

PECTINEX ENZIMKÉSZÍTMÉNY TRANSZGLIKOZILÁZ AKTIVITÁSA

TRANSGLYCOSYLATION OF PECTINEX ENZYME PREPARATION

STYEVKÓ CSILLA II. ÉVFOLYAM (sty.csi@gmail.com)
Budapesti Corvinus Egyetem, Sör- és Szeszipari Tanszék

Konzulensek: Styevkó Gabriella, PhD hallgató
Dr. Habil. Nguyen Duc Quang egyetemi docens

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt időszakban a szénhidrátokkal kapcsolatos kutatások számottevő fejlődése volt megfigyelhető. Ennek oka, hogy ezek a szénhidrátok fontos szerepet töltenek be a táplálkozásban illetve az élelmiszer-, gyógyszer-, bútór-, papír- és a kozmetikaiparban, valamint az üzemanyag termelésben is. Az oligoszacharidok (szénhidrátok egyik csoportja) kémiai olyan glikozidok, amelyek 3-10 cukor egységből épülnek fel. Számos biológiai folyamatban részt vesznek, például gyulladásos folyamatokban, bakteriális és vírusos fertőzésekben, sejt-sejt kommunikációban és immunválasz reakciókban stb. (Shetty *et al.*, 2006). Továbbá léteznek olyan oligoszacharidok, amelyek fizikai-kémiai illetve fiziológiai tulajdonságaik révén funkcionális élelmiszer összetevőként is hasznosíthatók. Egyes oligoszacharidokat az emésztőrendszer enzimeit nem képesek lebontani így diabetikus vagy alacsony kalóriatartalmú termékek gyártására is felhasználhatók (Mussatto&Mancilha, 2007). Emellett prebiotikus hatásúak is lehetnek, azaz kedvezően befolyásolhatják a vastagbélben élő jótékony hatású mikroorganizmusok szaporodását illetve aktivitását. E szénhidrátok szintézise kémiai és enzimikus módszerrel is lehetséges. Az enzimikus módszerek előnye, hogy a biokatalizátorok régió- és sztereospecifitással rendelkeznek illetve a széleskörű reakciókörülmények között alkalmazható (Perugino *et al.*, 2004). Ezzel szemben a kémiai előállítás bonyolult és költséges folyamat, valamint a léptéknövelés megoldása is nehéz. A felsorolt indokok miatt az elmúlt években az enzimikus szintézis vált a legtöbb kutató által választott módszerré. Jelenleg a kereskedelemben kapható prebiotikus oligoszacharidokat is enzimek transzglykóziláz aktivitásának felhasználásával állítják elő (Crittenden&Playne, 1996).

A TDK kutatómunkámban célul tűztem ki a kereskedelemben kapható enzimmennyiségű (Pectinex ultra) transzglykóziláz aktivitásának vizsgálatát az oligoszacharidok szintézisére.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Alkalmazott enzimmennyiség: Pectinex Ultra SP-L (Sigma-aldrich)

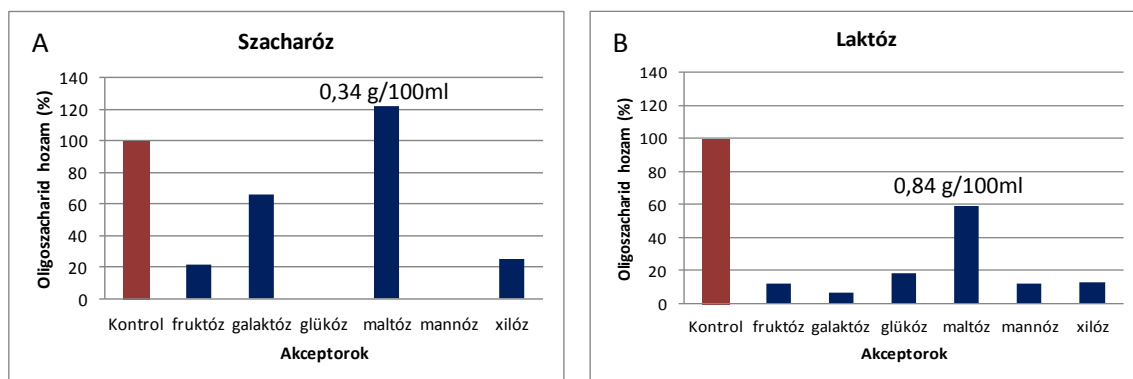
Biokonverzió: Az oligoszacharid szintézist 5,5-ös pH-n, 60 °C-on 1 U/ml enzimmennyiséggel hajtottam végre.

