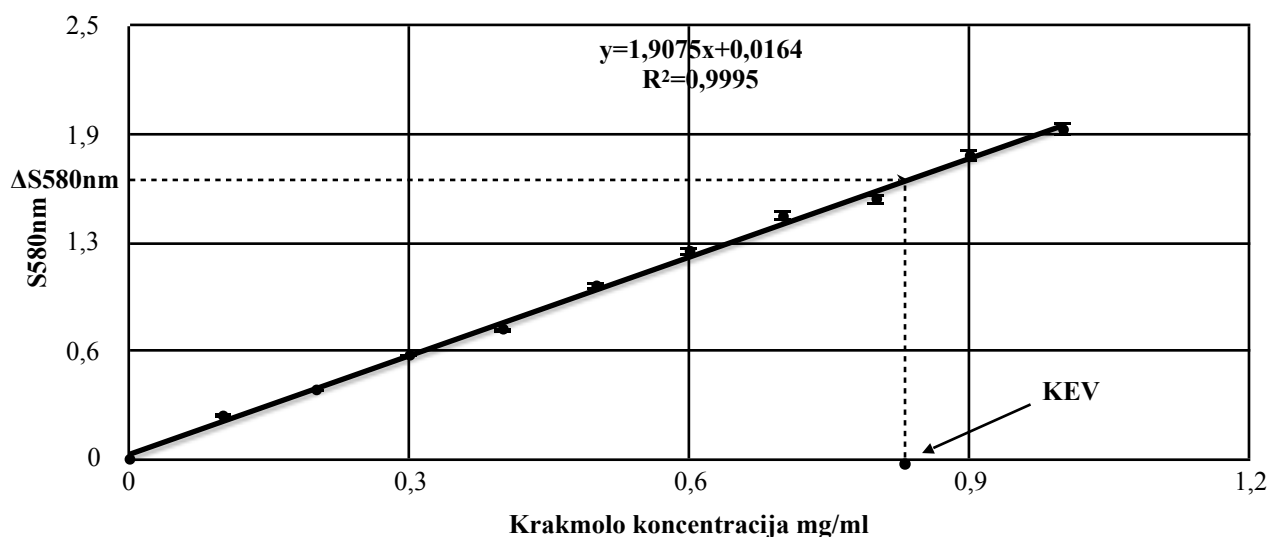
2.2. Gliukoamilazių aktyvumo nustatymas pagal krakmolą

GLA aktyvumas nustatytas naudojant tirpų krakmolą kaip substratą. Amilazės katalizuoja krakmolo hidrolizę iki dekstrinų, maltozės, gliukopiranozės. Fermento aktyvumas nustatomas įvertinant susidariusių amilozės ir jodo įtarpos kompleksų spalvos intensyvumą. Jodo tirpalas nudažo krakmolo turintį mišinį tamsiai mėlyna spalva, o vykstant jo fermentiniai dekstrinizacijai tirpalas šviesėja. Pagal susidariusios spalvos intensyvumą, spektrofotometru matuojama šviesos sugertis tiriamuoju tirpalu, tokiu būdu įvertinamas krakmolo fermentinės dekstrinizacijos lygis. Gauta šviesos sugertis tiriamuoju tirpalu lyginama su žinomos koncentracijos krakmolo tirpalo šviesos sugertimi. Pasinaudojant kalibracine krakmolo tiese, skaičiuojamas GLA aktyvumas, kuris išreiškiamas aktyvumo vienetais. Fermento aktyvumo vienetas parodo fermento kiekį, kuris gali katalizuoti 1 mg tirpaus krakmolo hidrolizę iki dekstrinų per 1 min esant 60 °C, pH 4,5.

Tirpalai tyrimui paruošti pagal žemiau pateiktą aprašymą:

- 1,0 mg/ml krakmolo tirpalo paruošimui naudota $0,1 \pm 0,001$ g krakmolo, kuris ištirpintas 50 ml vandenyje ir šildytas karštoje vandens vonioje ($70 - 80$ °C). Krakmolo tirpalas praskiestas vandeniu iki 100 ml.
- Fosfatinio buferio paruošimui atsvertas 1,0608 g KH_2PO_4 ir 2,1228 g K_2HPO_4 ir ištirpinta 200 ml distiliuotame vandenyje. Sureguliuotas tirpalo pH iki 4,5 su 0,1 M HCl.
- Jodo tirpalo paruošimui tirpinta 0,1269 g jodo ir 0,166 g KI 200 ml vandens.

Sudaryta kalibracinė tiesė. Paruošti įvairių koncentracijų krakmolo tirpalai ($0 - 1$ mg/ml), skiedžiant 1,0 mg/ml krakmolo tirpalą fosfatinio buferiu. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama 0,5 ml 1 M HCl, 2,5 ml jodo tirpalo ir 5 ml distiliuoto vandens. Spektrofotometru matuojama 580 nm monochromatinio spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Sudaroma kalibracinė krakmolo tiesė (2.2 pav.). Šviesos sugerties priklausomybė nuo krakmolo koncentracijos yra tiesinė, determinacijos koeficientas (R^2) gautas 0,9995. Determinacijos koeficiento reikšmė yra 0,9995, todėl kalibracinė tiesė yra tinkama naudoti amilazių aktyvumo tyrime.



2.2 pav. Kalibracinė krakmolo tiesė

GLA aktyvumas nustatomas vykdant krakmolo hidrolizę. Į tiriamąjį mėgintuvėlį įpilta 0,25 ml GLA tirpalo, 0,25 ml 1,0 mg/ml krakmolo tirpalo ir 1,5 ml fosfatinio buferio. Tiriamasis mišinys laikomas optimalioje 60 °C temperatūroje 30 min. Taip pat buvo paruoštas kontrolinis mėginys sudarytas tik iš 0,25 ml krakmolo ir 1,75 ml fosfatinio buferio tirpalų bei “tuščias” mėginys sudarytas iš 2 ml fosfatinio buferio tirpalo. Fermentinė reakcija sustabdoma į mėgintuvėlius įpilant 0,5 ml HCl ir gerai sumaišoma. Tada įpilama 2,5 ml jodo tirpalo ir 5 ml distiliuoto vandens. Kontrolinis tirpalas nusidažo mėlyna spalva, tiriamieji – šviesesne, o tuščias mėginys laikomas bazine spalva, naudojama spektrofotometro nulinimui prie 580 nm. Spektrofotometru matuojama 580 nm monochromatinio spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais.

Fermento aktyvumui apskaičiuoti pirmiausia nustatyta tiriamojo fermento suhidrolizuota krakmolo dalis mėginyje ΔS_{580} (2.1 formulė). Tada išskaičiuota tiriamųjų tirpalų krakmolo ekvivalento vertė (KEV) iš kalibracinės krakmolo tiesės lygties (2.2 formulė). Fermento aktyvumas apskaičiuojamas įstatant turimas vertes į 2.3 formulę.

$$\Delta S_{580} = S_{\text{kontrolė}} - S_{\text{tiriamasis}} = y \quad (2.1)$$

$$\text{KEV} = x = (y - 0,0164) / 1,9075 \quad (2.2)$$

$$\text{AV/ml} = \text{KEV} \times V_{r\text{-jos}} \times \text{PF} / V_f \times 30 \times V_{\text{km}} \quad (2.3)$$

Čia $V_{r\text{-jos}}$ – bendras reakcijos tūris, ml; PF – fermento praskiedimo faktorius, V_f – fermento tūris reakcijoje, ml; 30 – fermentinės r-jos trukmė, min; V_{km} – tirpalo tūris naudotas kolorimetriniams matavimams, ml.

2.2.1. Gliukoamilazių aktyvumo priklausomybės nuo aplinkos temperatūros nustatymas

Temperatūros įtaka GLA aktyvumui nustatyta atlikus eksperimentą prie skirtingų temperatūrų: 20°C, 35°C, 60°C, 80°C, 100°C, bei esant pH vertei 4,5. GLA aktyvumo tyrimas buvo atliktas besinaudojant tyrimų metodika pateikta 2.2 skyrelyje.

2.2.2. Gliukoamilazių aktyvumo priklausomybės nuo terpės pH nustatymas

Pirmiausia paruošiami skirtingo pH buferiniai tirpalai tam panaudojant 0,2 M Na_2HPO_4 ir 0,1 M citrinų rūgštis tirpalus, kurie sumaišomi 2.2 lentelėje nurodytomis proporcijomis. Paruoštų buferinių tirpalų pH vertės buvo sureguliuotos su rūgštimi arba šarmu naudojant pH-metrą. GLA aktyvumo matavimo darbo eiga aprašyta 2.2 skyrelyje. Vertinant gliukoamilazių aktyvumo priklausomybę nuo terpės pH vertės vietoje fosfatinio buferio buvo naudoti paruošti skirtingų pH verčių buferiniai tirpalai.

2.2 lentelė. Skirtingų pH verčių buferinių tirpalų proporcijos

0,2 M Na_2HPO_4 , ml	0,1 M citrinų rūgštis, ml	pH vertė
0,0	10,0	3,0
3,855	6,145	4,0
3,855	6,145	4,5
5,150	4,850	5,0
5,733	4,267	5,5
6,315	3,685	6,0
8,235	1,765	7,0
9,725	0,275	8,0
10,0	0,0	10,0

2.3. Gliukoamilazių imobilizacija

2.3.1. Gliukoamilazių įkapsuliavimas kalcio alginatė

Fermento įkapsuliavimui kalcio alginatė pirmiausia paruošiami reikalingi tirpalai:

- natrio alginato skirtingų koncentracijų – 2, 3, 4 ir 5 % tirpalai;
- 0,25 M kalcio chlorido tirpalas.

Natrio alginato tirpale/gelyje įmaišomas fermento tirpalas santykiu 1:1. Mišinys supilamas į švirkštą, užmaunama adata ir turinys iš lėto lašinamas į kalcio chlorido tirpalą, kuris ant magnetinės maišyklės lėtai maišomas. Baigus lašinti paliekama 30 min, kad sutvirtėtų kapsulės. Kalcio

alginate/fermento kapsulės buvo plautos distiliuotu vandeniu tris kartus bei filtruotos per filtrinį popierių. Filtrato tūris, sudarytas iš CaCl₂ tirpalo ir distiliuotas vandens, naudoto kapsulių plovimui buvo tiksliai išmatuotas. Įterpimo į polimero struktūras metodas buvo atliktas pagal literatūroje pateiktas rekomendacijas [66]. GLA aktyvumas buvo nustatytas tiek imobilizavimui naudotame pradiname fermento tirpale, tiek ir filtrate pagal 2.2 skyrelyje aprašytą metodiką.

Imobilizavimo efektyvumo koeficientas fermentui gliukoamilazei buvo apskaičiuotas pagal 2.4 formulę:

$$I (\%) = \left(1 - \frac{Y}{X}\right) \cdot 100 \%; \quad (2.4)$$

čia I – imobilizavimo efektyvumo koeficientas, %; X – GLA aktyvumas imobilizavimui naudotame fermento tirpale (pradiname tirpale), AV; Y – GLA aktyvumas filtrate, AV.

Imobilizuoto fermento GLA kapsulėse aktyvumas nustatomas vykdant krakmolo hidrolizę. Į tiriamąjį mėgintuvėlį atsveriami 0,5±0,01 g GLA kapsulių ir įpilama 0,5 ml 1,0 mg/ml krakmolo tirpalo ir 3 ml fosfatinio buferio. Taip pat buvo paruošti kontrolinis mėginys sudarytas tik iš 0,25 ml krakmolo ir 1,75 ml fosfatinio buferio tirpalų bei “tuščias” mėginys sudarytas iš 2 ml fosfatinio buferio tirpalo. Visi mėginiai laikyti optimalioje 60 °C temperatūroje 30 min. Po kaitinimo, iš kiekvieno tiriamojo mėginio, paimtas 1 ml reakcijos mišinio. Fermentinė reakcija sustabdyta į visus mėgintuvėlius įpilus 0,5 ml HCl, gerai sumaišyta. Tada įpilta 2,5 ml jodo tirpalo ir 5 ml distiliuoto vandens. Kontrolinis tirpalas nusidažė mėlyna spalva, tiriamieji – šviesesne. Spektrofotometru matuota 580 nm monochromatinio spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Iš kalibracinės tiesės lygties apskaičiuota KEV vertė ir apskaičiuotas įterptų GLA aktyvumas. Įterptų kalcio alginate GLA aktyvumas viename grame kapsulių buvo apskaičiuotas pagal 2.5 formulę:

$$AV/g = a/b \quad (2.5)$$

čia a – GLA fermentų aktyvumas (AV/ml) viename mililitre reakcijos mišinio; b – tyrime naudota fermento/kapsulių masė (g/ml) fermentinės reakcijos mišinyje.

2.3.2. Gliukoamilazių imobilizavimas kovalentiniu būdu

Alginato kapsulėms gauti buvo ruoštas natrio alginato gelis (4 %), kuris buvo sulašintas į 0,25 M CaCl₂·2H₂O tirpalą naudojant švirkštą. Sulašinus gautos kapsulės paliktos CaCl₂ tirpale 30 min sutvirtėti. Po to, kapsulės praplautos distiliuotu vandeniu ir nufiltruotos per filtro popierių. Fermento kapsulės aktyvuotos glutaro aldehido tirpale (naudojant skirtingas koncentracijas: 0%, 10%, 15%, 25%). 25 % pradinis glutaro aldehido tirpalas buvo naudotas skirtingos koncentracijos tirpalams paruošti, kuris buvo skiestas fosfatinio buferiu reikiamai koncentracijai gauti. Alginato kapsulės išlaikytos glutaro aldehido tirpaluose 1,5 val. Po išlaikymo glutaro aldehido tirpale kapsulės praplautos distiliuotu vandeniu ir nufiltruota. GLA kovalentiškai prijungtos aktyvintos kapsulės laikant GLA tirpale skirtingą laiką – 0,5, 1,5, 2,5 val. ir lėtai maišant ant magnetinės

maišyklės. Po to, kapsulės buvo plautos tris kartus distiliuotu vandeniu ir nufiltruota per filtro popierių. Filtrato tūris tiksliai išmatuotas. Išmatuotas GLA aktyvumas filtrate. Pradinio GLA fermento tirpalo, taip pat filtrate likusių GLA fermentinis aktyvumas įvertintas pagal 2.2 skyrelyje aprašytą metodiką. Kovalentiškai imobilizuotos GLA aktyvumas kapsulėse nustatytas pagal 2.5 formulę.

Efektyvumo koeficientas kovalentiniam imobilizavimui apskaičiuotas pagal žemiau pateiktą 2.6 formulę:

$$I (\%) = 100 - \left(\frac{Y}{X} \cdot 100 \right) \quad (2.6)$$

čia I – efektyvumo koeficientas kovalentiniam imobilizavimui, %; X – GLA aktyvumas pradiniam fermento tirpale, AV; Y – GLA aktyvumas filtrate po imobilizavimo, AV.

2.3.3. Skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių agregatų sudarymas

Susiuvimas skersiniais ryšiais atliktas pagal mokslininkų rekomendacijas [67,68,69]. 80% amonio sulfato tirpalas naudotas baltymų išsodinimui. Toks išsodinimo reagentas ir jo koncentracija pasirinkta atsižvelgiant į mokslininkų straipsniuose esančias rekomendacijas [68,70]. Į amonio sulfato tirpalą įpiltas GLA tirpalas santykiu 5:1, mišinys maišytas ledo vonioje 30 min. Fermentų susiuvimui glutaro aldehidas buvo naudotas, kurio įtaka imobilizacijai nustatyta naudojant skirtingas jo koncentracijas – 0,5%, 0,8%, 1%, 1,5%, 2,5%. Mišinys kambario temperatūroje buvo išlaikytas 24 valandas, intensyviai maišant, tokiu būdu leidžiant susidaryti netirpiems agregatams. Po to mišinys centrifuguotas (10 min, 4 °C, 8000 aps./min). Gauti agregatai nufiltruoti, praplauti fosfatinio buferiu tris kartus (pH 4,5), nustatytas skersiniais ryšiais susiūtų GLA agregatuose aktyvumas pagal 2.5 formulę (AV/g) ir 2.2 skyrelio metodiką.

2.3.4. Temperatūros ir terpės pH įtaka imobilizuotoms gliukoamilazėms

Trimis būdais imobilizuotoms GLA buvo nustatyta temperatūros bei terpės pH įtaka jų aktyvumui. Tam 0,5 g įkapsuliuotos, kovalentiškai imobilizuotos ir skersiniais ryšiais susiūtos GLA buvo patalpintos į mėgintuvėlius, įpilta 0,5 ml 1 mg/ml krakmolo tirpalo bei 3 ml fosfatinio buferio. Fermentinė krakmolo hidrolizė vykdyta 23 – 100 °C temperatūros intervale ir nustatytas imobilizuotų GLA aktyvumas pagal 2.2 skyrelyje aprašytą metodiką, imobilizuoto fermento aktyvumas įvertintas remiantis 2.5 formule. Aktyvumo vienetas atitinka fermento kiekį, kuris katalizuoja 1 μmol substrato virtimą į produktą per vieną minutę, esant optimalioms sąlygoms (60 °C, pH 4,5, hidrolizės trukmė 30 min).

Terpės pH įtaka imobilizuotoms GLA nustatyta panaudojant 2.2 lentelėje pateiktus skirtingų pH buferinius tirpalus. Nustatytas imobilizuotų GLA aktyvumas pagal 2.2 skyrelyje aprašytą metodiką, imobilizuotų GLA aktyvumas įvertintas remiantis 2.5 formule.

2.3.5. Imobilizuotų gliukoamilazių kinetinių parametrų nustatymas

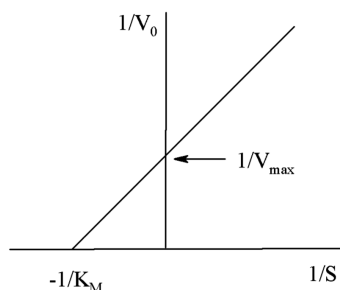
Gyvuose organizmuose cheminės reakcijos vyksta labai greitai, nes jas katalizuoja fermentai. Fermentinės reakcijos greitį apibūdina pagrindiniai trys kinetiniai parametrai – r-jos pradinis greitis V_0 , Michaelio konstanta K_M ir maksimalus r-jos greitis V_{max} . Pradinio reakcijos greičio fazę apibūdina pastovus greitis, t. y. vienodai didėjantis reakcijos produkto kiekis.

Kadangi šio tyrimo metu svarbu įvertinti reakcijos produkto kiekio didėjimą hidrolizės metu pasirinktas kitas fermento aktyvumo nustatymo metodas. Matavimas pagrįstas krakmolo hidrolizės metu susidarantių redukuojančių sacharidų nustatymu. Metodika pateikta 2.4.1 skyrelyje.

Kad nustatyti pradinį reakcijos greitį buvo vertinamas produkto kiekis t. y. GEV hidrolizės metu po 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60 min. Nubraižytas GEV priklausomybės grafikas nuo hidrolizės trukmės ir išvedama liestinė, einanti per koordinatinių pradžios tašką. Pradinis reakcijos greitis nustatomas iš tiesės posvyrio kampo tangento (2.7 formulė). Reakcijos greitis išreiškiamas produkto koncentracijos pokyčiu per minutę.

$$V_0 = d[P]/dt = \operatorname{tg}\alpha \quad (2.7)$$

Kitame etape buvo analizuojami du pagrindiniai katalizės kinetiniai parametrai – Michaelio konstanta K_M , ir maksimalus reakcijos greitis V_{max} laisvųjų ir imobilizuotų fermentų. Įvairių reakcijų K_M yra skirtinga ir parodo fermento giminingumą substratams. Jos skaitinė reikšmė yra lygi substrato koncentracijai, kuriai esant reakcijos greitis yra lygus pusei didžiausio (maksimalaus) greičio. Jei K_M reikšmė maža, giminingumas didelis, ir atvirkščiai. Kadangi neįmanoma tiksliai nustatyti V_{max} , o vis dėlto norint iš bandymo duomenų nustatyti K_M , ir V_{max} reikšmes, dažniausiai naudojamos dvigubos atvirkštinės Lainuivero ir Berko (*angl.* Lineweaver-Burk) koordinatės – $1/V_0$ priklausomybė nuo $1/[S]$. Pažymėjus bandymo metu gautus taškus, per juos nubrėžiama tiesė, kertanti koordinatinių ašis. Abscisių ašyje tiesė susikerta taške, atitinkančiame $-1/K_M$, o ordinačių ašyje – taške $1/V_{max}$ (2.3 pav.).



2.3 pav. Reakcijos greičio priklausomybė nuo substrato koncentracijos Lainuivero ir Berko koordinatėse [51]

2.3.6. Imobilizuotų gliukoamilazių stabilumo nustatymas

GLA stabilumas buvo vertinamas laikant 20 g imobilizuotų fermentų kapsulių 20 ml fosfatiname buferyje (pH 4,5), ~ 4 °C temperatūroje, 30 dienų. Imti kapsulių/agregatų mėginiai po 6, 14 ir 30

dienų laikymo buferyje ir išmatuotas imobilizuotų GLA aktyvumas, naudojantis 2.2 skyrelyje pateikta metodika. GLA aktyvumo grame kapsulių arba agregatų apskaičiavimui naudota (2.5) formulė.

2.4. Imobilizuotų gliukoamilazių panaudojimo galimybės krakmolingos žaliavos hidrolizei

Šio tyrimo metu buvo siekta nustatyti per kiek laiko įvykdoma pilna krakmolingos žaliavos hidrolizė, naudojant skirtingais būdais imobilizuotas GLA (įkapsuliuotas, kovalentiniu būdu imobilizuotas bei skersiniais ryšiais susius GLA agregatus). Pirmiausia buvo paruoštas krakmolingos žaliavos tirpalas (2.4.2. skr.), atsvertos ir patalpintos imobilizuotos GLA ir vykdyta hidrolizės reakciją 60 °C iki 60 min. Kas 10 min matuotas redukuojančių sacharidų kiekis (μmol/ml) tirpale. Tam imti mėginiai redukuojančių sacharidų nustatymui pagal 2.4.1 skyrelyje aprašytą metodiką. Įvertinus optimalią trukmę, nuo kurios krakmolo hidrolizės metu nebekinta redukuojančių sacharidų kiekis toliau nustatyta kiek ciklų tos pačios imobilizuotos GLA gali vykdyti krakmolingos žaliavos hidrolizę.

2.4.1. Imobilizuotų gliukoamilazių aktyvumo nustatymas pagal redukuojančių sacharidų kiekį

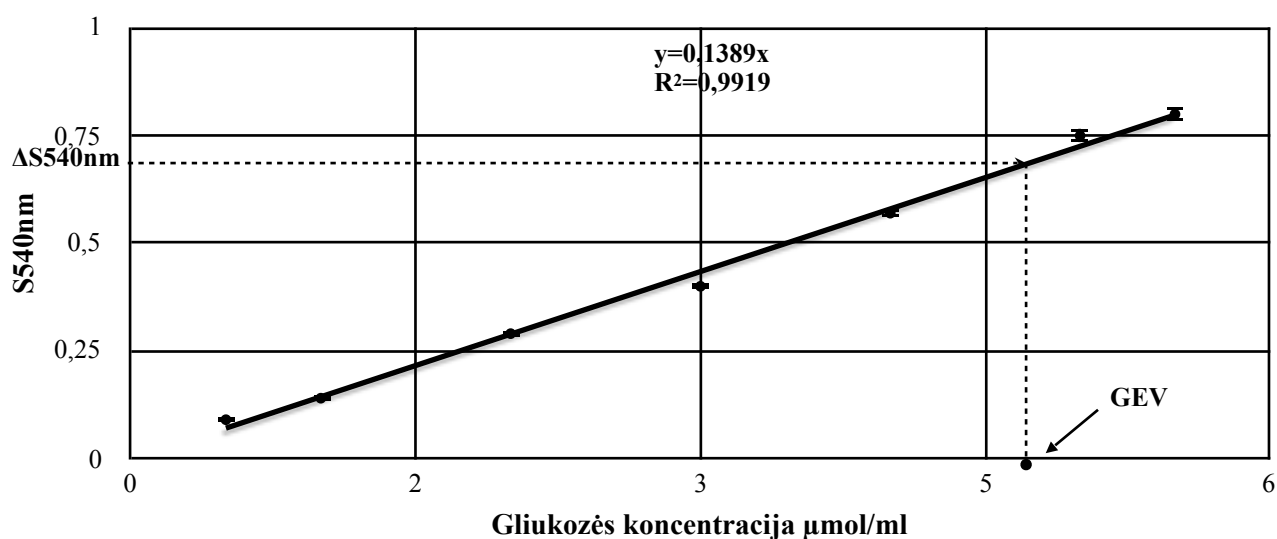
Šis GLA aktyvumo matavimas pagrįstas krakmolo hidrolizės metu išsiskiriančių redukuojančių cukrų aptikimu. Tyrimo metu buvo naudotas 3,5-dinitrosalicilo rūgšties (DNS) reagentas. GLA aktyvumas nustatytas pagal G.L. Miller protokolą [71].

Redukuojančių sacharidų nustatymui naudoti tirpalai:

- DNS reagentas ruošiamas ištirpinant $1 \pm 0,01$ g 3,5-dinitrosalicilo rūgštį ir $30 \pm 0,1$ g natrio-kalio tartratą 100 ml 0,4 M NaOH tirpale;
- 1,0 mg/ml krakmolo tirpalas. Paruošimui naudota $0,1 \pm 0,001$ g krakmolo, kuris ištirpintas 50 ml vandenyje ir šildytas karštoje vandens vonioje (70 – 80 °C). Krakmolo tirpalas praskiestas vandeniu iki 100 ml.
- Fosfatinis buferis. Paruošimui atsvertas 1,0608 g KH_2PO_4 ir 2,1228 g K_2HPO_4 ištirpintas 200 ml distiliuotame vandenyje. Sureguliuotas tirpalo pH iki 4,5 su 0,1M HCl.

GLA aktyvumas nustatomas vykdant krakmolo hidrolizę. Į tiriamąjį mėgintuvėlį atsveriamas 0,5 g imobilizuotų GLA, įpilama 0,5 ml 1 mg/ml krakmolo tirpalo ir 3 ml fosfatinio buferio. Tiriamasis mišinys laikomas optimalioje 60 °C temperatūroje iki 60 min. Fermentinė reakcija sustabdoma į mėgintuvėlius įpilant DNS reagento santykiu su tiriamuoju mišiniu 1:1 ir dedama mišinį kaitinti į verdančią vandens vonią 5 min. Redukuojantys sacharidai su DNS reagentu sudaro spalvotus junginius. Po virinimo mėginiai atvėsunami ir skiedžiami 6 ml dist. vandeniu. Susidariusios spalvos intensyvumas įvertintas matuojama šviesos sugertis prie 540 nm bangos ilgio. Išmatuotos monochromatinio spindulio šviesos sugerties vertės, kurios naudotos gliukozės ekvivalento vertei (GEV) apskaičiuoti iš kalibracinės tiesės lygties (2.9 formulė). Šviesos sugerties nuo gliukozės koncentracijos priklausomybė yra tiesinė (2.4 pav.), determinacijos koeficientas (R^2) lygus 0,9919.

$$GEV=x=y/0,1389 \quad (2.9)$$



2.4 pav. Kalibracinė gliukozės tiesė

GLA aktyvumas mėginiuose apskaičiuotas pagal 2.10 formulę. Vienas GLA fermento aktyvumo vienetas gali išskirti 1 μmol gliukozės iš krakmolo per vieną minutę 60 °C temperatūroje, esant terpės pH vertei 4,5. Imobilizuotų GLA aktyvumas 1 grame kapsulių/agregatų įvertintas pagal 2.5 formulę.

$$AV/ml=GEV \times V_{r-jos} \times PF/V_f \times 30 \times V_{km} \quad (2.10)$$

čia GEV - iš kalibracinės tiesės gauta gliukozės ekvivalento vertė, μmol; V_{r-jos} – bendras reakcijos tūris, ml; PF – fermento praskiedimo faktorius, V_f – fermento tūris reakcijoje, ml; 30 – fermentinės r-jos trukmė, min; V_{km} – tirpalo tūris naudotas kolorimetriniams matavimams, ml.

2.4.2. Krakmolingos žaliavos paruošimo būdas

Krakmolingos žaliavos hidrolizei naudotas kukurūzų miltų tirpalas. Atsverta 5 g kukurūzų miltų ir sumaišyta su 40 ml verdančiu fosfatinio buferiu (kurio pH 4,5), kad prasidėtų krakmolo želatinacija. Moksliniai literatūros šaltiniai rekomenduoja prieš hidrolizę paruošti krakmolingą žaliavą t.y. vykdyti želatinaciją. Teigiama, jog želatinacijos metu krakmolo tarpmolekuliniai ryšiai pradeda skilti, prijungiamos vandens molekulės – taip išbrinkusi krakmolo molekulė yra lengviau prieinama fermentams GLA [72,73]. Atvėsinus tirpalą, jis skiedžiamas su 80 ml fosfatinio buferio.

2.4.3. Krakmolingos žaliavos hidrolizės trukmės vertinimas imobilizuotomis gliukoamilazėmis

Šio tyrimo metu buvo siekta įvertinti optimalią krakmolingos žaliavos hidrolizės trukmę. Pagaminti trys krakmolingos žaliavos mėginiai, kurių paruošimo būdas pateiktas 2.4.2. skyrelyje. Į pirmąjį mėginį patalpinta $2 \pm 0,01$ g įkapsuliuotų GLA kapsulių, į antrą – $2 \pm 0,01$ g kovalentiškai imobilizuotų GLA kapsulių, į trečiąjį – $1 \pm 0,01$ g agregatų ir vykdyta hidrolizės reakcija 60 °C iki 60

min. Kas 10 min imti mėginiai ir nustatyta kiekvieno laiko gliukozės koncentracija ($\mu\text{mol/ml}$) tirpale. Gliukozės nustatymui naudotas redukuojančių sacharidų nustatymo metodas aprašytas 2.4.1 skyrelyje. Optimali krakmolingos žaliavos hidrolizės trukmė nustatyta tada, kai įvyksta pilna krakmolo hidrolizė t. y. GEV kinta $\leq \pm 0,15 \mu\text{mol/ml}$ bei jodo tirpalas nebenedažo reakcijos tirpalo mėlynai.

2.4.4. Imobilizuotų gliukoamilazių panaudojimo ciklų skaičiaus nustatymas

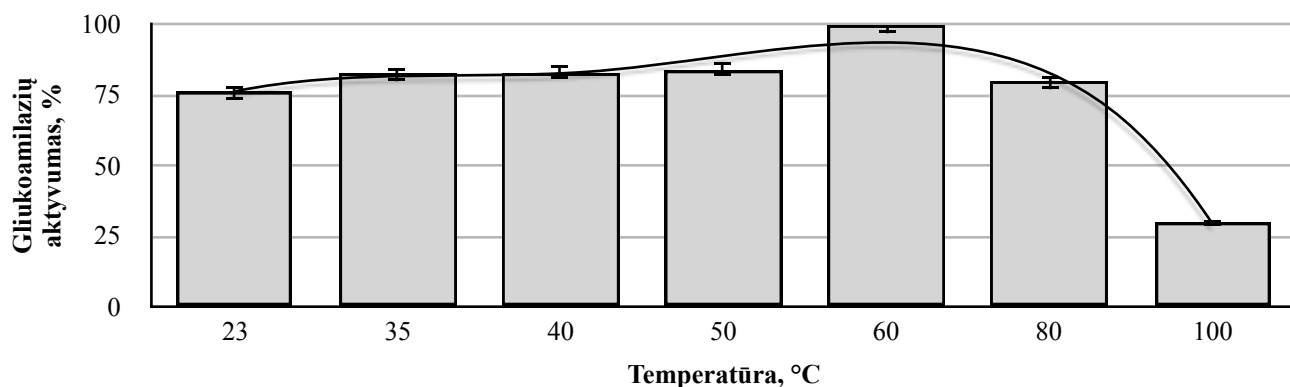
Tyrimui buvo paruošti trys krakmolingos žaliavos tirpalai (2.4.2. skr.), į pirmąjį atsverta ir patalpinta $2 \pm 0,01$ g įkapsuliuotų GLA kapsulių, į antrą – $2 \pm 0,01$ g kovalentiškai imobilizuotų GLA kapsulių, į trečiąjį – $1 \pm 0,01$ g agregatų. Tiriamieji mėginiai pamerkti į 60°C vandens vonią, kurioje mėgintuvėlių turinys buvo pastoviai maišomas. Hidrolizės reakcija vykdyta optimalų kiekvienam imobilizacijos atvejui laiką, kuris nustatytas pagal 2.4.3 skyrelyje aprašytą metodiką: tiriant įterptas GLA kapsules – 20 min, kovalentiškai imobilizuotas GLA kapsules – 40 min ir agregatus – 10 min. Reakcijai pasibaigus, mėginiai buvo išimti iš vandens vonios, o agregatai arba kapsulės buvo pašalintos, perplautos ir pakartotinai sudėtos į naujus mėgintuvėlius kartu su nauja krakmolingos žaliavos porcija. Hidrolizės reakcija vykdyta pakartotinai. Po kiekvieno ciklo matuoti kiekvieno imobilizuotų GLA atvejo aktyvumas AV/g (2.5 formulė) pagal 2.4.1 skyrelio metodiką.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Temperatūros ir terpės pH vertės įtaka komercinių gliukoamilazių aktyvumui

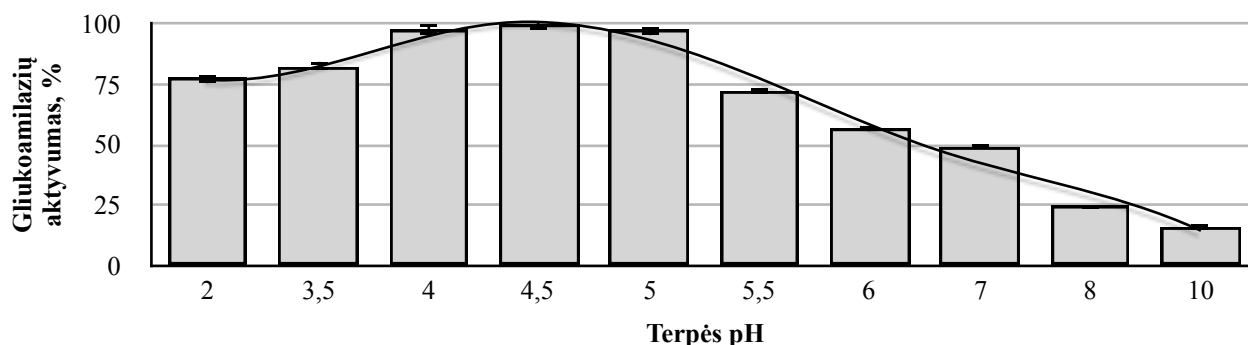
Fermentai tai baltymai, kurių savybes ir veikimą įtakoja temperatūra, reakcijos terpės pH vertės bei substrato koncentracija reakcijos terpėje. Fermentų aktyvumas taip pat labai priklauso nuo fermento išgavimo šaltinio. Tyrimo metu nustatyta komercinių gliukoamilazių (GLA) optimali temperatūra bei pH vertė.

Temperatūra, kurioje GLA aktyvumas didžiausias, nustatyta vykdant fermentinę reakciją 23–100 °C temperatūrų intervale. Didžiausias GLA aktyvumas pasireiškė fermentinę reakciją atliekant 60 °C temperatūroje. Gliukoamilazių aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros pateikta 3.1 paveiksle. Aukštesnė temperatūra, pavyzdžiui, 60 °C neigiamai veikė GLA aktyvumą, kadangi aukštesnė temperatūrose baltymai denatūruoja dėl to praranda katalitines savo savybes. Čekijos mokslininkai šį reiškinį aiškina baltymo konformaciniu pakitimu. Pasitelkiant vibracine, elektronine bei IR spektroskopijas nustatė, kad esant 50 °C temperatūrai gliukoamilazių spiralinė struktūra išlieka nepakitusi, tačiau keliant temperatūrą iki 60 °C išsiskleidžia spiralinė struktūra į β -lakštinę struktūrą, kuri ir paaiškina fermento aktyvumo kitimą prie skirtingų temperatūrų [74].



3.1 pav. Gliukoamilazių aktyvumo priklausomybė nuo terpės temperatūros (pH 4,5)

Terpės pH vertės įtaka nustatyta vykdant fermentinę reakciją pH 2-10 intervale. Terpės pH įtaka GLA aktyvumui 60 °C temperatūroje pateikta 3.2 paveiksle. Didžiausias fermentinis GLA aktyvumas pasiektas terpėje, kurios pH vertė buvo 4,5. Reakcijos terpės pH vertei didėjant ir artėjant prie neutralios (pH 7) ir šarminės (pH 10) vertės, GLA aktyvumas sumažėjo atitinkamai nuo 2 iki 6 kartų.



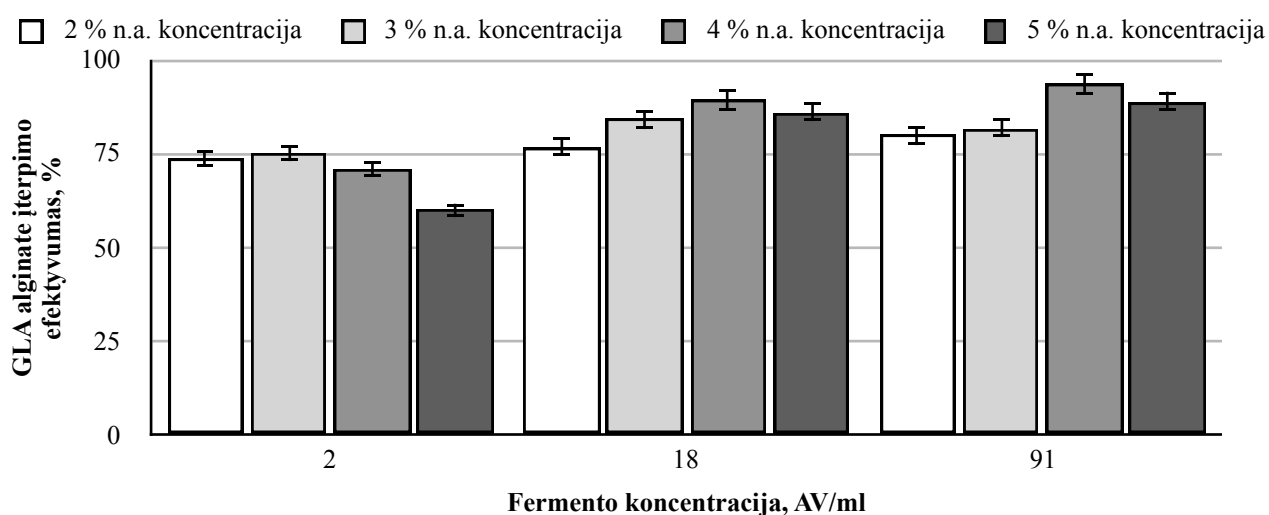
3.2 pav. Gliukoamilazių aktyvumo priklausomybė nuo terpės pH (60 °C)

Mokslininkų darbai tiriant skirtingų amilazių pH savybes parodo, jog būtent nuo amilazių tipo (α -amilazė, β -amilazė, gliukoamilazė) priklauso fermento stabilumas ir aktyvumas atitinkamoje pH. *Worthington* publikacijose apibrėžta, jog optimali α -amilazės pH yra tarp 6.7–7.0, β -amilazės optimali pH yra tarp 4–5, gliukoamilazių optimali pH yra 3 [75,76]. Tokį amilazių pH skirtumą gali nulemti daugelis priežasčių – šaltinis, fermento struktūra ir kt. Amerikos mokslininkai nustatė, kad būtent toks specifiškas amilazių pH turi įtakos galutiniams hidrolizės produktams – β -amilazės hidrolizuoja krakmolą iki maltozės, α -amilazės hidrolizuoja krakmolą iki oligosacharidų, dekstrino, kuris toliau hidrolizuojamas iki maltozės, gliukozės bei maltotriozės [77].

3.2. Gliukoamilazių įterptų alginato struktūroje savybės

3.2.1. Alginato ir fermento koncentracijos įtaka gliukoamilazių savybėms

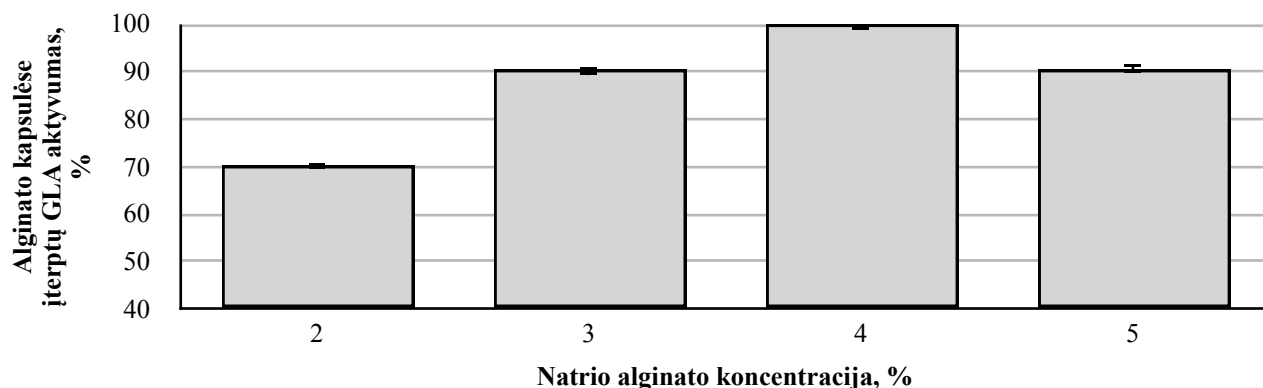
Vienas dažniausių gliukoamilazių imobilizavimo metodų yra fizikinis fermento fiksavimas alginato struktūroje, kuris plačiai naudojamas maisto pramonėje todėl yra saugus naudoti [78]. Įvertinta natrio alginato įvairių koncentracijos ir fermento koncentracijos įtaka įterptų GLA imobilizavimo proceso efektyvumui. Natrio alginato ir fermento koncentracijos įtaka įterptų GLA imobilizavimo proceso efektyvumui pateikta 3.3 paveiksle. Naudojant dideles fermento koncentracijas (91 AV/ml) imobilizacijai tinkamiausias 4 % ir 5 % alginato tirpalas, nes gautas atitinkamai 94 % ir 89 % GLA imobilizacijos efektyvumas. Naudojant 18 AV/ml fermento tirpalą pastebima tokia pati alginato koncentracijos priklausomybės tendencija kaip ir naudojant didelės koncentracijos fermento tirpalą imobilizacijai. Tačiau naudojant itin praskiestą fermentinį tirpalą (2 AV/ml) GLA didžiausias imobilizacijos efektyvumas pastebimas naudojant 2 % ir 3 % alginato tirpalus. Taigi, fermento imobilizacijos metu mažinant GLA tirpalo koncentraciją atitinkamai mažėja ir GLA imobilizacijos efektyvumas.