Felhasznált szénhidrátok: glükóz, fruktóz, maltóz, szacharóz, laktóz, mannóz, xilóz, galaktóz (Sigma-aldrich)

Szénhidrátok mennyiségi meghatározása: HPLC-s technikával

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉSE

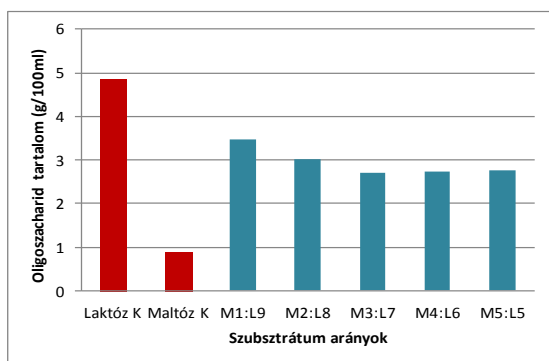
A Pectinex transzferáz aktivitása: Kísérleti munkám első lépéseként fontosnak tartottam a transzferáz aktivitás vizsgálatát különböző donor és akceptor jelentlében (maltóz, fruktóz, glükóz, mannóz, xilóz, galaktóz, szacharóz és laktóz). A reakciót 10 (w/v) % szénhidrátkoncentrációval indítottam, amelyben a donor és akceptor aránya 1:1 volt. A biokonverzió nyomonkövetésére különböző időpontban vettem mintát és analizáltam. A biokonverzió 4. napján kapott eredményeket az 1. ábrán mutatom be.



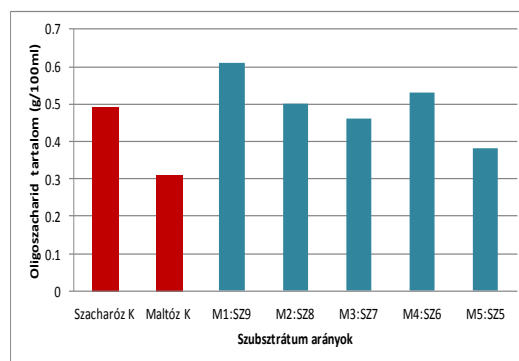
1. ábra: Különböző szénhidrátok hatása a Pectinex ultra transzfruktozil (A) és transzgalaktozil (B) aktivitására

Látható, hogy mind a maltóz:szacharóz mind a maltóz:laktóz kombinációnál mértem kiemelkedő oligoszacharid (DP3) hozamot. Ez az érték laktóz-maltóz esetében 59 % (0,84 g/100ml), szacharóz-maltóz esetében pedig 122 % (0,84 g/100ml) volt. Aslan és Tanriseven (2005, 2007) publikáltak, hogy Pectinex rendelkezik transzfruktozil és transzgalaktozil aktivitással a szukróz, kesztóz, nyisztóz vagy raffinóz közegben, de nem mutatható a turanóz, cellobióz, melibióz, leukróz, metil- α -D-glükopiranóz esetében. Szacharóz donor esetén a glükóz és mannóz nem detektáltam az oligoszacharidok képzését. Ismert tény, hogy a frukto-oligoszacharidok előállításánál a melléktermékként megjelenő glükóz gátolja transzfer reakciót (Yun *et al.*, 1990). Ez adhat megvárázatot az előbb tapasztalt jelenségre.

Optimális szubsztrátumarány meghatározása: A fent említett eredmények alapján a továbbiakban a két szubsztrátum (szacharóz és laktóz) és a maltóz különböző arányú kombinációit vizsgáltam. A kapott eredményeket a 2. és a 3. ábra mutatja.