3.3 pav. Natrio alginato (n.a.) ir fermento koncentracijos įtaka įterptų GLA imobilizavimo proceso efektyvumui

Pagal gautus tyrimo rezultatus, pasirinktas didelės GLA koncentracijos (91 AV/ml) tirpalas imobilizacijai ir kitame tyrimo etape tirta imobilizuotų GLA aktyvumo priklausomybė nuo natrio alginato koncentracijos (3.4 pav.). Didžiausias imobilizuotos GLA aktyvumas nustatytas, naudojant 4 % natrio alginato tirpalą kapsulių gamybai, todėl imobilizuotų GLA aktyvumas prilygintas 100 %.

2%, 3% bei 5% natrio alginato koncentracijose imobilizuotos GLA pasižymėjo atitinkamai 70%, 90% bei 91%, fermentiniu aktyvumu.

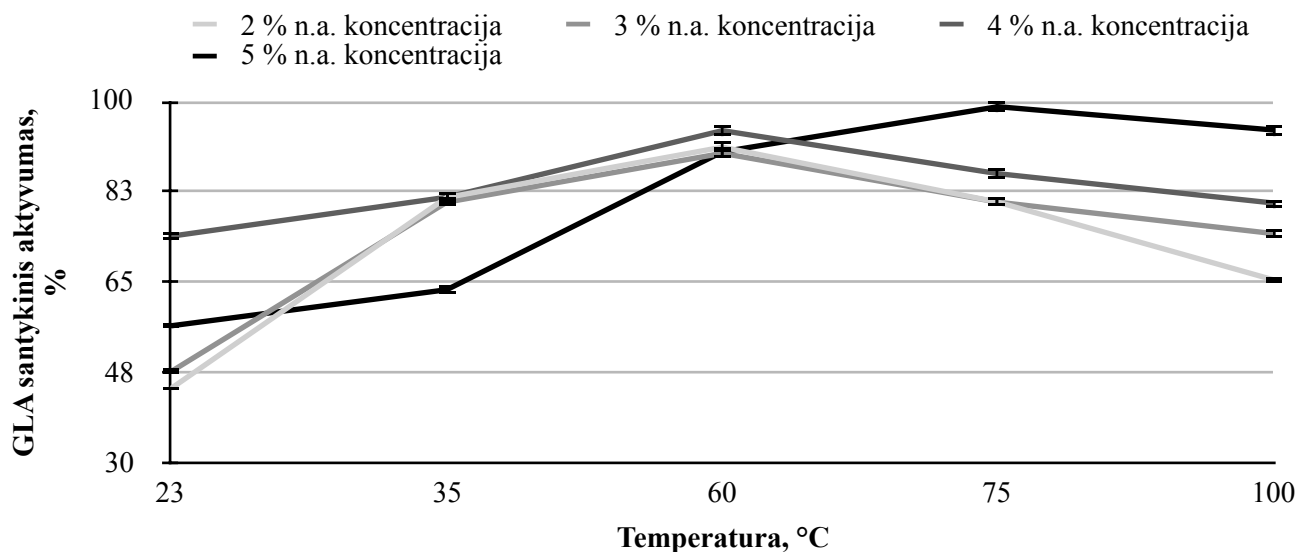


3.4 pav. Alginato struktūroje/kapsulėse įterptų GLA aktyvumo priklausomybė nuo natrio alginato koncentracijos

3.2.2. Temperatūros ir pH įtaka gliukoamilazių, įterptų alginato struktūroje, aktyvumui

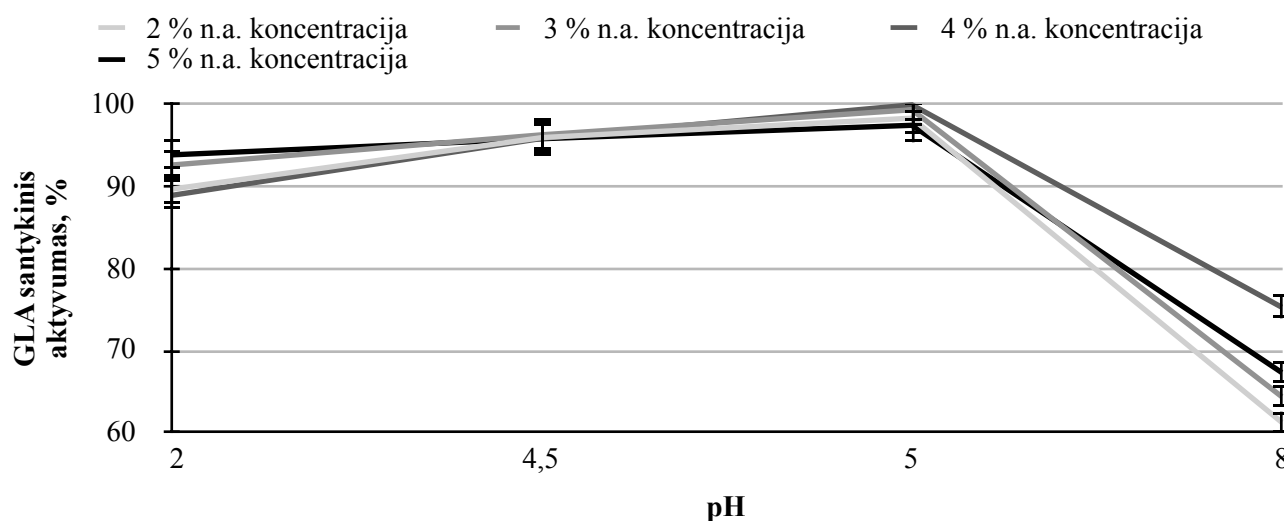
Imobilizuotų gliukoamilazių savybių charakterizavimui buvo pasirinkti du pagrindiniai parametrai: temperatūra ir pH. Iš šių parametru pokyčių galima įvertinti imobilizacijos sėkmę. Taigi, šio etapo metu buvo iširta terpės pH, temperatūros įtaka alginate įterptų gliukoamilazių aktyvumui.

3.5 paveiksle pavaizduotas imobilizuotų ir laisvųjų gliukoamilazių aktyvumas esant skirtingai reakcijos temperatūrai, bet pastoviai terpės pH vertei 4,5. Optimali imobilizuotų GLA aktyvumo temperatūra yra 60 °C, išskyrus imobilizuotų GLA 5 % natrio alginate optimali temperatūra pasislinko prie 75 °C. Taip pat imobilizuoti fermentai 5 %, 4 % ir 3 % natrio alginate išlaiko aktyvumą ir aukštos temperatūrose (75 – 100 °C). Optimalios temperatūros pasislinkimą galėjo sukelti alginato sudarytas karkasas, kuris padidina fermento atsparumą kritinėms temperatūroms, kaip aiškina Z. Konsoula *et al.* ar G. Dey *et al.* [79,80].



3.5 pav. Skirtingų koncentracijų natrio alginato (n.a.) įterptų GLA aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros

pH yra vienas pagrindinių parametru, galinčių pakeisti fermento aktyvumą reakcijos mišinyje. Imobilizacija paprastai sukelia optimalaus pH poslinkį dėl fermento konformacinių pokyčių. pH poveikis įkapsuliuotų GLA aktyvumui pateiktas 3.6 paveiksle. Rezultatai parodė, jog įkapsuliuotų fermentų optimali pH pasislinko į bazinę pusę t. y. didesnis įkapsuliuotų GLA aktyvumas nustatytas ties pH verte 5, kai laisvų GLA optimali pH vertė yra 4,5. Šį pH poslinkį galėjo lemti rūgščių ir šarminių aminorūgščių šoninių grandinių jonizacijos pokyčiai aktyvaus fermento centro mikroaplinkoje [81]. Visose šio tyrimo alginato koncentracijose imobilizuotos GLA išlaikė didelį aktyvumą rūgštinėje (pH 2 – 4) ir šarminėje (pH 5 – 8) pH zonose, tačiau didžiausiu 75,3 % aktyvumu pasižymėjo 4 % natrio alginatė įterptos GLA prie pH 8, o prie pH 2 - 5 % alginatė įterptos GLA. Indijos mokslininkai iš sojos pupelių išskyrė gliukoamilazes, imobilizavo agarų/agarozės matricoje ir taip pat nustatė, jog imobilizuotos gliukoamilazės pasižymėjo dideliu stabilumu tiek rūgštinėje, tiek šarminėje reakcijos terpėje bei imobilizuotų GLA optimali pH pasislinko per 1,5 pH vieneto į neutralę terpės pH pusę [82].



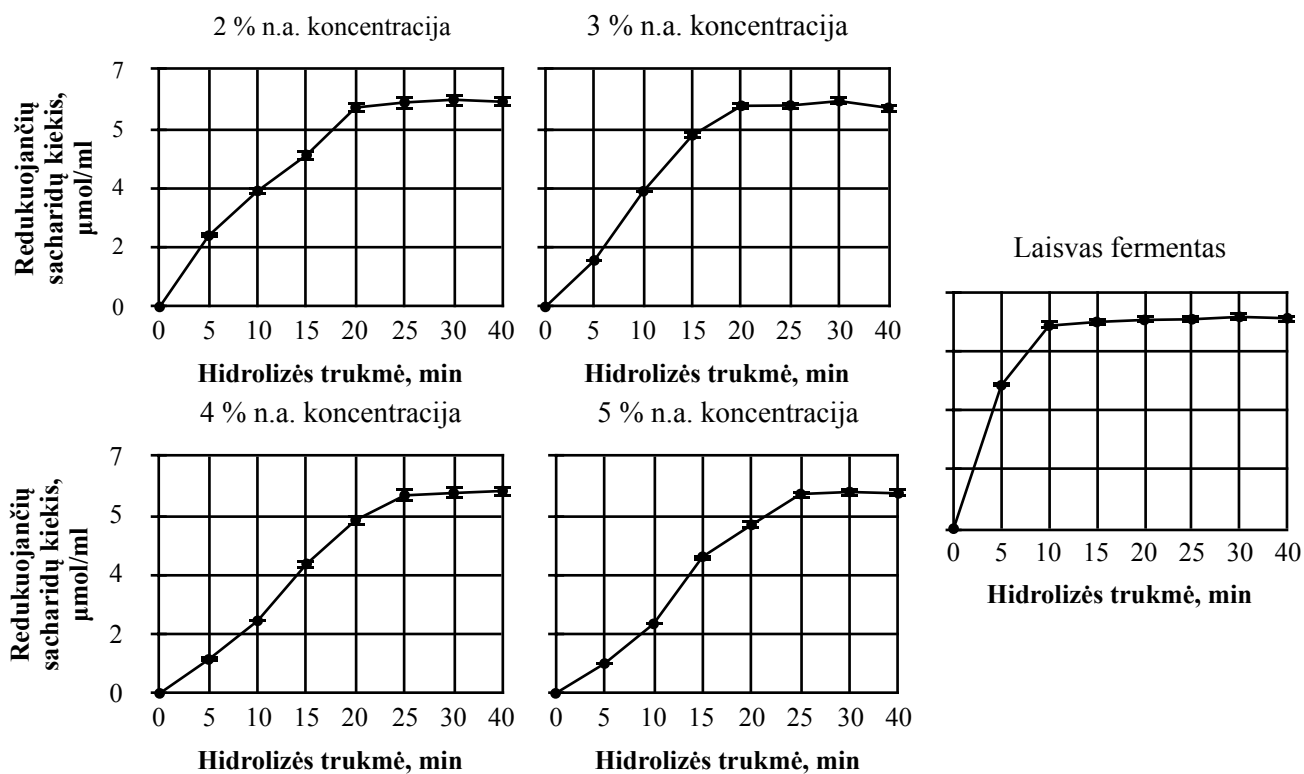
3.6 pav. Skirtingų koncentracijų natrio alginatė (n.a.) įterptų GLA aktyvumo priklausomybė nuo terpės pH. Čia 100 % GLA aktyvumas prilygintas didžiausiu aktyvumu pasižymėjusioms 4 % n.a. įterptomoms GLA

3.2.3. Alginatė įterptų gliukoamilazių katalizės kinetiniai parametrai

Fermento kinetiniai parametrai yra tokie pat svarbūs vertinant imobilizacijos proceso sėkmę, kaip ir imobilizacijos efektyvumas ar fermento aktyvumas. Šiame etape buvo analizuojami trys pagrindiniai katalizės kinetiniai parametrai – Michaelio konstanta K_M , pradinis reakcijos greitis V_0 , maksimalus reakcijos greitis V_{max} laisvųjų ir imobilizuotų GLA. Įvairių reakcijų K_M yra skirtinga ir parodo fermento giminingumą substratams. Jos skaitinė reikšmė yra lygi substrato koncentracijai, kuriai esant reakcijos greitis yra lygus pusei didžiausio (maksimalaus) greičio. Jei K_M reikšmė maža, giminingumas didelis, ir atvirkščiai. Pradinio reakcijos greičio fazę apibūdina pastovus greitis, t. y. vienodai didėjantis reakcijos produkto kiekis.

Šio etapo metu pirmiausia buvo nustatytas pradinis reakcijos greitis. Tam sudaryta redukuojančių sacharidų kiekio pokyčio nuo hidrolizės trukmės priklausomybė (3.7 pav.). Nustatyta, jog imobilizacijai naudojant mažesnes natrio alginato koncentracijas (2 % ir 3 %) nebekintantis redukuojančių sacharidų kiekis nusistovi greičiau, t. y. nuo 20-tos proceso minutės, negu

imobilizacijai naudojant didesnes alginato koncentracijas (4 % ir 5 %), kai redukuojančių sacharidų kiekis nebekinta nuo 25-tos proceso minutės. Laisvo fermento hidrolizės produkto pusiausvyra nusistovi dar greičiau t. y. nuo 10-tos proceso minutės. Nustačius produkto pusiausvyros trukmę apskaičiuota, jog pradinis reakcijos greitis mažėja didinant natrio alginato koncentraciją GLA įkapsuliavimo metu (3.1 lentelė). Laisvas fermentas pasižymi didžiausiu pradiniu hidrolizės reakcijos greičiu.



3.7 pav. Skirtingų koncentracijų natrio alginatė (n.a.) įterptų ir laisvų GLA hidrolizės proceso produkto kiekio ir trukmės priklausomybė

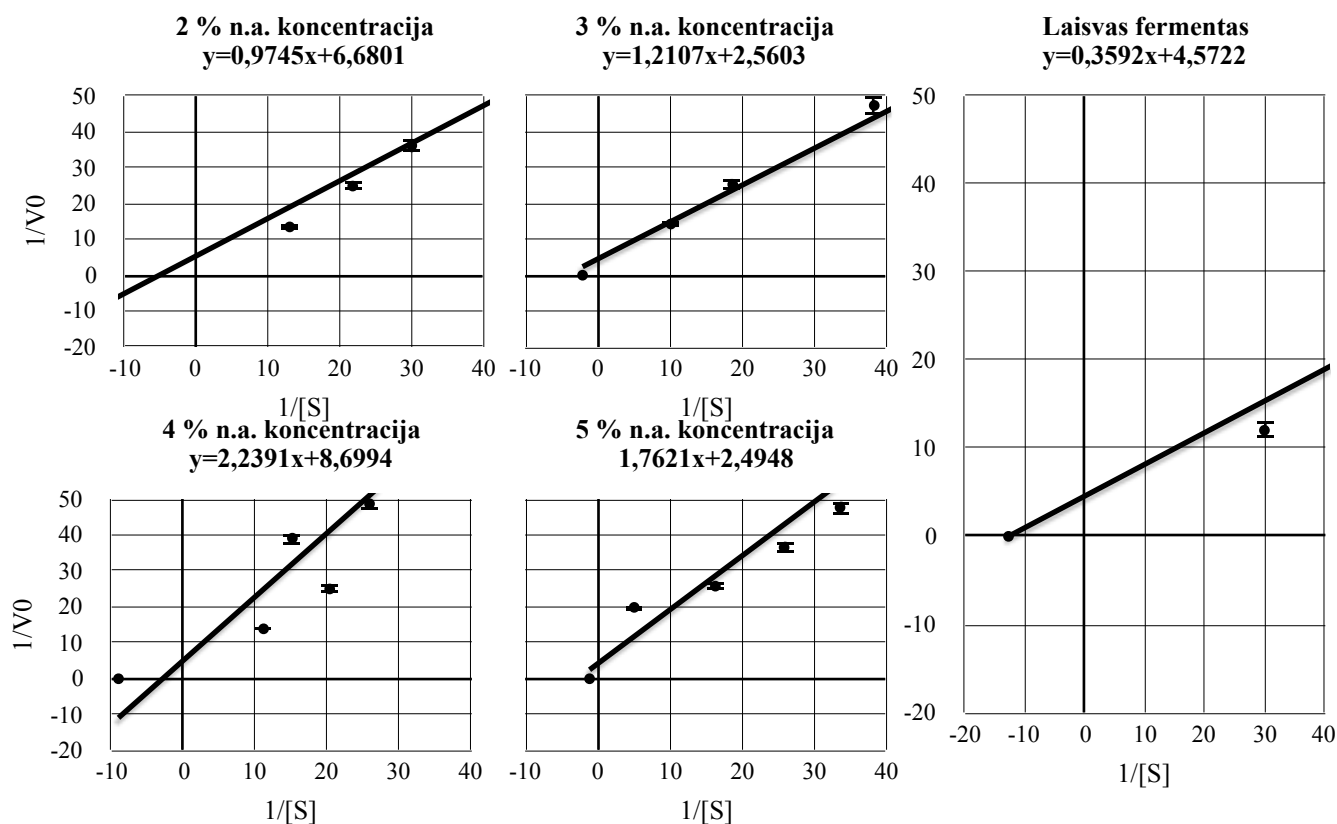
3.1 lentelė. Kinetiniai laisvų ir įkapsuliuotų skirtingose natrio alginato (n.a.) koncentracijose GLA parametrai

Fermentas	V_0 , $\mu\text{M}/\text{min}$	K_M , μM	V_{\max} , $\mu\text{M}/\text{min}$
2 % n.a. įkapsuliuota GLA	1,19	0,15	6,7
3 % n.a. įkapsuliuota GLA	1,18	0,26	2,6
4 % n.a. įkapsuliuota GLA	0,72	0,47	8,7
5 % n.a. įkapsuliuota GLA	0,67	0,71	2,5
Laisvas fermentas	1,74	0,08	4,6

Toliau buvo įvertinta Michaelio konstanta K_M ir maksimalus reakcijos greitis V_{\max} Lainuivero-Berko (ang. Lineweaver-Burk) atvirkštinėse koordinatėse – $1/V_0$ priklausomybė nuo $1/[S]$ (3.8 pav.). Per gautus taškus nubrėžiamos imobilizuotų ir laisvų GLA regresijos su vidutine $R^2=0,92$. Gautos tiesės kerta absčių ašies taškus, atitinkančius kiekvieno varianto $-1/K_M$, o ordinačių ašyje – taškus $1/V_{\max}$. Gautos vertės pateiktos 3.1 lentelėje. Iš gautų rezultatų matyti, jog imobilizuotų fermentų K_M vertės yra didesnės (0,15 – 0,71) nei laisvojo fermento (0,08). Toks K_M vertės

padidėjimas rodo imobilizuotų GLA sumažėjusį gyminingumą substratui. Tai galima paaiškinti tuo, jog fermentas įkapsuliuotas į alginato karkasą, įgauna erdvinių kliučių ir taip praranda lankstumą, todėl sulėtinama ir trikdoma didelių substrato molekulių (kaip krakmolos) difuzija iki fermento aktyviųjų centrų [83,84,85].

Laisvosios GLA V_{max} yra 4,6 $\mu\text{M}/\text{min}$, tačiau GLA įkapsuliuotos 2% ir 3% natrio alginata atveju nustatytas V_{max} padidėjimas iki atitinkamai 6,7 ir 8,7 $\mu\text{M}/\text{min}$ ir tai rodo pagerėjusį fermento katalizinį efektyvumą. V_{max} padidėjimas imobilizuojant yra neįprastas reiškinys, tačiau tokius pat požymius pastebėjo ir Kinijos mokslininkai kaip imobilizatorių naudodami anijoninį Eudragito S-100 kopolimerą [86]. Manoma, kad kinetinių parametrų padidėjimą lemia hidrofilinė nešiklio (kaip alginatas ar Eudragitas S-100) prigimtis, kuri padeda fermentui aktyviai funkcionuoti.

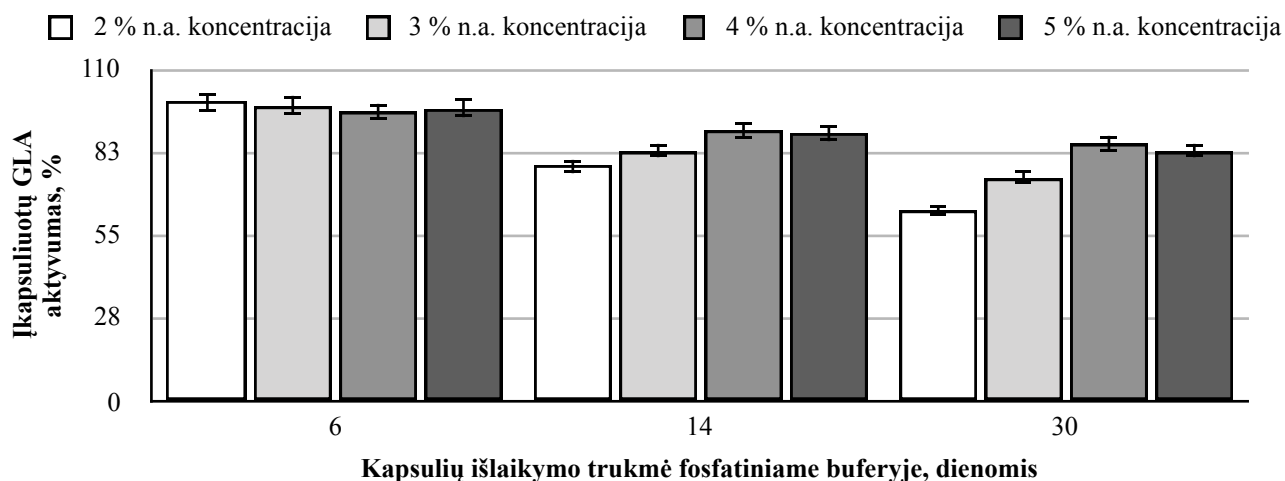


3.8 pav. Įkapsuliuotų, skirtingose natrio alginato (n.a.) koncentracijose, ir laisvų GLA reakcijos greičio priklausomybė nuo substrato koncentracijos Lainuivero-Berko koordinatėse

3.2.4. Natrio alginato koncentracijos ir laikymo trukmės įtaka įterptų gliukoamilazių aktyvumui

Vertinta natrio alginato koncentracijos (2 – 5 %) įtaka polimero struktūroje įterptų GLA aktyvumo pokyčiams 30 dienų laikotarpyje, laikant GLA kapsules fosfatiniame buferyje (pH 4,5) 4 °C temperatūroje tamsoje. Natrio alginato koncentracijos ir laikymo trukmės įtaka įterptų gliukoamilazių aktyvumui pateikta 3.9 paveiksle. Per 30 dienų aktyvumas labiausiai sumažėjo tų GLA, kurios įterptos mažesnės koncentracijos (2 % ir 3 %) alginato struktūrose. GLA įterptų 2 % ir 3 % natrio alginato struktūroje aktyvumas sumažėjo atitinkamai 37 % ir 26 % nuo pradinio GLA aktyvumo. Pastebėta, kad įkapsuliuojant naudojant 4 % ir 5 % natrio alginato tirpalą kapsulių

aktyvumas kito mažiausiai ir po 30 dienų tokios kapsulės išlaikė 85 % ir 83 % pradinio savo aktyvumo. Vokietijos mokslininkai įkapsuliuotų GLA stabilumo praradimą aiškina fermento išplovimu iš alginato matricos ypač laikant buferiniuose tirpaluose. Straipsnyje teigiama, jog per laiką alginato kapsulės traukiasi ir mažėja taip išstumdamas fermentą iš savo porų. Mokslininkai pateikia kelis variantus kaip suteikti mechaninio stabilumo alginato kapsulėms, pvz: sudarant alginato-chitozano gelinius mišinius ir taip padidinant Ca^{2+} jungčių kiekius alginato matricoje arba panaudojant kapsulių gamybai praturtintą papildomomis druskomis joninį tirpalą ir taip padidinant alginato matricos poringumą [87,88].



3.9 pav. Natrio alginato (n.a.) koncentracijos ir laikymo trukmės įtaka polimero struktūroje įterptų GLA aktyvumui. Čia 100% GLA aktyvumas atitinka kiekvieno imobilizacijos varianto (2 – 5% n.a.) pradinį, t.y. 0 dienų išlaikymo trukmės, GLA kapsulių aktyvumą

3.3. Kovalentiškai imobilizuotų gliukoamilazių savybės

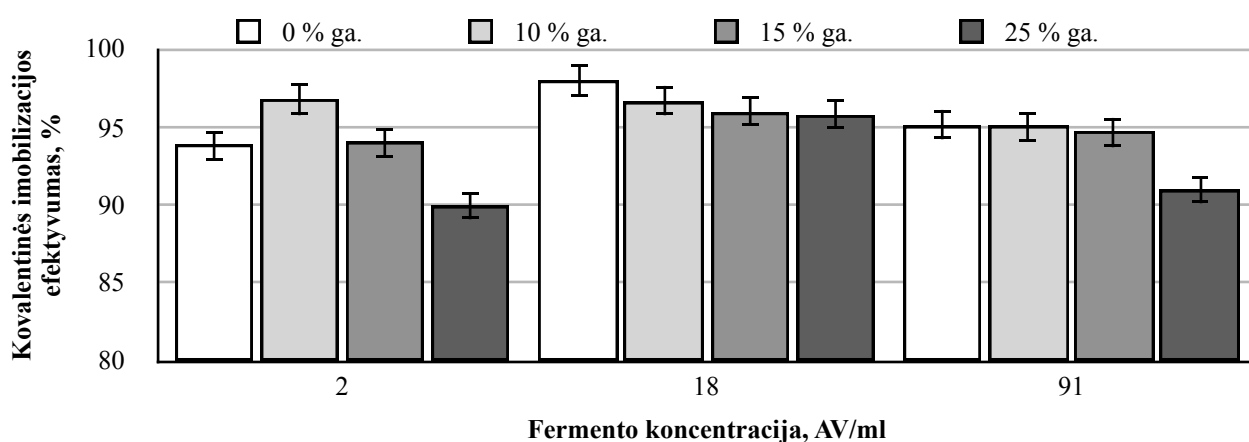
Cheminiams imobilizavimo metodams priskiriamas kovalentinio ryšio sudarymas. Šis metodas dažniausiai naudojamas negrįžtamų reakcijų procesuose. Kovalentinis imobilizavimas taikomas fermentų stabilumui didinti, padedantis sumažinti fermentų desorbcijos procesus nuo nešiklio paviršiaus. Neigiama savybė ta, kad kovalentiškai imobilizavus padidėja fermento kaip baltymo denatūracijos rizika, kas gali sąlygoti fermento katalitinio aktyvumo sumažėjimą.

Šio tyrimo metu buvo kovalentiškai imobilizuotos gliukoamilazės ir nustatyta imobilizacijos proceso parametrų: glutaro aldehido koncentracijos, aktyvuotų kapsulių išlaikymo trukmės fermentiniame tirpale bei fermentinio tirpalo koncentracijos įtaka gliukoamilazių savybėms – fermento imobilizacijos efektyvumui, fermento aktyvumui bei kinetiniams reakcijos parametrams.

3.3.1. Glutaraldehido, fermento koncentracijos ir kapsulių išlaikymo fermentiniame tirpale trukmės įtaka gliukoamilazių savybėms

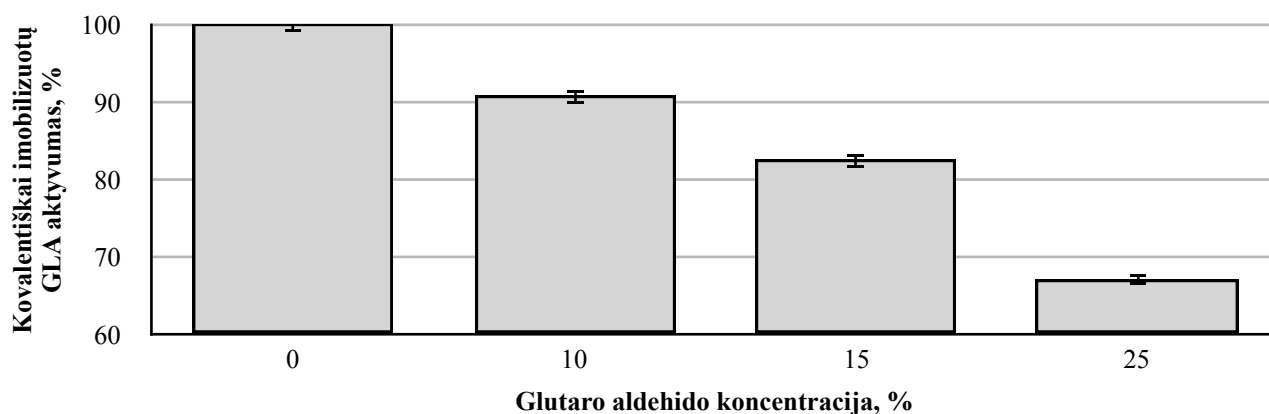
Tyrimo metu naudotas skirtingų koncentracijų glutaroaldehido tirpalas, kurio pagalba suformuotas kovalentinis ryšys tarp gliukoamilazių bei 4 % alginato kapsulių. Įvertinta glutaro aldehido koncentracijos ir fermento koncentracijos įtaka kovalentiškai imobilizuotų GLA imobilizavimo proceso efektyvumui (3.10 pav.). Kapsulių, gautų ruošiant be glutaro aldehido, GLA kovalentinis imobilizacijos efektyvumas didžiausias naudojant koncentruotus ir vidutiniškai koncentruotus GLA

tirpalus (91 AV/ml ir 18 AV/ml), o didėjant glutaroaldehido koncentracijai GLA imobilizavimo efektyvumas atitinkamai mažėjo. Tačiau naudojant itin praskiestus fermentinius tirpalus kovalentinė imobilizacija efektyvesnė naudojant 10 % glutaroaldehidą, o visi kiti variantai – didinat glutaroaldehidą koncentraciją ar visiškai nenaudojant reagento GLA imobilizacijai, parodė neigiamą įtaką kovalentinės imobilizacijos efektyvumui. Variantas, kai buvo nenaudotas surišėjas, parodė, jog kovalentines jungtis gali sudaryti ne tik glutaroaldehidas tarp nešiklio ir fermento, bet ir pats nešėjas su fermentu per amino grupę fermente ir karboksilinę grupę alginate [89]. Taip pat galimas adsorbcijos procesas tarp nešiklio (alginato) ir fermento [90]. Mokslininkai nagrinėja kovalentinės imobilizacijos variantus, panaudojant kitus efektyvius surišėjus, kaip ρ -benzochinoną, glioksalį ir kt [91,92]. Surišėjo savybė sudaryti cheminį ryšį tarp fermento ir nešiklio priklauso nuo fermento rūšies, būdingų fermento funkcinių grupių ar net pačio fermento šaltinio (bakterijos, mikroskopiniai grybeliai ar gyvūno organizmas) [3].



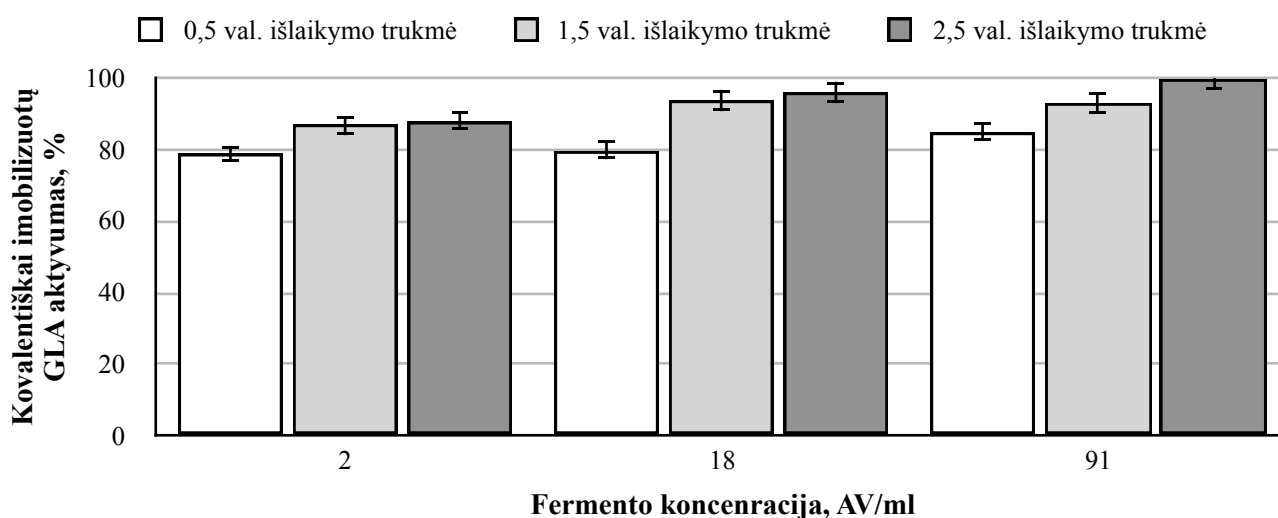
3.10 pav. Įvairių koncentracijų glutaro aldehido (ga.) koncentracijos įtaka kovalentinio imobilizavimo efektyvumui

Atsižvelgiant į gautus tyrimo rezultatus, panašu, kad glutaro aldehidas atliko efektyviausią surišėjo funkciją tik naudojant labai praskiestą t. y. 2 AV/ml fermentinį tirpalą, todėl tolesnis glutaro aldehido koncentracijos įtakos GLA aktyvumui įvertinimas tęsiamas su šiuo variantu. 3.11 paveiksle pateikta glutaro aldehido įvairių koncentracijų įtaka kovalentiškai imobilizuotų GLA aktyvumui. Nustatyta, kad kapsulių, ruoštų be glutaro aldehido, GLA aktyvumas buvo didžiausias. Tyrimai parodė, kad kapsulių fermentinis aktyvumas mažėjo didėjant glutaro aldehido koncentracijai.



3.11 pav. Įvairių koncentracijų glutaro aldehido įtaka kovalentiškai imobilizuotų GLA aktyvumui

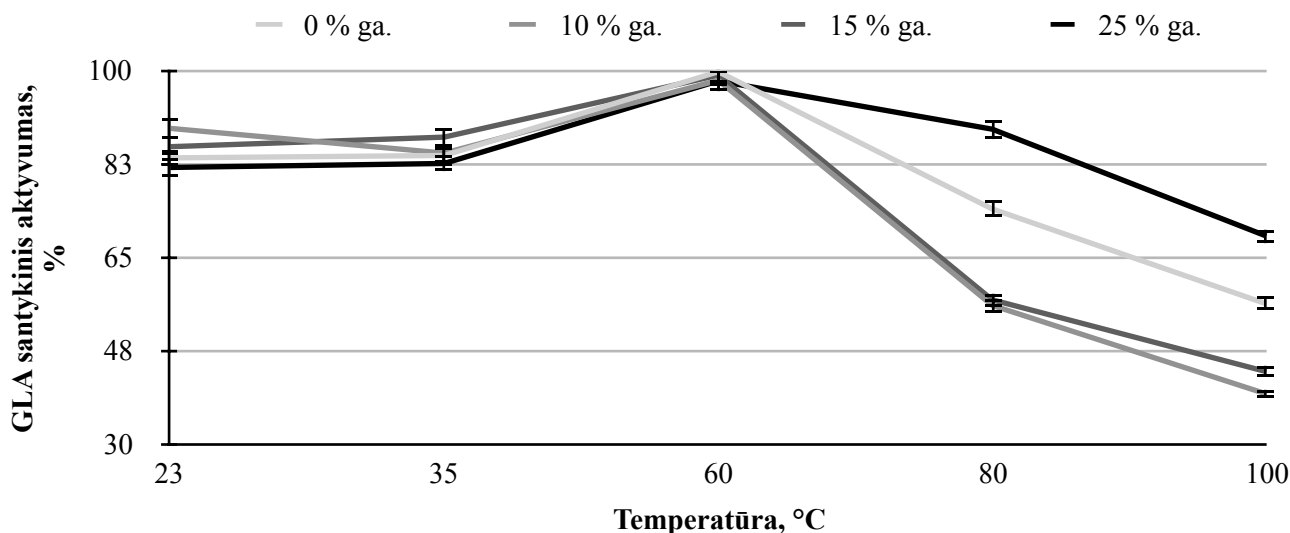
Atsižvelgiant į tai, jog glutaro aldehidas ne itin naudingas surišėjas GLA kovalentinio imobilizavimo metu, kapsulių išlaikymo GLA tirpale trukmės įtaka vertinta nenaudojant šio reagento. Nustatyta, kad didinant kapsulių išlaikymo trukmę fermentiniame GLA tirpale imobilizuoto fermento aktyvumas tendencingai didėja. Didžiausiu fermentiniu aktyvumu pasižymėjo kapsulės, kurių gamybai naudotas 91 AV/ml GLA tirpalas ir kapsulės fermentiniame tirpale išlaikytos 2,5 val (3.12 pav.).



3.12 pav. Alginato kapsulių išlaikymo fermentiniame tirpale trukmės įtaka GLA aktyvumui. Čia 100 % fermentinis aktyvumas prilygintas GLA, imobilizacijai naudojant 91 AV/ml GLA tirpalą bei išlaikant kapsules 2,5 val.

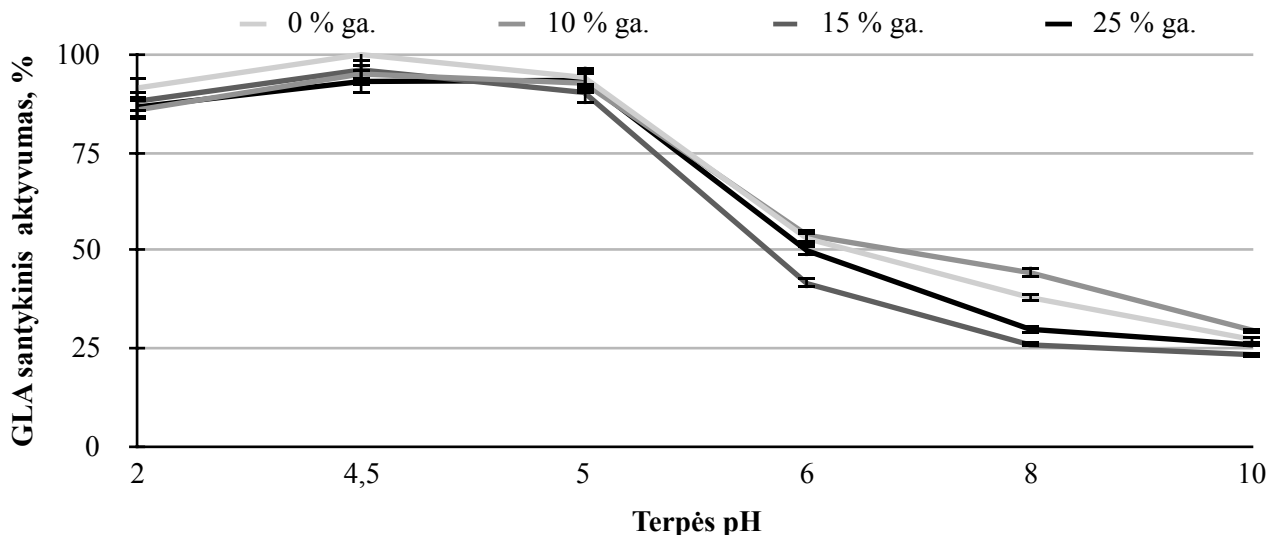
3.3.2. Temperatūros ir terpės pH įtaka kovalentiškai imobilizuotų gliukoamilazių aktyvumui

Šio etapo metu buvo ištirta terpės pH ir temperatūros įtaka kovalentiškai imobilizuotų GLA aktyvumui. 3.13 paveiksle pavaizduotas imobilizuotų gliukoamilazių aktyvumas esant skirtingai reakcijos temperatūrai. Optimali laisvųjų ir imobilizuotų GLA aktyvumo temperatūra yra 60 °C. Tačiau pastebėta, jog kovalentiškai imobilizuotos GLA išlaikė aktyvumą aukštose temperatūrose (75 – 100 °C). 100 °C temperatūroje 0 %, 10 %, 15 %, 25 % glutaro aldehidu kovalentiniais ryšiais prijungtos GLA išlaikė atitinkamai 57 %, 40 %, 44 %, 69 % fermento aktyvumo. Kovalentiškai imobilizuotos GLA yra tvirtai pririštos prie nešiklio paviršiaus, suskaldyti ryšius sudėtinga net ir esant aukštai temperatūrai, todėl nustatytas GLA išlikęs aukštas fermentinis aktyvumas plačiame temperatūros intervale [52,93].



3.13 pav. Skirtingose glutaro aldehido (ga.) koncentracijose kovalentiškai prijungtų GLA aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros. Čia 100 % GLA aktyvumas prilygintas didžiausiu aktyvumu pasižymėjusioms 0 % ga. prijungtoms GLA

Toliau pateiktas pH poveikis kovalentiškai imobilizuotų GLA aktyvumui (3.14 pav). Optimali reakcijos pH kovalentiškai imobilizuotų GLA yra 4,5. Nustatyta, jog 0 %, 10 %, 15 % ir 25 % glutaro aldehido koncentracijose sudarytų GLA kovalentiniai ryšiai imobilizavo fermentą sėkmingai, todėl imobilizuotos GLA išlaikė aukštą fermentinį aktyvumą rūgštinėje (pH 2) ir šarminėje (pH 10) terpėse. Rūgštinėje terpėje kovalentiškai imobilizuotų GLA vidutinis aktyvumas yra 88 %. Šarminėje terpėje (pH 10) kovalentiškai imobilizuotų GLA aktyvumas vidutiniškai yra 30 % fermentinio aktyvumo. Didžiausiu aktyvumu pasižymėjo GLA, prijungtos be glutaro aldehido prie nešiklio, todėl jų aktyvumas prilygintas 100 %.