2. ábra: Oligoszacharid tartalom alakulása maltóz:laktóz szubsztrátum különböző arányai esetén



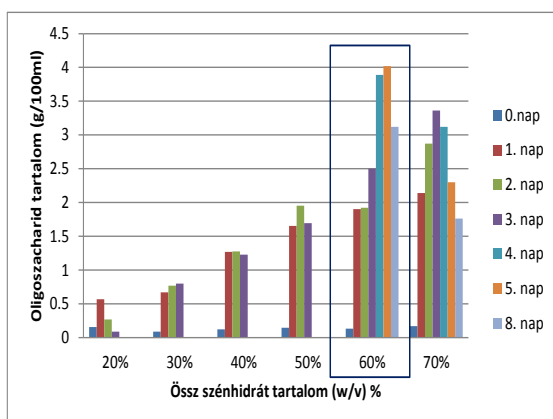
3. ábra: Oligoszacharid tartalom alakulása maltóz:szacharóz szubsztrátum különböző arányai esetén

Mind a szacharóz mind a laktóz esetében a 1:9 arány bizonyult a legjobbnak. Ezen arány alkalmazásával laktóz esetében 3,46g/100ml oligoszacharid koncentrációt értem el. Kiemelendő, hogy a maltóz-szacharóz 1:9 arányú összetételével jelentős növekedést értem el a kapott oligoszacharid tartalom érték tekintetében a kontrol mintákhoz képest. Szacharóz kontrol szubsztrátum alkalmazásával 0,49g/100ml, míg maltóz-szacharóz 1:9 arányú keverékével 0,61g/100ml oligoszacharid tartalmat értem el a biokonverzió 24. órájában. Az elért eredmények alapján megállapítható, hogy a maltóz indukálja a Pectinex ultra transzfruktozil aktivitását.

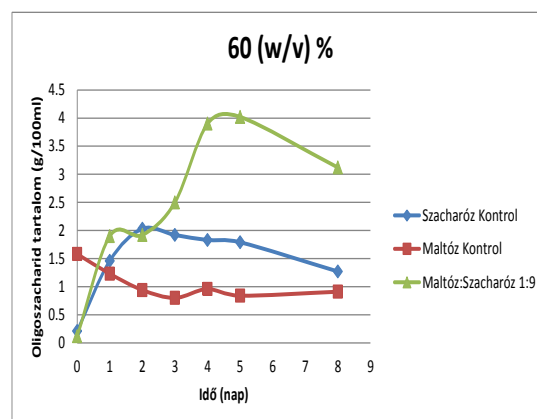
Szubsztrátum koncentráció hatása: Kutatómunkám során az optimális szubsztrátum koncentráció meghatározásához 20-70 (w/v) % szénhidráttartalom tartományban vizsgáltam az oligoszacharid szintézist. Ennek megvalósítására a fent említett eredmények alapján a maltóz-szacharóz 1:9 arányú keverékét használtam fel.

A 4. ábrán jól látható, hogy a Pectinex ultra fruktozil-transzferáz enzimének optimális szubsztrátum koncentrációja 60 (w/v) %. Ez esetben 4,02g/100ml DP3 tartalmat értem el a biokonverzió 5. napján. Az eredményem megegyezik a Hang és Woodams által 1995-ben publikált eredményekkel. Azt írták, hogy az *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger* és *Aureobasidium pullans* eredetű fruktozil-transzferáz enzimek optimális szubsztrátum koncentrációja szintén 60 (w/v)% körüli volt. Általában karbohidrolázoknál a nagy szubsztrátum koncentráció nagyobb transzglikozil aktivitást eredményez (Crittenden&Playne, 1996).