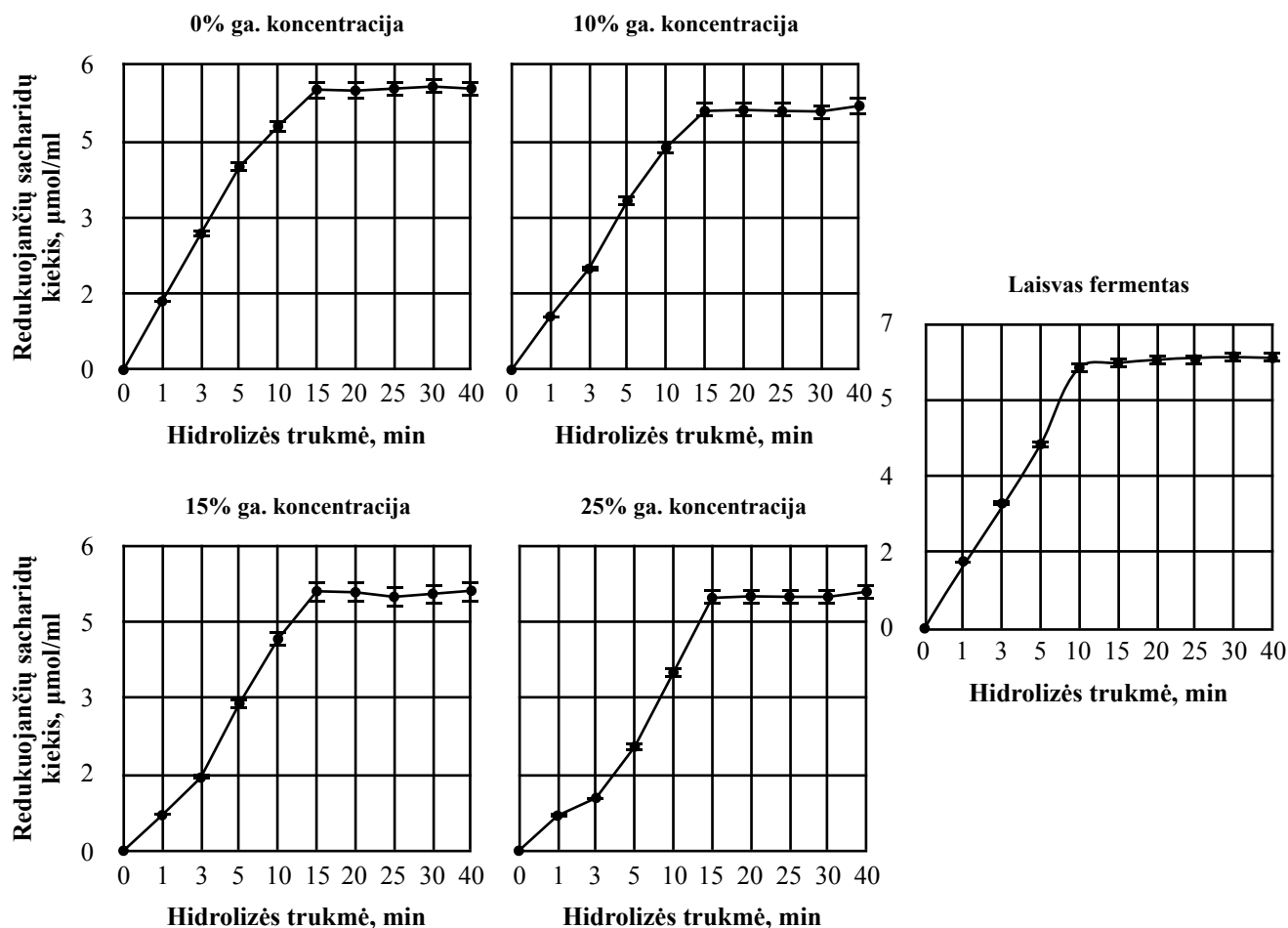


3.14 pav. Skirtingose glutaro aldehido (ga.) koncentracijose kovalentiškai prijungtų GLA aktyvumo priklausomybė nuo terpės pH. Čia 100 % GLA aktyvumas prilygintas didžiausiu aktyvumu pasižymėjusioms 0 % ga. prijungtoms GLA

3.3.3. Kovalentiniu ryšiu prijungtų gliukoamilazių katalizės kinetiniai parametrai

Katalizės kinetiniai parametrai nustatyti tiriamosioms GLA, kovalentiniu ryšiu prijungtomis prie 4% alginato kapsulių. Imobilizacijai naudotas 18 AV/ml fermentinis tirpalas ir kapsulės šiame tirpale išlaikytos 2,5 val.

Pirmiausia buvo nustatytas pradinis reakcijos greitis. Tam sudaryta redukuojančių sacharidų susidarymo nuo hidrolizės trukmės priklausomybė (3.15 pav.). Iš gautų duomenų matyti, kad kovalentiniu būdu imobilizuotos GLA vykdo krakmolo hidrolizę 15 min kol produktų koncentracija nebekinta. Laisvo fermento hidrolizės produkto pusiausvyra nusistovi greičiau t. y. po 10-tos proceso minutės. Nustačius produkto pusiausvyros trukmę apskaičiuota, jog pradinis reakcijos greitis mažėja didinant glutaro aldehido koncentraciją GLA kovalentinio prijungimo metu (3.2 lentelė). Tokį V_0 mažėjimą lemia glutaro aldehidas, kuris, manoma, pakeičia fermento konformaciją ir lėtina fermento-substrato greitam kompleksui susidarymui. Todėl nenaudojant glutaro aldehido, fermento adsorbicija alginato paviršiuje paveikė GLA struktūrą mažiausiai ir yra V_0 didesnis už kitus variantus. Laisvas fermentas pasižymi didžiausiu pradiniu hidrolizės reakcijos greičiu.

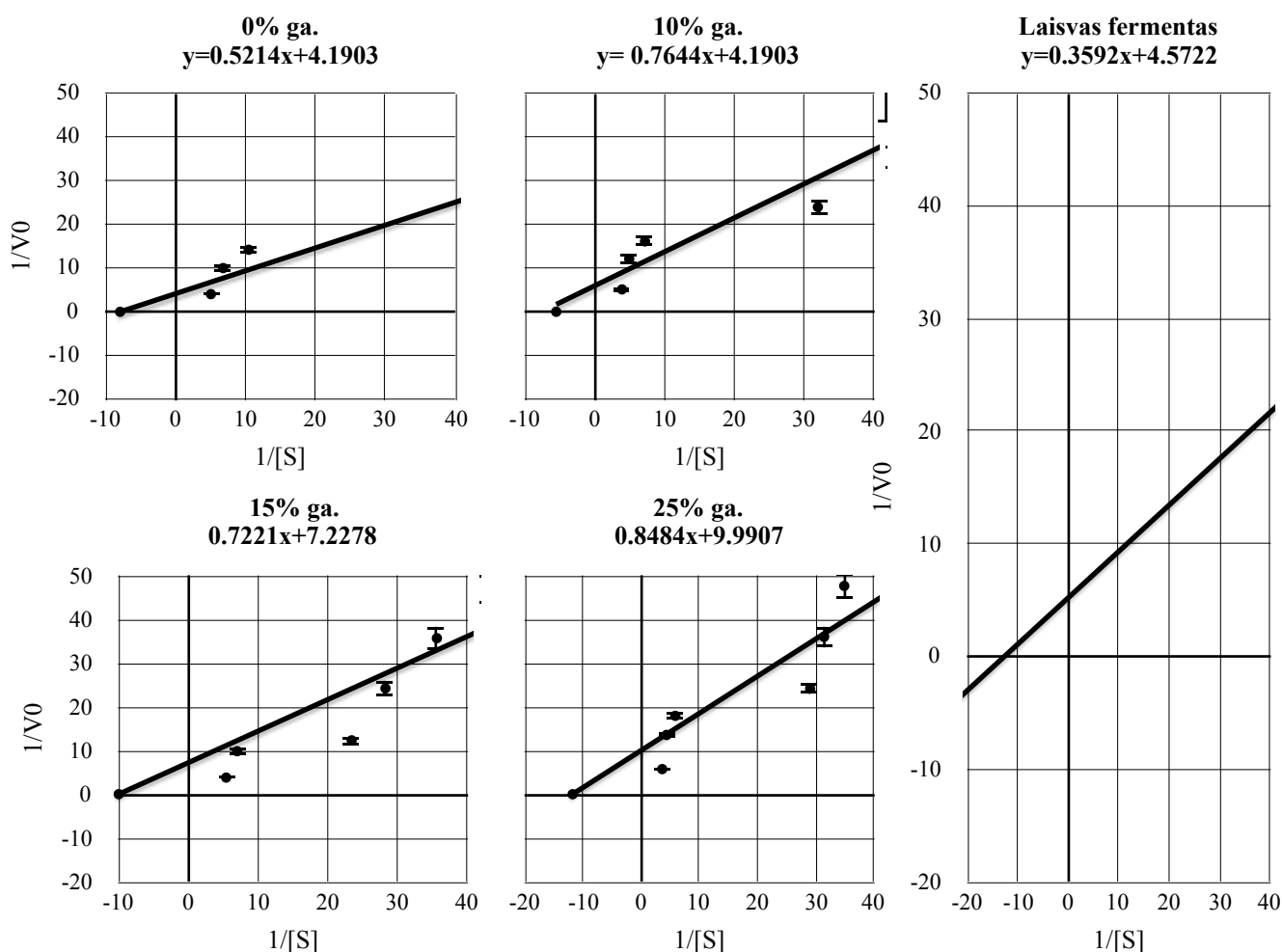


3.15 pav. Kovalentiškai imobilizuotų ir laisvų GLA hidrolizės produkto kiekio ir trukmės priklausomybė nuo imobilizacijai naudoto glutaro aldehido (ga.) koncentracijos

3.2 lentelė. Kinetiniai laisvų ir kovalentiškai imobilizuotų GLA parametrai

Fermentas	V_o , $\mu\text{M}/\text{min}$	K_M , μM	V_{max} , $\mu\text{M}/\text{min}$
0 % ga. įkapsuluota GLA	1,73	0,09	4,2
10 % ga. įkapsuluota GLA	1,41	0,1	4,2
15 % ga. įkapsuluota GLA	0,97	0,18	7,2
25 % ga. įkapsuluota GLA	0,65	0,12	10,0
Laisvas fermentas	1,74	0,08	4,6

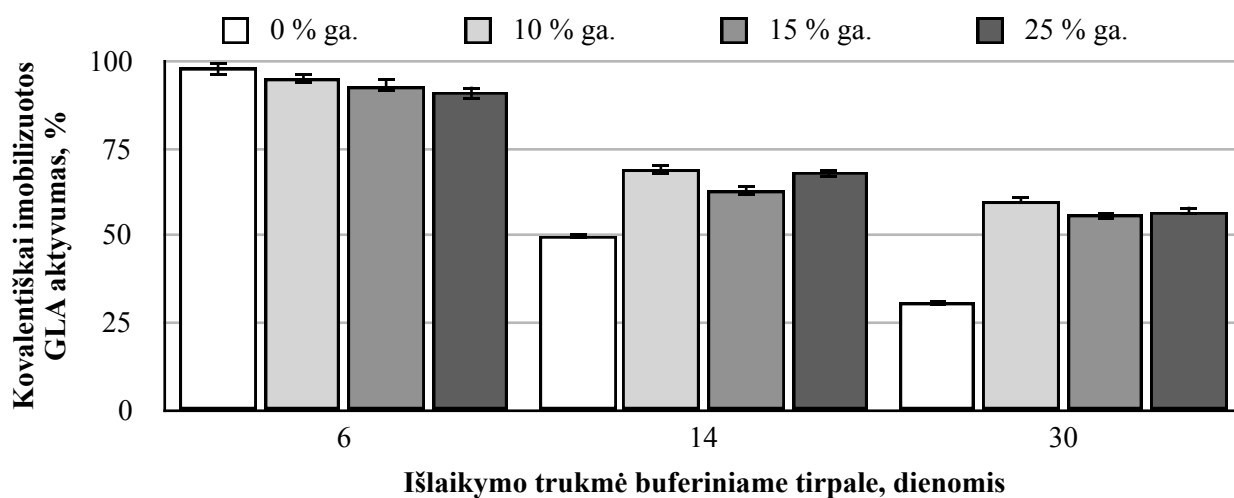
Toliau buvo įvertinta Michaelio konstanta K_M ir maksimalus reakcijos greitis V_{max} Lainuivero-Berko (Lineweaver-Burk) atvirkštinėse koordinatėse (3.16 pav.) sudarius imobilizuotų ir laisvų GLA regresijas su vidutine $R^2=0,93$. Apskaičiuoti kinetiniai parametrai pateikti 3.2 lentelėje. Iš gautų rezultatų matyti, jog imobilizuotų fermentų K_M vertės yra didesnės (0,18 – 0,09 μM) nei laisvojo fermento (0,08 μM). Toks K_M vertės padidėjimas rodo imobilizuotų GLA sumažėjusį giminingumą substratui. Tai aiškinama tuo, jog fermentas sudaręs kovalentinius ryšius su nešikliu praranda lankstumą, nes dažnai jungtys susidaro šalia aktyviųjų fermento centrų ir taip trukdo substrato fermento reakcijai [94]. Tačiau kovalentiškai imobilizuotos GLA yra daug giminingesnės substratui nei įkapsuluotos alginatė ($K_{M\text{įkap.}} > K_{M\text{kov.}}$).



3.16 pav. Kovalentiškai imobilizuotų ir laisvų GLA reakcijos greičio priklausomybė nuo substrato koncentracijos Lainuivero-Berko koordinatėse

3.3.4. Laikymo trukmės ir glutaro aldehido koncentracijos įtaka kovalentiškai imobilizuotoms gliukoamilazėms

Vertinta skirtingo tipo kapsulių, imobilizacijai naudojant 0 – 25 % glutaro aldehido koncentracijas, aktyvumas 30 dienų laikotarpyje, laikant kovalentiškai imobilizuotas GLA kapsules fosfatiname buferyje (pH 4,5) 4 °C temperatūroje tamsoje. Glutaro aldehido įvairių koncentracijų ir laikymo trukmės įtaka kovalentiškai prijungtų GLA aktyvumui pateikta 3.17 paveiksle. Per 30 dienų GLA fermentinis aktyvumas labiausiai sumažėjo tų kapsulių, kurių ruošimui nebuvo naudotas glutaro aldehido tirpalas. Toks imobilizavimo būdas, kuriam nėra naudojama aktyvuojanti medžiaga, laikomas fizikiniu, kur vyksta tik adsorbcijos procesas tarp alginato aktyvių grupių ir GLA. Kapsulės, kurios buvo neaktyvintos glutaro aldehidu per 30 dienų prarado 69 % pradinio GLA aktyvumo, tai gali būti paaiškinta tuo, kad buvo sudarytas labai silpnas ryšys tarp nešiklio ir fermento ir dėl to įvyko desorbcijos procesas. Kapsules aktyvavus glutaro aldehidu jau buvo gautas stiprus kovalentinis ryšys, kas įtakojo GLA aktyvumo mažesnę netekimą. Naudojant 10 % glutaro aldehidą aktyvinimui, kapsulių GLA aktyvumas kito lėčiausiai, o 30 dienų laikotarpyje tokios kapsulės išlaikė 60 % pradinio aktyvumo. Naudojant didesnę koncentraciją nei 10 % glutaro aldehido, kapsulių aktyvumas sumažėjo žymiai greičiau.



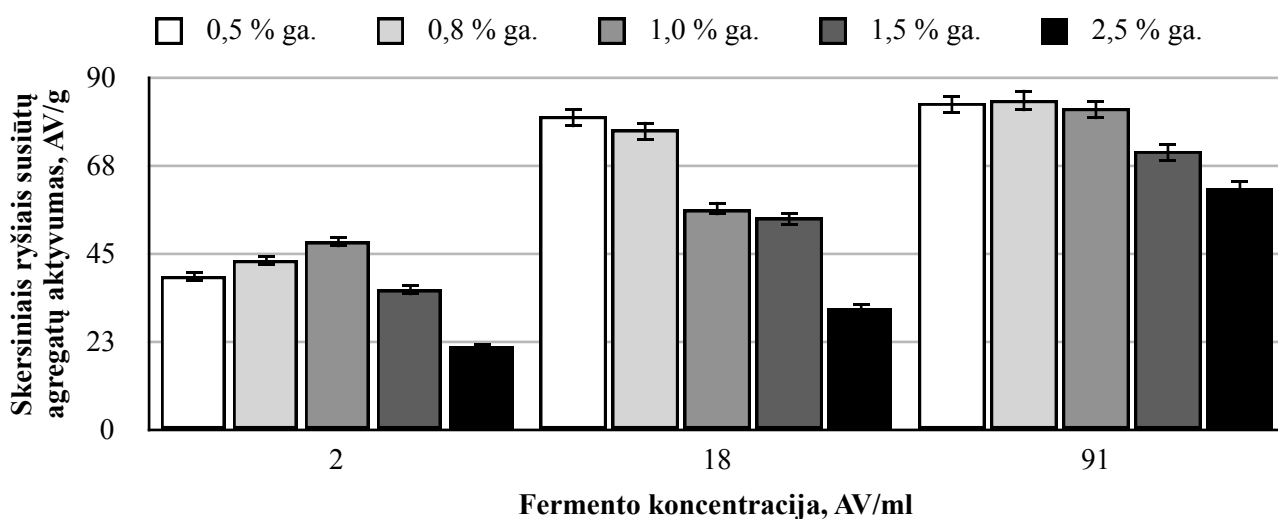
3.17 pav. Glutaro aldehido (ga.) koncentracijos ir laikymo trukmės įtaka kovalentiškai prijungtų GLA aktyvumui. Čia 100% GLA aktyvumas atitinka kiekvieno imobilizacijos varianto (0-25% ga.) pradinį, t.y. 0 dienų išlaikymo trukmės, GLA kapsulių aktyvumą

3.4. Skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių agregatų savybės

3.4.1. Glutaro aldehido ir fermento kiekio įtaka skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių agregatų aktyvumui

Skersiniais ryšiais susiūtų GLA agregatų aktyvumo priklausomybė nuo fermento kiekio ir glutaro aldehido koncentracijos pateikta 3.18 paveiksle. Iš gautų rezultatų galima teigti, kad didžiausiu aktyvumu pasižymėjo GLA agregatai, kurių sudarymui naudotas 0,8 % glutaro aldehido tirpalas bei didelė fermento koncentracija (91 AV/ml), agregatai pasižymi 84,1 AV/g aktyvumu. Skersinių ryšių

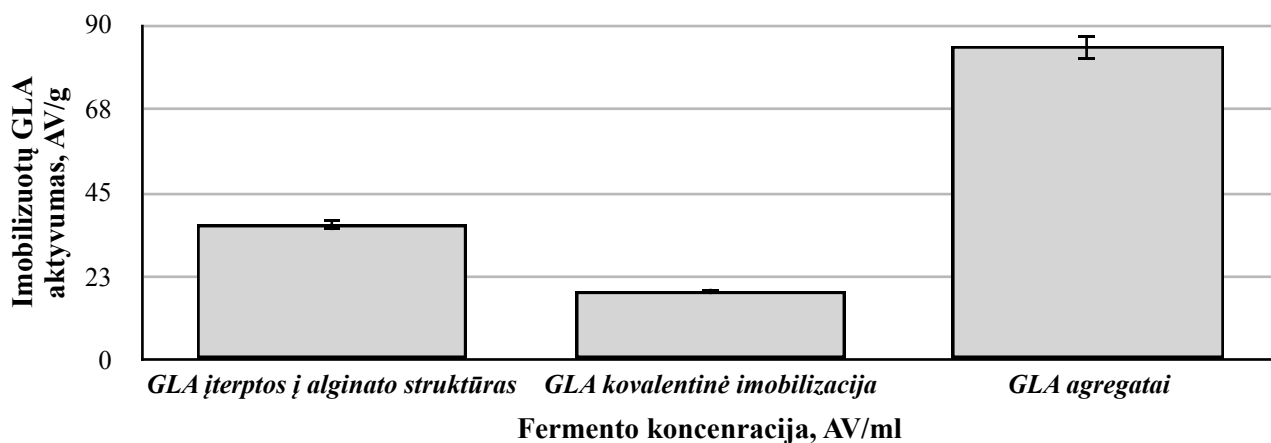
sudarymui naudojant 0,5 % ir 1,0 % glutaro aldehido tirpalą nustatytas taip pat didelis fermento aktyvumas – atitinkamai 83,2 ir 81,9 AV/g. 1,5 % ir 2,5 % glutaro aldehido koncentracijos darė neigiamą poveikį GLA agregatų aktyvumui. Manoma, kad prie didesnių glutaro aldehido koncentracijų susidaro per didelis kiekis skersinių ryšių tarp fermento molekulių, todėl GLA agregatai praranda minimalų lankstumą, reikalingą fermento veiklai [95]. Esant praskiestiems fermentiniams tirpalams agregatų sudarymui tinkamiausia 1,0 % surišėjo (glutaro aldehido) koncentracija, mažesnės (0,5 % ir 0,8 %) bei didesnės (1,5 % ir 2,5 %) surišėjo koncentracijos darė neigiamą poveikį GLA agregatų aktyvumui.



3.18 pav. Skersiniais ryšiais susiūtų GLA agregatų aktyvumo priklausomybė nuo fermento kiekio ir glutaro aldehido

Tolesniems tyrimams naudoti GLA agregatai, kurie formuoti naudojant 91 AV/ml fermentinį tirpalą bei 0,8 % koncentracijos glutaro aldehido tirpalą, nes šiuo variantu pasiektas didžiausias skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių agregatų aktyvumas.

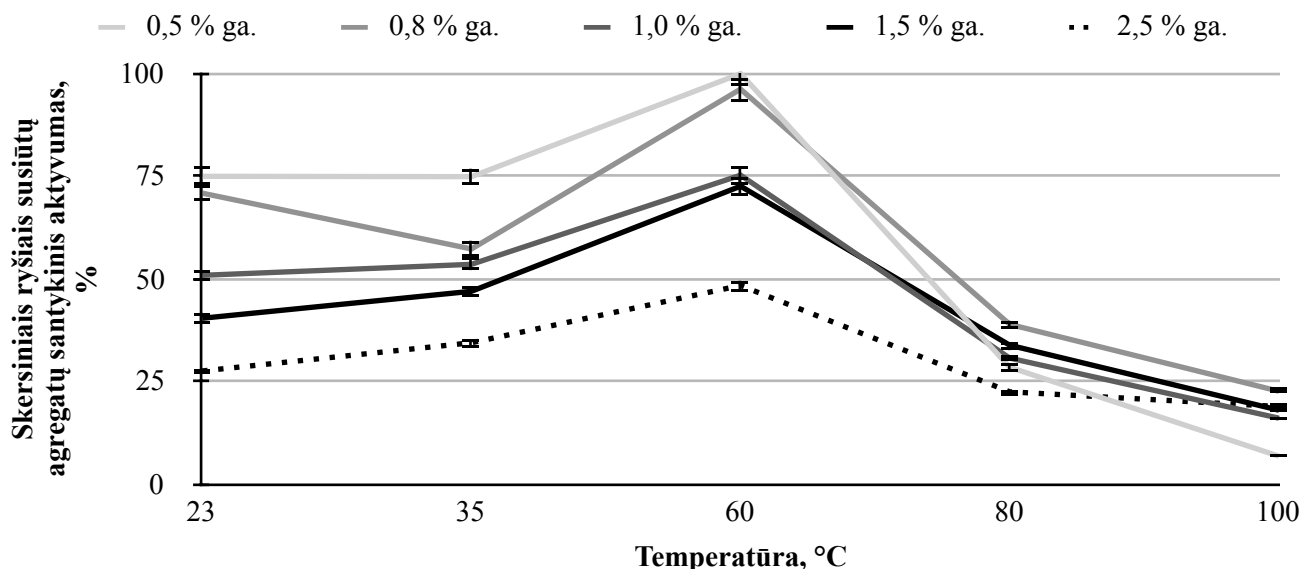
Lyginant GLA kovalentinį, įterpimo į alginatą ir agregatų sudarymą skersiniais ryšiais imobilizavimo būdus, GLA agregatų fermentinis aktyvumas nustatytas 2,3 kartus didesnis nei GLA įterptų į alginato struktūras ir 4,6 kartus didesnis lyginant su kovalentiniu imobilizavimu (3.19 pav.). Agregatų sudarymo technika yra pranašesnė tuo, jog imobilizacijai nėra naudojami fiziniai barjerai (kaip alginatas), kurie izoliuoja fermentą ir taip apsunkina bei prailgina substrato difuzijos kelią iki fermento aktyviųjų centrų [68]. Tuo tarpu, įkapsuliuotos GLA molekulės yra apribojamos alginato karkaso difuziniu barjeru, kuris apsunkina substrato patekimą iki fermento. GLA prijungtos kovalentiniu ryšiu prie alginato kapsulių įkapsuliuavimo problemos neturi, nes fermentas imobilizuotas alginato karkaso paviršiuje, tačiau fermentas yra labiau pažeidžiamas aplinkos pokyčiams bei neturėdamas fizinio barjero gali būti lengvai išplaunamas nuo nešiklio paviršiaus. Desorbcijos procesas yra neišvengiamas nors kovalentiniai ryšiai yra stiprūs [96].



3.19 pav. Skirtingais būdais imobilizuotų GLA aktyvumo palyginimas

3.4.2. Temperatūros ir pH įtaka skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių aktyvumui

Šio etapo metu buvo ištirta terpės pH ir temperatūros įtaka skersiniais ryšiais susiūtų agregatų fermentiniam aktyvumui. 3.20 paveiksle pavaizduota temperatūros įtaka gliukoamilazių agregatų aktyvumui. Optimali GLA agregatų aktyvumo temperatūra yra 60 °C. Skersiniais ryšiais susiūti GLA agregatai nepasižymi termostabilumu – 100 °C hidrolizės reakcijos temperatūroje GLA agregatai išlaikė vidutiniškai 16,4 % fermentinio aktyvumo. Kinijos mokslininkai tyrė GLA agregatų termostabilumą ir nustatė, kad agregatai gali pasižymėti 60 % fermentiniu aktyvumu 75 °C temperatūroje [67]. Rezultatai skiriasi, tikriausiai, dėl Kinijos mokslininkų agregatų sudarymui naudotų apsauginių ksantano ir dekstrino agentų, kurie sudarė į fizinį barjerą panašią struktūrą, todėl GLA agregatai išliko aktyvūs aukštesiose temperatūrose.

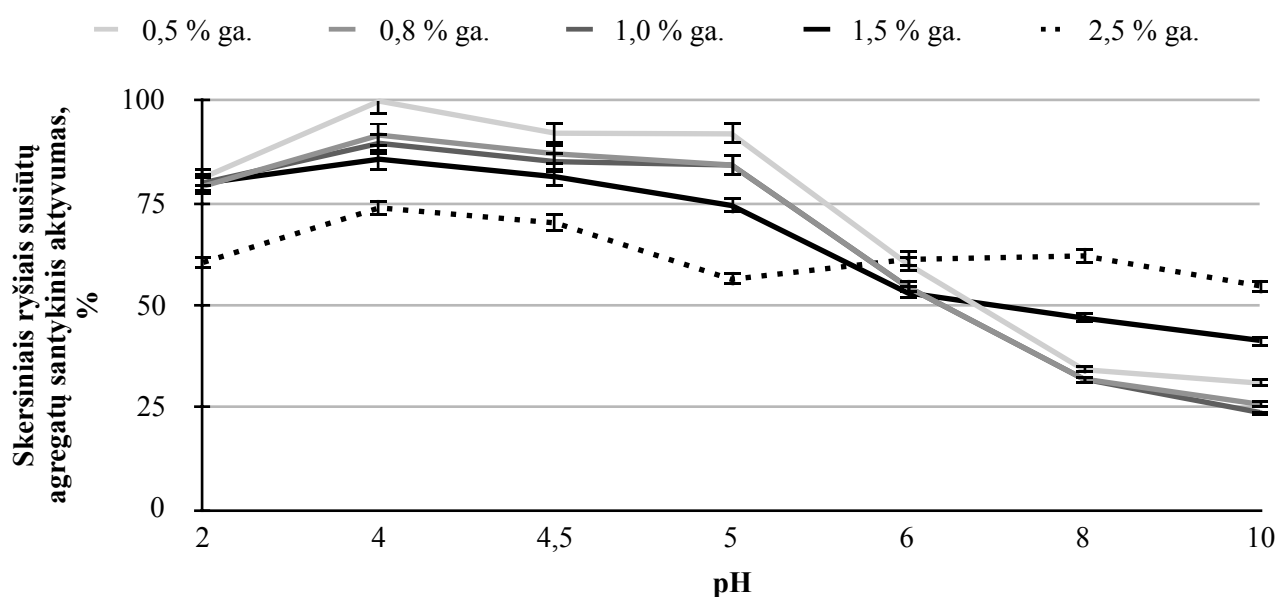


3.20 pav. Temperatūros įtaka skirtingomis glutaro aldehido (ga.) koncentracijomis susiūtų agregatų aktyvumui. Čia 100 % fermento aktyvumas prilygintas didžiausiu aktyvumu pasižymėjusiems GLA agregatams, susiūtiems 0,5% ga.

Toliau pateiktas pH poveikis skersiniais ryšiais susiūtų GLA agregatų aktyvumui (3.21 pav). Rezultatai parodė, jog skersiniais ryšiais susiūtų agregatų optimali pH pasislinko per 0,5 pH vieneto į rūgštinę terpę, kai laisvojo fermento optimali pH buvo nustatyta 4,5. Mokslinėse publikacijose

galima rasti nemažai straipsnių, kurie patvirtina GLA agregatų optimalaus pH poslinkį rūgšties kryptimi [97,98]. Viename jų teigiama, kad fermentų agregatuose gali įvykti funkcinų grupių krūvių persiskirstymas – vienos funkcinės grupės įgauna krūvį, kitos tampa neutralios, todėl agregatų viduje susidaro skirtinga nei reakcijos vandenilio potencialo reikšmė, sukianti fermento optimalios reakcijos terpės pH poslinkį rūgšties (gali būti ir bazės) kryptimi [98].

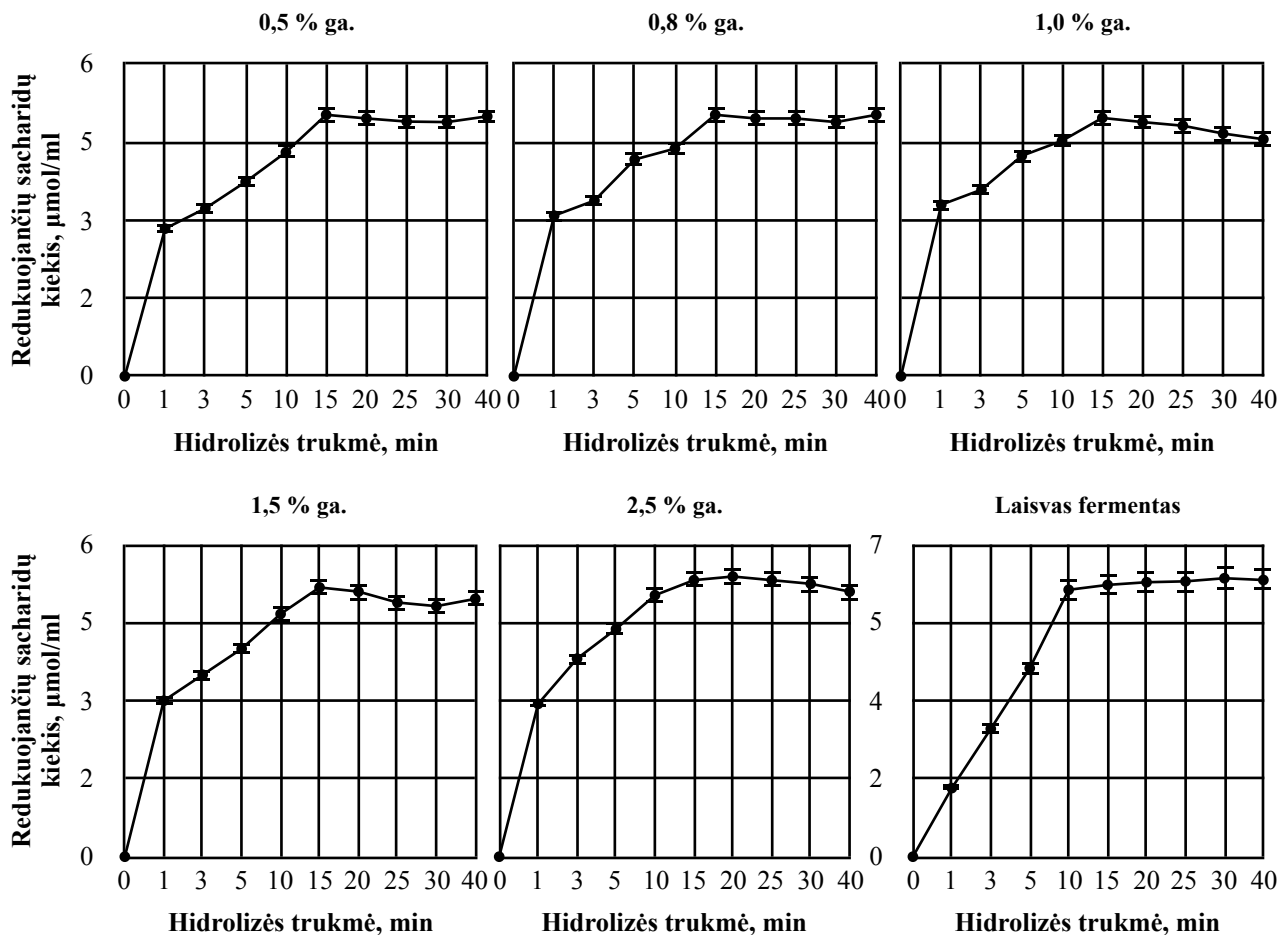
Taip pat nustatyta, jog GLA agregatai pasižymi pH stabilumu itin šarminėje ar rūgštinėje reakcijos terpėje. Prie pH 2 GLA agregatų, imobilizacijai naudojant 0,5 %, 0,8 %, 1,0 %, 1,5 % ir 2,5 % glutaro aldehido koncentracijas, aktyvumas atitinkamai yra 81,3 %, 79,2 %, 80,0 %, 79,0 % ir 60,5 %. Prie pH 10 GLA agregatų aktyvumas atitinkamai 30,9 %, 25,7 %, 23,7 %, 41,0 % ir 54,7 %. Taigi, rūgštinėje pH didžiausiu aktyvumu pasižymėjo GLA agregatai susiūti 0,5 % glutaro aldehidu, o šarminėje pH – 2,5 % glutaro aldehidu susiūti GLA agregatai.



3.21 pav. Skirtingomis glutaro aldehido (ga.) koncentracijomis susiūtų GLA agregatų aktyvumo priklausomybė nuo terpės pH. Čia 100 % fermento aktyvumas prilygintas didžiausiu aktyvumu pasižymėjusiems GLA agregatams, susiūtiems 0,5% ga.

3.4.3. Skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilzių katalizės kinetiniai parametrai

Katalizės kinetiniai parametrai nustatyti 0,8 % glutaro aldehido tirpalu susiūtiems GLA agregatams. Pirmiausia buvo nustatytas pradinis reakcijos greitis. Tam sudaryta redukuojančių sacharidų susidarymo nuo hidrolizės trukmės priklausomybė (3.22 pav.). Iš gautų duomenų matyti, kad taikant skersiniais ryšiais susiūtų GLA agregatų imobilizacijos metodą, hidrolizės produktų koncentracija nebekito ties 15 min. Laisvo fermento hidrolizės produkto pusiausvyra nusistovi greičiau t. y. po 10-tos proceso minutės. Nustačius produkto pusiausvyros trukmę įvertinamas pradinis reakcijos greitis (3.3 lentelė). Nustatyta, jog didinant agregatus surišančio agento koncentraciją V_0 didėja ir net viršija laisvo fermento V_0 .

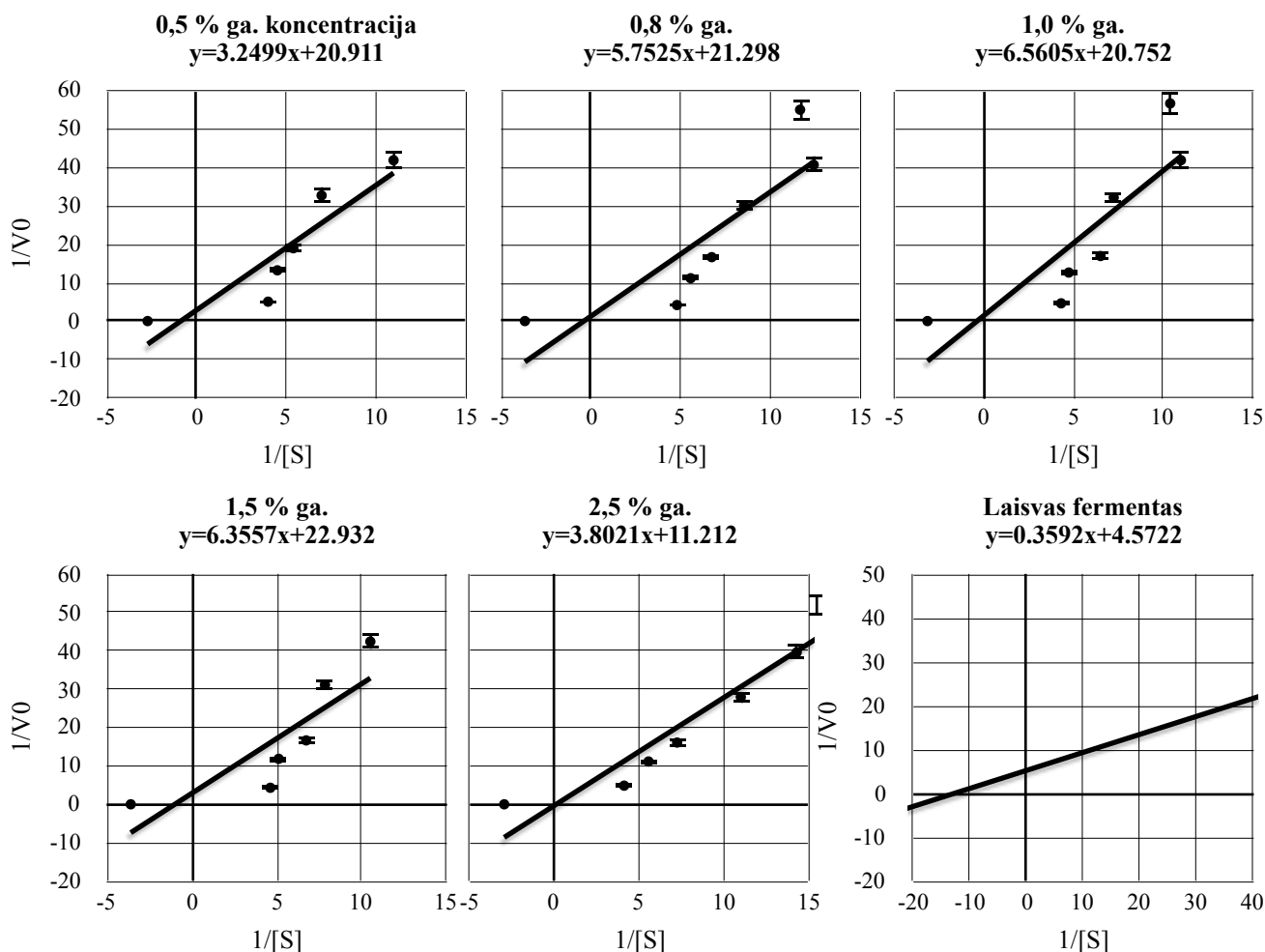


3.22 pav. Skersiniais ryšiais susiūtų GLA agregatų ir laisvų GLA hidrolizės produkto kiekio ir trukmės priklausomybė nuo agregatų sudarymui naudoto glutaro aldehido (ga.) koncentracijos

3.3 lentelė. Kinetiniai laisvų ir skersiniais ryšiais susiūtų agregatų parametrai

Fermentas	V_0 , $\mu\text{M}/\text{min}$	K_M , μM	V_{max} , $\mu\text{M}/\text{min}$
0,5 % ga.	3,63	1,13	20,9
0,8 % ga.	4,07	0,27	21,3
1 % ga.	4,13	0,32	20,8
1,5 % ga.	4,21	0,28	22,9
2,5 % ga.	4,29	0,34	11,2
Laisvas fermentas	1,74	0,08	4,6

Toliau buvo įvertinta Michaelio konstanta K_M ir maksimalus reakcijos greitis V_{max} Lainuivero-Berko atvirkštinėse koordinatėse (3.23 pav.) sudarius imobilizuotų ir laisvų GLA regresijas su vidutine $R^2=0,92$. Apskaičiuoti kinetiniai parametrai pateikti 3.3 lentelėje. Iš gautų rezultatų matyti, jog imobilizuotų fermentų K_M vertės yra didesnės (0,27 – 1,13 μM) nei laisvojo fermento (0,08 μM). Toks K_M vertės padidėjimas rodo imobilizuotų GLA sumažėjusį gyminingumą substratui. Substrato molekulės konformacija kinta ir nebeatitinka fermento aktyvaus centro konformacijos, todėl atsiranda substrato difuzijos apribojimas [67].

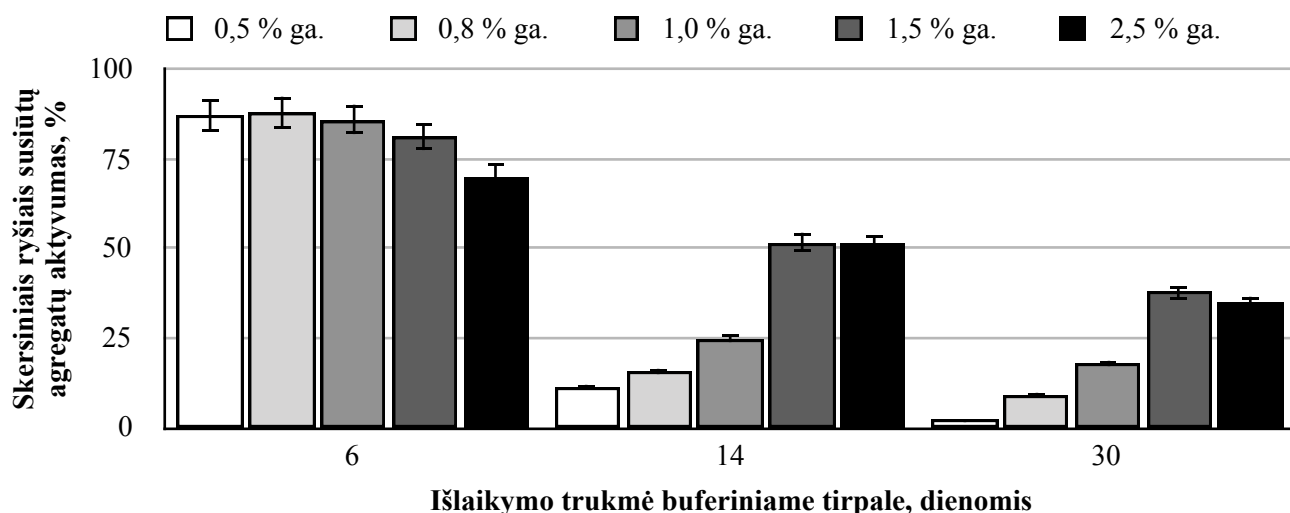


3.23 pav. Skirtingų koncentracijų glutaro aldehidu (ga.) susiūtų agregatų ir laisvų GLA reakcijos greičio priklausomybė nuo substrato koncentracijos Lainuivero-Berko koordinatėse

Lyginant visų trijų imobilizacijos būdų K_M vertes giminingumo didėjimo kryptimi imobilizacijos būdus būtų galima išdėstyti taip: agregatai < įkapsuliavimas < kovalentinis imobilizavimas.