Az 5. ábrán az oligoszacharid tartalom változása látható a maltóz-szacharóz 1:9 arányú keveréke és a kontrol minták esetében. Megállapítható, hogy maltóz hozzáadásával hozzávetőlegesen kétszeres DP3-tartalmat értem el a szacharóz kontrolhoz képest. Elért eredményeim alapján valószínűsíthető, hogy a szacharóz maltózzal való kombinálása során a transzfruktozil reakcióban a szacharóz donor, a maltóz pedig akceptorként vesz részt, ez által szintetizálva új oligoszacharidot. Ez azt jelenti, hogy az enzim a szacharóz szubsztrátum fruktóz részét a maltóz molekulára szállítja. Canedo és munkatársai (1998) *Bacillus subtilis* eredetű levánszukráz enzim segítségével állítottak elő szacharóz és maltóz szubsztrátumokból új oligoszacharidot (maltozil-fruktózt). Az ő esetükben 1:10 volt a maltóz-szacharóz optimális aránya. A 24 (v/w) % szubsztrátum tartalom mellett 16,3 (v/w) % oligoszacharid hozamot étek el.



4. ábra: Összes szénhidráttartalom hatása az oligoszacharid szintézisre 1:9 arányú maltóz:szacharóz szubsztrátum esetén



5. ábra: Oligoszacharid tartalom alakulása 60 (w/v) % összes szénhidráttartalom esetén

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Az utóbbi években az oligoszaccharidok nagy érdeklődésre tettek szert mind tudományos, mind ipari szempontból a kedvező biológiai tulajdonságaiknak köszönhetően pl. a prebiotikumok gyártásában, gyulladás, vírus- és bakteriális fertőzések megértésében, sejtmembránok sejt-sejt felismerő funkciójában és az immunválaszban is. Ezen oligoszaccharidok előállíthatók glikoziltranszferáz aktivitással rendelkező enzimek segítségével. A különböző donor és akceptor szubsztrátum esetén megállapítottam, hogy a laktóz és szacharóz kombinálva a maltózzal adta a legjobb eredményt. Optimális szubsztrátum arány (mind a maltóz:szacharóz, mind a maltóz:szacharóz) 1:9 volt. Meghatároztam a glikoziltranszferáz aktivitásra gyakorolt szubsztrátum koncentráció hatását és meg állapítottam, hogy maltóz:szacharóz esetén 60 (w/v) % szénhidráttartalom mellett kiemelkedő oligoszacharid (DP3) hozamot értem el, amely 4g/100ml volt. Továbbá, a Pectinex ultra enzimekészítménynél nemcsak szacharóz vagy laktóz lehet az akceptor, hanem maltóz is. E aktivitásnak köszönhetően szintetizálható a fruktozil-maltóz vagy galatozil-maltóz, amely újszerű és prebiotikumként alkalmazható. Elért eredményeim ígéretesnek tűnnek és utat nyithatják az új oligoszacharid szintézis technológia kidolgozására.

*

Kutatómunkám TÁMOP-4.2.1./B-09/1-KMR-2010-0005 és TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023, valamint TECH_09-A3-2009-0194 projektek támogatják

5. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Aslan Y., Tanriseven A. (2007) Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce galactooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 45:73-77
- Crittenden R. G., Playne M. J. (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* 7:353-361
- Ghazi I., Fernandez-Arrojo L., Garcia-Arellano H., Ferrer M., Ballesteros A., Plou J. F. (2007) Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Biotechnology* 128:204-211
- Hang Y. D., Woodams E. E. (1995) Optimization of Enzymatic Production of Fructo-oligosaccharides from Sucrose. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 29:578-580
- Mussatto S. I., Mancilha I. M. (2007) Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers* 68:587-597
- Perugino G., Trincone A., Rossi M., Moracci M. (2004) Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends in Biotechnology* 22:31-37
- Shetty K., Paliyath G., Pometto A. L., Levin R. E. (2006) Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides: Progress and Recent Trends. *Functional Foods and Biotechnology* ISBN-10:1-4200-0772-6; 473-500
- Tanriseven A., Aslan Y. (2005) Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* 36:550-554
- Yun J. W., Jung H., Oh J. W., Lee J. H. (1990) Semibatch production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells *Aerobasidium pullulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24:299-308
- Hang Y. D., Woodams E. E. (1995) Optimization of Enzymatic Production of Fructo-oligosaccharides from Sucrose. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 29:578-580