3.4.4. Glutaro aldehido koncentracijos ir laikymo trukmės įtaka skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių agregatų aktyvumui

Bandymų metu stebėta, kaip kinta skirtingo tipo (agregatų sudarymui naudojant 0,5 – 2,5 % glutaro aldehido koncentracijas) agregatų aktyvumas 30 dienų laikotarpyje, laikant agregatus fosfatiniame buferyje (pH 4,5) 4 °C temperatūroje tamsoje. 3.24 paveiksle pateikta laikymo trukmės įtaka GLA agregatų aktyvumui laikant juos fosfatiniame buferyje. GLA agregatų, susiūvimui naudojant 0,5 %, 0,8 %, 1,0 %, 1,5 % ir 2,5% glutaro aldehido koncentracijas, aktyvumas po 6 dienų išlaikymo buferiniame tirpale sumažėjo 12,6 %, 11,8 %, 14,0 %, 18,8 % ir 29,9 % nuo pradinio agregatų aktyvumo. Po 14 išlaikymo dienų sumažėjo atitinkamai 88,6 %, 84,6 %, 75,1 % ir 48,87 % nuo pradinio agregatų aktyvumo, o po 30 dienų agregatai prarado dar pusę savo aktyvumo.



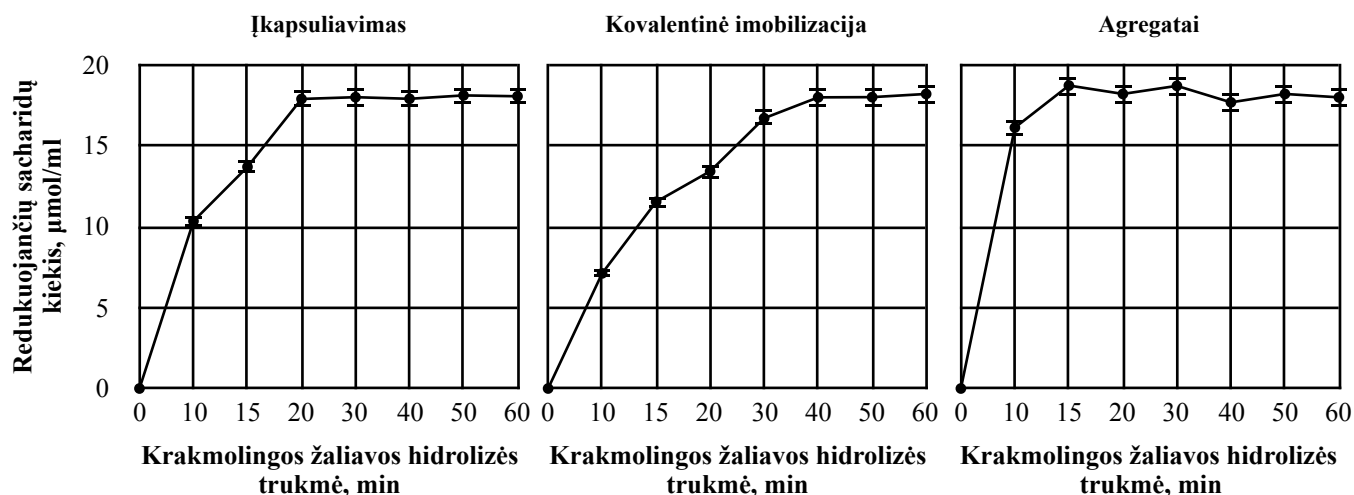
3.24 pav. Glutaro aldehido (ga.) koncentracijos ir laikymo trukmės įtaka skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių agregatų aktyvumui. Čia 100% GLA aktyvumas atitinka kiekvieno imobilizacijos varianto (0,5-2,5 % ga.) pradinį, t. y. 0 dienų išlaikymo trukmės GLA agregatų aktyvumą

Skersiniais ryšiais susiūtų GLA agregatų aktyvumas 30 dienų laikotarpyje mažėjo itin greitai, lyginant su GLA prijungtomis kovalentiškai ar įkapsuliuotomis alginatais. Vertinant rezultatus – didžiausią 85 % aktyvumą išlaikė įkapsuliuotos GLA alginato gelyje, 60 % – kovalentiškai prijungtos GLA, o skersiniais ryšiais susiūti gliukoamilazių agregatai išlaikė tik 38 % savo pradinio aktyvumo.

3.5. Imobilizuotų gliukoamilazių panaudojimo galimybės krakmolingos žaliavos fermentinei hidrolizei

3.5.1. Krakmolingos žaliavos hidrolizės trukmės nustatymas

Hidrolizuojant krakmolingą žaliavą su imobilizuotomis GLA svarbu nustatyti trukmę, kuri reikalinga, kad įvyktų pilna krakmolo hidrolizė iki gliukozės. Tyrimo metu įvertinta per kiek laiko alginato struktūroje įterptos GLA, kovalentiškai imobilizuotos GLA, o taip pat skersiniais ryšiais susiūti GLA agregatai įvykdė kukurūzų miltuose esančio krakmolo hidrolizę. Gauti rezultatai pateikti 3.25 paveiksle.

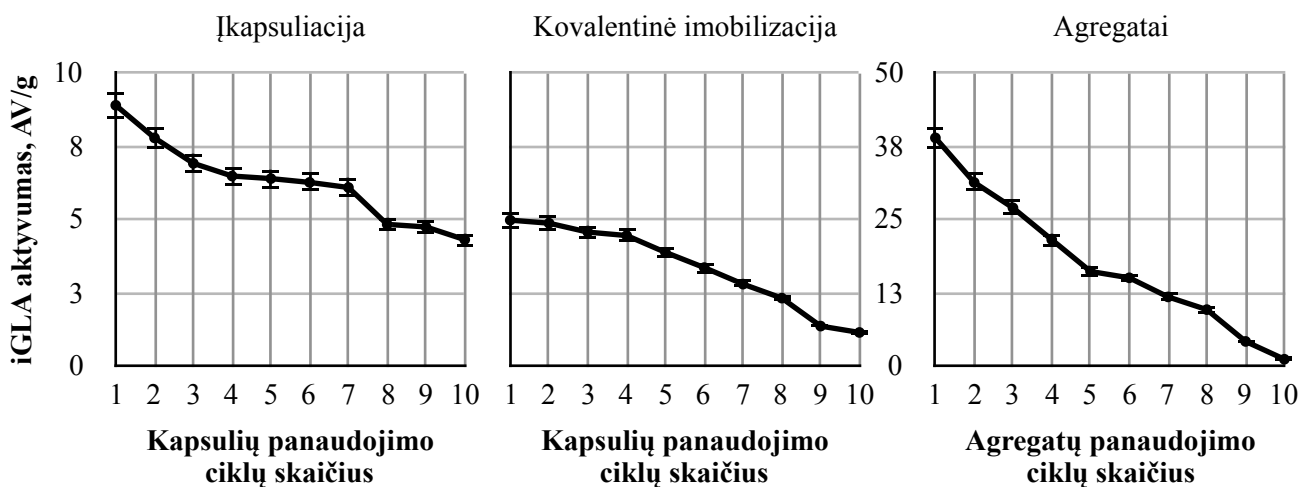


3.25 pav. Krakmolingos žaliavos hidrolizės trukmės nustatymas skirtingai imobilizuotomis GLA

Naudojant kapsules su įterptomis GLA (3.25 pav.), hidrolizės produktų koncentracija po 20 minučių nebekito. Naudojant kovalentiškai imobilizuotų GLA kapsules krakmolingos žaliavos hidrolizei redukuojančių sacharidų koncentracija nebekito po 40 minučių. Naudojant skersiniais ryšiais susiūtus GLA agregatus jau po 15 minučių redukuojančių sacharidų koncentracija nekito. Lyginant vykdytus krakmolingos žaliavos hidrolizės procesus, kovalentiškai imobilizuotų GLA kapsulėms prireikė dvigubai daugiau laiko įvykdyti tokio pat kiekio krakmolo hidrolizę, negu naudojant alginato kapsules su įterptomis GLA ir 4 kartus lyginant su agregatais. Tokią skirtingą krakmolingos žaliavos hidrolizės trukmę gali nulemti imobilizuotų GLA skirtingas aktyvumas. GLA agregatai pasižymi didžiausiu fermentiniu aktyvumu (84,1 AV/g), kovalentiškai imobilizuotos GLA ir įkapsuliuotos alginato struktūroje pasižymi atitinkamai 18,3 AV/g ir 36,6 AV/g, todėl krakmolingos žaliavos hidrolizė gali įvykti greičiau reakcijai naudojant GLA agregatus.

3.5.2. Imobilizuotų gliukoamilazių panaudojimo ciklų skaičius krakmolingos žaliavos hidrolizei

Toliau buvo vykdomas tyrimas, kad įvertinti imobilizuotų GLA panaudojimo ciklų skaičių. Imobilizuotų GLA aktyvumo kitimas vertinamas kiekvieno ciklo pabaigoje. Skirtingais būdais imobilizuotų GLA aktyvumo priklausomybė nuo panaudojimo ciklų skaičiaus pateikta 3.26 paveiksle.



3.26 pav. Skirtingai imobilizuotų GLA (iGLA) aktyvumo priklausomybė nuo fermentinei hidrolizei panaudotų ciklų skaičiaus

Kukurūzų miltų krakmolo hidrolizė vykdyta su imobilizuotomis GLA 10 ciklų. Iš gautų duomenų (3.26 pav.) nustatyta, kad į alginato struktūrą įterptos GLA po 5-ių panaudojimo ciklų išlaikė 72,0 % pradinio (po pirmojo ciklo) fermentinio aktyvumo, 10-to ciklo pabaigoje kapsulės išlaikė 51,4 % fermentinio aktyvumo. Kovalentiškai imobilizuotos GLA po 5-ių panaudojimo ciklų išlaikė 78,0 % pradinio aktyvumo, tačiau 10-to ciklo pabaigoje kapsulės išlaikė tik 23,4 % fermentinio aktyvumo. Kapsulių mažėjantis aktyvumas aiškinamas ryšio tarp matricos ir fermento susilpnėjimu kiekvienos hidrolizės metu, todėl fermentas gali būti išplaunamas nuo matricos [97,98].

Skersiniais ryšiais susiūtus GLA po 5-ių panaudojimo ciklų išlaikė 41,7 % pradinio aktyvumo, o 10-to ciklo pabaigoje visiškai prarado aktyvumą. Agregatai pakartotinai naudojami praranda

aktyvumą dėl dažno substrato patekimo į aktyvųjį centrą. Nuolatinis substrato srautas deformuoja ir sumažina svarbias kataliziniams agregatams aktyvumui funkcinės grupės aktyviajame centre [97,98].

Kinijos mokslininkai teigia, kad GLA agregatai gali būti panaudojami 30 kartų ir išlaikyti apie 45 % fermentinio aktyvumo. Mokslininkai GLA agregatams sudarymui naudojo apsauginius ksantano gumos bei dekstrino agentus, kurie, manoma, sustiprina katalinio centro stabilumą [67].

Indijos mokslininkai tyrė skersiniais ryšiais susiūtų gliukoamilazių magnetiškai reaguojančių agregatų savybes. Vietoj tradicinio glutaroaldehido surišėjo, mokslininkai naudojo dialdehidinį pektiną. Agregatai susiūti dialdehidiniu pektinu pasižymėjo 95,4% aktyvumu, kai su glutaro aldehidu susiūti GLA agregatai pasižymėjo 85,3% aktyvumu. Taip pat buvo atlikti pakartotinio tokių agregatų panaudojimo tyrimai ir nustatyta, jog po 10 ciklo GLA agregatai išlaikė 84 % pradinio aktyvumo [99].

Indijos mokslininkų grupė alginato struktūroje įkapsuliavo α -amilazes ir gliukoamilazes bei fermentinį tirpalą praturtino polisacharidu pululanu. Tokios praturtintos pululanu kapsulės parodė didelį fermento imobilizavimo efektyvumą (85 %), didelį stabilumą ekstremaliose pH terpėse. Taip pat po 5 panaudojimo ciklų skaičiaus fermentai išlaikė 80 % pradinio aktyvumo [100].

Kinijos mokslininkai gliukoamilazių imobilizavimui naudojo polietileniminu bei glutaroaldehidu aktyvuotą k-karagenano struktūrą. Gliukoamilazės buvo kovalentiškai prijungtos prie k-karagenano panaudojant aktyvatorius. Nustatytas didesnis imobilizuotų GLA stabilumas 60–80 °C temperatūrose bei rūgštinėje pH terpėje nei laisvų fermentų. Imobilizuotos GLA gali būti pakartotinai panaudojamos hidrolizės reakcijoje ir išlaikyti pradinį savo aktyvumą (100 %) iki 11 ciklų [52].

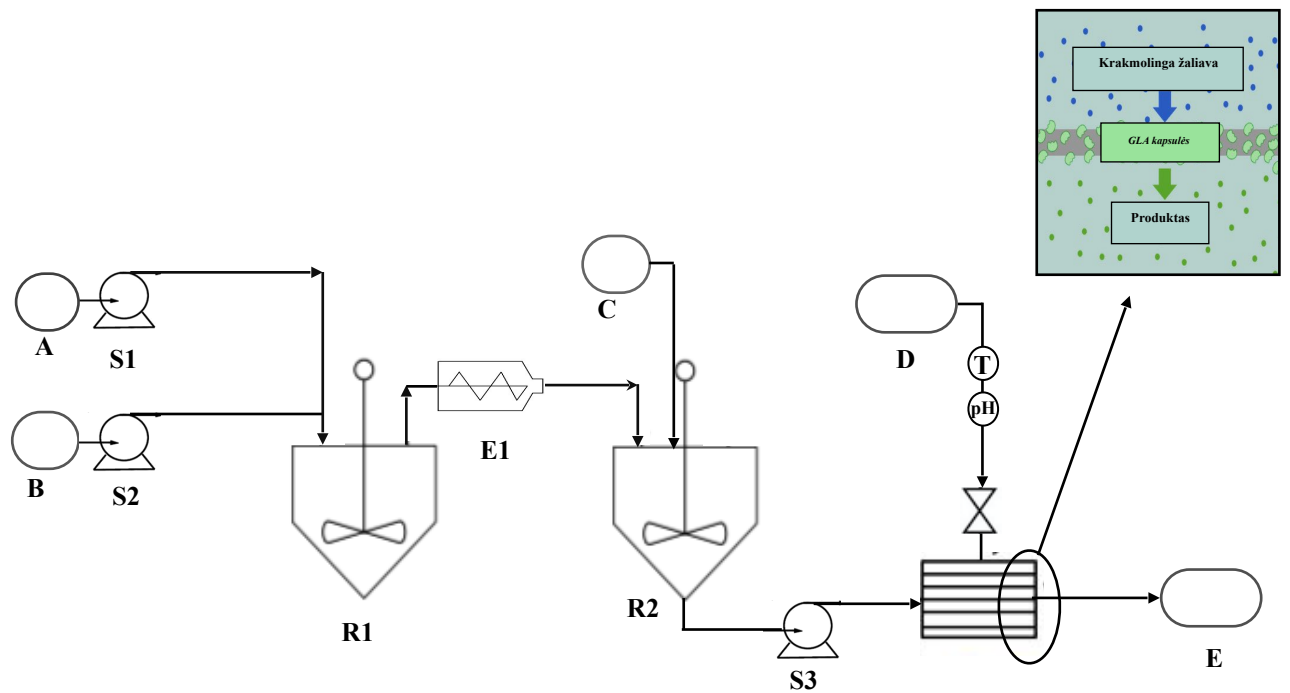
4. Rekomendacijų dalis

Imobilizuotos *Aspergillus niger* rūšies mikroskopinio grybelio gliukoamilazės gali būti pritaikomos krakmolingos žaliavos hidrolizėje. Jei hidrolizės procesas vykdomas nestandartinėmis sąlygomis t. y. aukšta / žema nei optimali fermento temperatūra, rūgštinė / šarminė terpė, rekomenduojama hidrolizei naudoti gliukoamilazės įterptas į alginato struktūras, kai kapsulių sudarymui naudojamas 4 % natrio alginato gelis pagal aukščiau aprašytą procedūrą. Taip imobilizuotos gliukoamilazės pasižymi dideliu stabilumu ir giminingumu substratui. Tačiau norint greito hidrolizės proceso, rekomenduojama naudoti skersiniais ryšiais susiūtus gliukoamilazių agregatus, kurie gauti išsodinant gliukoamilazės 80 % prisotintu amonio sulfato tirpalu ir vykdant skersinių ryšių sudarymą 0,8 % koncentracijos glutaro aldehidu. Išsodinimas vykdomas 24 valandas, kambario temperatūroje, kai turinys yra nuolat maišomas. Jei krakmolo hidrolizės procese norima gauti itin gryną produktą (gliukozės sirupas be dekstrinų, maltozės liekanų) krakmolo hidrolizei rekomenduojama naudoti kovalentiniu būdu imobilizuotas gliukoamilazes, imobilizacijai naudojant 18 AV/ml fermentinį tirpalą, kuriame kapsules išlaikyti 2,5 val.

Kadangi imobilizuotos gliukoamilazės yra kieto būvio kapsulės/agregatus būtų galima pritaikyti periodiniam krakmolingos žaliavos hidrolizės procesui, nes kapsulės/agregatai lengvai pašalinami iš reakcijos mišinio dekantavimo ar centrifugavimo būdais ir panaudojami vėl.

Remiantis atliktais tyrimais, išanalizuota mokslinė literatūra ir kitais šaltiniais nubraižyta gliukoamilazių įterpimo į alginato struktūrą imobilizavimo ir krakmolingos žaliavos hidrolizės procesų principinė aparatūrinė schema (4.1 pav.), ją sudarančių įrenginių sąrašas pateiktas 4.1 lentelėje.

Technologinė schema prasideda kapsulių gamyba. Iš rezervuarų **A** ir **B** natrio alginatas ir gliukoamilazių tirpalas išcentriniais siurbliais **S1** ir **S2** tiekiami į rezervuarą su maišykle **R1**. Čia pagaminamas alginato gelis, kuriame per 30 min imobilizuojamos gliukoamilazės. Ekstruderiu **E1** per siaurą vamzdelį alginato gelis išlašinamas į rezervuarą **R2** su 0,25 M kalcio chlorido tirpalu (iš rezervuaro **C**) nuolat maišant, kad susidariusios kapsulės nesukibtų į gumulėlius. Rekomenduojama kapsules palikti 30 min sutvirtėti. Vėliau praplaunamos distiliuoto vandens srove iki nebebus aptinkama fermento nuoplovose (nustatoma spektrofotometru). Pagamintos kapsulės **S4** siurbliu patalpinamos į membraninio bioreaktoriaus **M1** kasetes, kurios įstatytos į reaktoriaus būgną. Pro puslaidę membraną, pripildytą imobilizuotų gliukoamilazių kapsulių, praleidžiamas krakmolingos žaliavos mišinys **D**, kuris tiekiamas į membraninį bioreaktorių rekomenduotinos 60 °C temperatūros ir pH vertės 4,5. Įvyksta krakmolo hidrolizės reakcija ir kitoje kameros dalyje kaupiasi produktas **E**, kuris toliau gali būti naudojamas maisto pramonėje, bioetanolio gamyboje, mikrobiologinių maistinių terpių gamyboje ir kt.



4.1 pav. Gliukoamilazių imobilizavimo ir krakmolingos žaliavos hidrolizės procesų principinė aparatūrinė schema

4.1 lentelė. Principinės technologinės linijos reagentų ir įrenginių žymėjimas

Žymėjimas	Reagentai
A	Natrio alginato miltelių rezervuaras
B	Gliukoamilazių tirpalo rezervuaras
C	0,25 M kalcio chlorido tirpalas
D	Kraakmolinga žaliava
E	Produktas
Žymėjimas	Įrenginiai
S1, S2, S3	Išcentriniai siurbliai
R1, R2	Rezervuarai su maišykle
E1	Ekstruderis
SK1	Sklandė
T	Temperatūros palaikymo prietaisas
pH	pH terpės palaikymo prietaisas
M1	Membraninis bioreaktorius

Išvados

1. Optimali fermentinės reakcijos temperatūra gliukoamilazei yra 60 °C, reakcijos terpės pH vertė – 4,5.
2. Komercinės gliukoamilazės imobilizuotos trimis metodais: kapsuliuojamas alginato struktūroje, sudarant kovalentinius ryšius, skersiniais ryšiais susiūti gliukoamilazių agregatai. Įvertinta, kad skersiniais ryšiais susiūti agregatai pasižymėjo didžiausiu aktyvumu (84 AV/g). Didžiausiu imobilizacijos efektyvumu (97,9 %) pasižymėjo gliukoamilazės prijungtos kovalentiniais ryšiais.
3. Įterpimo į alginato struktūras metodu imobilizavimas buvo efektyviausias, kai buvo naudotas 4 % natrio alginato gelis. Kovalentinis imobilizavimas efektyviausias naudojant gliukoamilazių 18 AV/ml tirpalą, kapsules išlaikant fermentiniame tirpale 2,5 val., neaktyvuojant kapsulių glutaro aldehidu. Skersiniais ryšiais susiūti GLA agregatai buvo aktyviausi, kai imobilizavimui buvo naudotas 0,8 % glutaro aldehido tirpalas ir 91 AV/ml fermentinis gliukoamilazių tirpalas.
4. Imobilizuotų gliukoamilazių optimali veikimo temperatūra yra 60 °C. Prie 100 °C termostabilumu pasižymėjo gliukoamilazės įterptos 5 % alginato gelyje ir išlaikė 94,4 % fermento aktyvumo bei 25 % glutaro aldehidu kovalentiniu ryšiu prijungtos gliukoamilazės ir išlaikė 69,2 % pradinio aktyvumo. Agregatai nepasižymėjo temperatūrinio stabilumu. Optimali terpės pH, kurioje imobilizuotos gliukoamilazės veikliausios priklauso nuo imobilizacijos būdo: įkapsuliuotos aktyviausios prie pH 5, kovalentiškai prijungtos – prie pH 4,5, o fermento agregatai – prie pH 4. Rūgštinėje pH terpėje (pH 2) gliukoamilazės įterptos 5 % alginato gelyje išlaikė didžiausią 93,8 % pradinį aktyvumą, šarminėje pH terpėje (pH=8) 4 % alginato gelyje įterptos gliukoamilazės ir išlaikė 75,3 % fermentinio aktyvumo. Kovalentiniu būdu imobilizuotos gliukoamilazės pasižymėjo pH stabilumu tik rūgštinėje terpėje (pH 2) ir išlaikė vidutiniškai 88,0 % fermentinio aktyvumo. Agregatai, kurių sudarymui naudojamas 0,5 % ir 2,5 % glutaro aldehidas, pasižymėjo pH stabilumu prie pH 2 ir pH 10 ir išlaikė atitinkamai 81,3 % ir 54,7 % pradinio aktyvumo. Galima teigti, kad didžiausiu termostabilumu pasižymėjo 5 % alginato struktūroje imobilizuotos gliukoamilazės, o pH stabilumu pasižymėjo tiek agregatai, tiek alginatai įterptos gliukoamilazės.
5. Nustatyti kinetiniai imobilizuotų gliukoamilazių parametrai. Didžiausiu pradinio ir maksimaliu reakcijos greičiu ($V_0=4,29 \mu\text{M}/\text{min}$, $V_{\text{max}}=22,9 \mu\text{M}/\text{min}$) pasižymėjo gliukoamilazių agregatai. Artima laisvo fermento Michaelio konstantos ($K_M=0,08 \mu\text{M}$) vertė nustatyta kovalentiškai imobilizuotoms gliukoamilazėms, kurių K_M vertė lygi $0,09 \mu\text{M}$. Taip pat maža K_M vertė nustatyta gliukoamilazėms įkapsuliuotoms alginatai, kurių K_M vertė $0,15 \mu\text{M}$.
6. Alginato gelyje įterptų gliukoamilazių aktyvumas per 30 dienų sumažėjo 15 %, lyginant su pradinio – laisvųjų gliukoamilazių aktyvumu. Imobilizuotų gliukoamilazių kovalentiniu būdu, kurios buvo neaktyvuotos glutaro aldehido tirpale, aktyvumas sumažėjo 69 %, o aktyvuotų gliukoamilazių 10 % glutaro aldehido tirpale, aktyvumas sumažėjo 40 % 30 dienų eigoje, lyginant su pradinio laisvųjų fermentų aktyvumu. Nors skersiniais ryšiais susiūti agregatai

pasižymėjo didžiausiu aktyvumu (84 AV/g), tačiau vertinant imobilizuoto fermento stabilumą per 30 dienų, didžiausią aktyvumą išlaikė kapsulės su įterptomis gliukoamilazėmis (85 % fermentinio aktyvumo)

7. Krakmolingos žaliavos (kukurūzų miltai) hidrolizės metu, naudojant alginato struktūroje įterptas gliukoamilazes, redukuojančių sacharidų koncentracija nusistovėjo po 20 minučių, tuo tarpu naudojant skersiniais ryšiais sujungtus agregatus redukuojančių sacharidų koncentracija nusistovėjo po 15 minučių, o naudojant kovalentiškai prijungtis fermentus – po 40 minučių. Po 10 ciklų kapsulės su įterptomis gliukoamilazėmis išlaikė 49,8 % pradinio aktyvumo, agregatai - 3,3 % pradinio aktyvumo, o kovalentiškai imobilizuotos - 23 % pradinio aktyvumo.

Literatūros sąrašas

1. Kulkarni, N. S., & Deshpande, M. S. (2007). *General enzymology*. Himalaya Publishing House
2. Koshland Jr, D. E. (1995). The key–lock theory and the induced fit theory. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(23–24), 2375-2378.
3. Čižeikienė, D., Prakopavičiūtė, L., Paškevičius, A., & Raudonienė, V. (2018). Investigation of xylanase properties and possibilities of immobilization using sodium alginate. *Žemės ūkio mokslai*, 25(3).
4. Cantone, S., Ferrario, V., Corici, L., Ebert, C., Fattor, D., Spizzo, P., & Gardossi, L. (2013). Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6262-6276.
5. Sarrouh, B., Santos, T. M., Miyoshi, A., Dias, R., & Azevedo, V. (2012). Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *J. Bioprocess. Biotech. S*, 4, 002.
6. DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A. J., & Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6437-6474.
7. <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/2/1/1.html>
8. Singh, P., & Kumari, P. (2016). Isolation and characterization of amylase producing *Bacillus* spp. from selected soil sample. *International Journal of Research in Biosciences*, 5(2), 24-29.
9. Fahimeh, M., Bahador, N., & Baserisalehi, M. (2013). Isolation, characterization and identification of amylase producing halothermophilic isolates from Howz Soltan Lake, Iran. *Afr J Microbiol Res*, 7(36), 4483-90.
10. Malhotra, R., Noorwez, S. M., & Satyanarayana, T. (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*, 31(5), 378-384.
11. Abd-Elhalem, B. T., El-Sawy, M., Gamal, R. F., & Abou-Taleb, K. A. (2015). Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 193-202.
12. Krishnakumar, S., Bai, V., & Premkumar, J. (2015). Production of alpha amylase by salt-Tolerant Actinomycete *Streptomyces* sp.–SBU3 isolated from marine sponge.
13. Syed, D. G., Agasar, D., & Pandey, A. (2009). Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(2), 189-194.
14. Chung, Y. C., Kobayashi, T., Kanai, H., Akiba, T., & Kudo, T. (1995). Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(4), 1502-1506.
15. Shaw, J. F., Lin, F. P., Chen, S. C., & Chen, H. C. (1995). Purification and properties of an extracellular α -amylase from *Thermus* sp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 36.

16. Kathiresan, K., & Manivannan, S. (2006). Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *African journal of Biotechnology*, 5(10).
17. Erdal, S. E. R. K. A. N., & Taskin, M. E. S. U. T. (2010). Production of α -amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(3), 5342-5350.
18. Vardhini, R. S., Naik, B. R., Neelima, M., & Ramesh, B. (2013). Screening and production of α -amylase from *Aspergillus niger* using zero, value material for solid state fermentation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 55-60.
19. "Effects of pH (Introduction to Enzymes)". *worthington-biochem.com*. Retrieved 17 May 2015.
20. Thoma, J. A., Spradlin, J. E., & Dygert, S. (1971). 6 Plant and animal amylases. In *The enzymes* (Vol. 5, pp. 115-189). Academic Press.
21. Paul, D. I. P. A. K. (2016). Microorganisms and α -amylase: a concise review. *Inov J Life Sci*, 4, 1-5.
22. Čižeikienė D., Mickevičius V. Enzimologijos laboratoriniai darbai. *Leidykla "Technologija"*, 2017. ISBN 978-609-02-1418-3. doi:10.5755/e01.9786090214176
23. Nielsen, J.E.; Borchert, T.V. (2000). Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim Biophys Acta* 1543, 253-274.
24. Slivinski, C. T., Machado, A. V. L., Iulek, J., Ayub, R. A., & Almeida, M. M. D. (2011). Biochemical characterisation of a glucoamylase from *Aspergillus niger* produced by solid-state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(3), 559-568.
25. Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38, 1599 - 1616.
26. Simonis, B., Hölzel, C., & Stark, U. (2014). Glucoamylase: a current allergen in the baking industry. *Allergo Journal International*, 23(8), 269–273. doi:10.1007/s40629-014-0034-0
27. Ahlawat, S.; Dhiman, S.S.; Battan, B.; Mandhan, R.P.; Sharma, J. (2009). Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry* 44, 521-526.
28. van der Maarel, M.J.; van der Veen, B.; Uitdehaag, J.C.; Leemhuis, H.; Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J Biotechnol* 94, 137-155.
29. Hmidet, N.; El-Hadj Ali, N.; Haddar, A.; Kanoun, S.; Alya, S.; Nasri, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal* 47, 71-79.
30. Mitidieri, S.; Souza Martinelli, A.H.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresour Technol* 97, 1217-1224

31. Berenguer–Murcia, Garcia–Galan, C., Á., Fernandez–Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(16), 2885-2904.
32. Christena, L., Datta, S., R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9.
33. Shuler, M. L. (1992). Bioprocess engineering. *Prentice-Hall*, 412-420.
34. MOHAMAD, N.R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, biotechnological equipment* [interaktyvus]. 2015, 29(2), 205-220 [žiūrėta 2019-03-25]. ISSN 1310-2818. Prieiga per: PubMed.
35. Shen Q, Yang R, Hua X, Ye F, Zhang W, Zhao W. Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization. *Process Biochem*. 2011;46:1565–1571.
36. Spahn C, Minter SD. Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent Pat Eng*. 2008;2:195–200
37. Rosales-Hernández, M., Kispert, L., Torres-Ramírez, E., Ramírez-Rosales, D., Zamorano-Ulloa, R., & Trujillo-Ferrara, J. (2007). Electron paramagnetic resonance analyses of biotransformation reactions with cytochrome P-450 immobilized on mesoporous molecular sieves. *Biotechnology letters*, 29(6), 919-924.
38. Karagulyan, H. K., Gasparyan, V. K., & Decker, S. R. (2007). Immobilization of fungal β -glucosidase on silica gel and kaolin carriers. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 159-167). Humana Press.
39. Brígida AIS, Calado VMA, Gonçalves LRB, Coelho MAZ. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. *Carbohydr Polym*. 2010;79:832–838. [[Google Scholar](#)] [[Ref list](#)]
40. Mitchell S, Ramírez JP. Mesoporous zeolites as enzyme carriers: synthesis, characterization, and application in biocatalysis. *Catal Today*. 2011;168:28–37. [[Google Scholar](#)] [[Ref list](#)]
41. Huang XJ, Chen PC, Huang F, Ou Y, Chen MR, Xu ZK. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *J Mol Catal B-Enzym*. 2011;70:95–100. [[Google Scholar](#)] [[Ref list](#)]
42. Cunha, A. G., Fernández-Lorente, G., Bevilaqua, J. V., Destain, J., Paiva, L. M., Freire, D. M., ... & Guisán, J. M. (2007). Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase—a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 169-176). Humana Press.
43. Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157-163.
44. Novick, S. J., & Rozzell, J. D. (2005). Immobilization of enzymes by covalent attachment. In *Microbial enzymes and biotransformations* (pp. 247-271). Humana Press.
45. Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of chemical biology*, 6(4), 185-205.

46. Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *Rsc Advances*, 4(4), 1583-1600.
47. Mateo, C., Palomo, J. M., Van Langen, L. M., Van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (2004). A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. *Biotechnology and bioengineering*, 86(3), 273-276.
48. Ayhan, H., Ayhan, F., & Gülsu, A. (2012). Highly biocompatible enzyme aggregates crosslinked by L-lysine. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*, 37(1), 14-20.
49. Zhen, Q., Wang, M., Qi, W., Su, R., & He, Z. (2013). Preparation of β -mannanase CLEAs using macromolecular cross-linkers. *Catalysis Science & Technology*, 3(8), 1937-1941.
50. Liu, Y., Li, Y., Li, X. M., & He, T. (2013). Kinetics of (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir*, 29(49), 15275-15282.
51. Naučienė, Z., Mildažienė, V., Vieželiene, D., Žūkienė, R (2010). Biochemijos laboratoriniai darbai. *Kaunas : Vytauto Didžiojo universiteto leidykla*. ISBN9789955125761, prieiga per: <https://hdl.handle.net/20.500.12259/287>
52. Hassan, M.E., Yang, Q. & Xiao, Z. Covalent immobilization of glucoamylase enzyme onto chemically activated surface of κ -carrageenan. *Bull Natl Res Cent* 43, 102 (2019). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0148-0>
53. Varavinit, S., Chaokasem, N. & Shobngob, S. Covalent immobilization of a glucoamylase to bagasse dialdehyde cellulose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 721–725 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1012984802624>
54. Li, L. X., Yang, Y., Zhu, F., & Wu, X. Y. (2016, August). Immobilization of glucoamylase on stimuli-sensitive macroporous semi-interpenetrating stimuli-sensitive hydrogel carriers. In *2nd Annual International Conference on Energy, Environmental & Sustainable Ecosystem Development (EESED 2016)*. Atlantis Press.
55. Amirbandeh, M., & Taheri-Kafrani, A. (2016). Immobilization of glucoamylase on triazine-functionalized Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite: Improved stability and reusability. *International journal of biological macromolecules*, 93, 1183-1191.
56. Konwarh R, Kalita D, Mahanta C, Mandal M, Karak N. Magnetically recyclable, antimicrobial, and catalytically enhanced polymer-assisted “green” nanosystem-immobilized *Aspergillus niger* amyloglucosidase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 87(6):1983-92; 2010.
57. Ma Y-X, Li Y-F, Zhao G-H, Yang L-Q, Wang J-Z, Shan X, Yan X. Preparation and characterization of graphite nanosheets decorated with Fe₃O₄ nanoparticles used in the immobilization of glucoamylase. *Carbon* 50(8):2976-2986; 2012.
58. Syed, F., Ali, K., Asad, M. J., Fraz, M. G., Khan, Z., Imran, M., ... & Ahmad, A. (2016). Preparation and characterization of a green nano-support for the covalent immobilization of

- glucoamylase from *Neurospora sitophila*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 309-317.
59. Agustian, J., & Hermida, L. (2019, April). Capability of immobilised glucoamylase on mesostructured cellular foam silica to hydrolyse tapioca starch. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 509, No. 1, p. 012058). IOP Publishing.
 60. Torres, R., Pessela, B. C., Mateo, C., Ortiz, C., Fuentes, M., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2004). Reversible immobilization of glucoamylase by ionic adsorption on sephabeads coated with polyethyleneimine. *Biotechnology progress*, 20(4), 1297-1300.
 61. Li, X. D., Wu, J., Jia, D. C., Wan, Y. H., Yang, N., & Qiao, M. (2016). Preparation of cross-linked glucoamylase aggregates immobilization by using dextrin and xanthan gum as protecting agents. *Catalysts*, 6(6), 77.
 62. Abidi, M., Iram, A., Furkan, M., & Naeem, A. (2017). Secondary structural alterations in glucoamylase as an influence of protein aggregation. *International journal of biological macromolecules*, 98, 459-468.
 63. Salgaonkar, M., Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2018). Combi-metal organic framework (Combi-MOF) of α -amylase and glucoamylase for one pot starch hydrolysis. *International journal of biological macromolecules*, 113, 464-475.
 64. Amirbandeh, M., Taheri-Kafrani, A., Soozanipour, A., & Gaillard, C. (2017). Triazine-functionalized chitosan-encapsulated superparamagnetic nanoparticles as reusable and robust nanocarrier for glucoamylase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, 127, 119-127.
 65. Husain, Q. (2017). Nanomaterials as novel supports for the immobilization of amylolytic enzymes and their applications: a review. *Biocatalysis*, 3(1), 37-53
 66. Rajagopalan G. and C. Krishnan. 2008. Immobilization of maltooligosaccharide forming α -amylase from *Bacillus subtilis* KCC103: properties and application in starch hydrolysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83: 1511-1517.
 67. Li, X. D., Wu, J., Jia, D. C., Wan, Y. H., Yang, N., & Qiao, M. (2016). Preparation of cross-linked glucoamylase aggregates immobilization by using dextrin and xanthan gum as protecting agents. *Catalysts*, 6(6), 77.
 68. Nadar, S. S., Muley, A. B., Ladole, M. R., & Joshi, P. U. (2016). Macromolecular cross-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of α -amylase. *International journal of biological macromolecules*, 84, 69-78.
 69. Li, X., Yu, Z., Bian, Z., Xu, J., Zhang, L., & Qiao, M. (2018). Physicochemical Characterization of α -Amylase as Crosslinked Enzyme Aggregates. *Catalysts*, 8(8), 299.
 70. Talekar, S., Desai, S., Pillai, M., Nagavekar, N., Ambarkar, S., Surnis, S., ... & Mulla, M. (2013). Carrier free co-immobilization of glucoamylase and pullulanase as combi-cross linked enzyme aggregates (combi-CLEAs). *RSC Advances*, 3(7), 2265-2271.
 71. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

72. Abe, A., Horii, S., & Kameoka, K. (1979). Application of enzymatic analysis with glucoamylase, pronase and cellulase to various feeds for cattle. *Journal of Animal Science*, 48(6), 1483-1490.
73. Dhanya, G., Nampoothiri, K. M., Swetha, S., & Ashok, P. (2009). Immobilized bacterial α -amylase for effective hydrolysis of raw and soluble starch. *Food Research International*, 42(4), 436-442.
74. Urbanova, M., Pancoska, P., & Keiderling, T. A. (1993). Spectroscopic study of the temperature-dependent conformation of glucoamylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1203(2), 290-294.
75. "Effects of pH (Introduction to Enzymes)". *worthington-biochem.com*. Retrieved 17 May 2015.
76. Amylase, Alpha, I.U.B.: 3.2.1.11, 4- α -D-Glucan glucohydrolase"
77. Bilderback, D. E. (1973). A simple method to differentiate between α - and β -amylase. *Plant physiology*, 51(3), 594.
78. dos Santos, L. L. (2017). Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties.
79. Dey G., B. Singh and R. Banerjee. 2003. Immobilization of α - amylase Produced by *Bacillus circulans* GRS 313. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 46(2):167-176.
80. Konsoula Z. and M.L. Kyriakides. 2006. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* 41: 343-349.
81. Talekar S., V. Ghodake, A. Kate, N. Samant, C. Kumar and S. Gadagkar. 2010. Preparation and characterization of cross- linked enzyme aggregates of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 4:4760-4765.
82. Prakash O. and Jaiswal N. 2011. Immobilization of a Thermostable Amylase on Agarose and Agar Matrices and its Application in Starch Stain Removal. *World Appl. Sci. J.* 13 (3): 572-577.
83. Abdel-Naby MA. Immobilization of *Aspergillus niger* NRC 107 xylanase and -xylosidase, and properties of the immobilized enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* 1993;38:69–71.
84. Gouda MK, Abdel-Naby MA. Catalytic properties of the immobilized *Aspergillus tamaris* xylanase. *Microbiol Res* 2002;157:275–81.
85. Dalal S, Sharma A, Gupta MN. A multipurpose immobilized biocatalyst with pectinase, xylanase and cellulase activities. *Chem Cen J* 2007;1:16–20.
86. Ai Z, Jiang Z, Li L, Deng W, Kusakabe I, Li H. Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production. *Process Biochem* 2005;40:2707–14.
87. Kumar, P., & Satyanarayana, T. (2007). Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginate-entrapped *Thermomucor indicae-seudaticae* using statistical methods. *Bioresource technology*, 98(6), 1252-1259.
88. Vorlop KD, Klein J (1983) New developments in the field of cell immobilization - Formation of biocatalysts by ionotropic gelation. 3rd Rotenburg symposium - Enzyme technology. Springer, New York Wien (in press)

89. Ali, G., Dulong, V., Gasmi, S. N., Rihouey, C., Picton, L., & Le Cerf, D. (2015). Covalent immobilization of pullulanase on alginate and study of its hydrolysis of pullulan. *Biotechnology Progress*, 31(4), 883–889. doi:10.1002/btpr.2093
90. Zucca, P., & Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(9), 14139–14194. doi:10.3390/molecules190914139
91. Eldin, M. M., Seuror, E. I., Nasr, M. A., & Tieama, H. A. (2011). Affinity covalent immobilization of glucoamylase onto ρ -benzoquinone-activated alginate beads: II. Enzyme immobilization and characterization. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164(1), 45-57.
92. Tardioli, P. W., Vieira, M. F., Vieira, A. M. S., Zanin, G. M., Betancor, L., Mateo, C., ... & Guisán, J. M. (2011). Immobilization–stabilization of glucoamylase: Chemical modification of the enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports. *Process biochemistry*, 46(1), 409-412.
93. Freire, D. G., & Sant'Anna Jr, G. L. (1990). Characterization of a glucoamylase immobilized on chitin. *Biomass*, 23(1), 71-78.
94. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, biotechnological equipment*, 29(2), 205–220. doi: 10.1080/13102818.2015.1008192
95. Aytar, B.S.; Bakir, U. Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochem.* **2008**, 43, 125–131.
96. Wang F, Guo C, Liu HZ, Liu CZ (2007) Reversible immobilization of glucoamylase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 48: 1–7.
97. Wang, F.; Guo, C.; Liu, H.Z.; Liu, C.Z. Reversible immobilization of glucoamylase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2007**, 48, 1–7. [CrossRef]
98. Kumari, A.; Kayastha, A.M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, 69, 8–14.
99. Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2016). Magnetic macromolecular cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of glucoamylase. *Enzyme and microbial technology*, 83, 78-87.
100. Jadhav, S. B., & Singhal, R. S. (2014). Pullulan-complexed α -amylase and glucosidase in alginate beads: enhanced entrapment and stability. *Carbohydrate polymers*, 105, 49-56.
101. Rugh, S., Nielsen, T., & Poulsen, P. B. (1979). Application possibilities of a novel immobilized glucoamylase. *Starch-Stärke*, 31(10), 333-337