



Oznaczanie aktywności dekstranazy

Aneta Antczak-Chrobot, Maciej Wojtczak



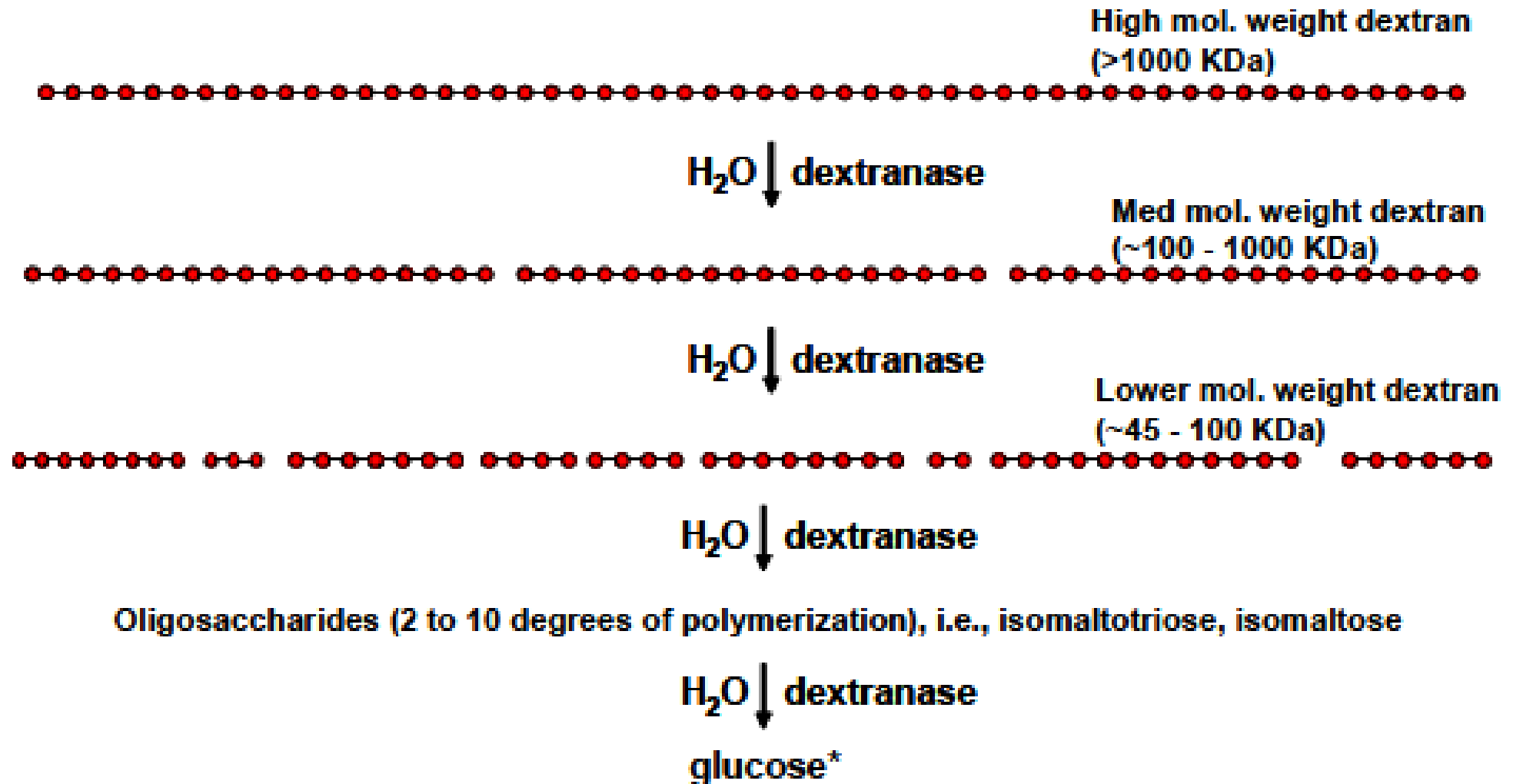


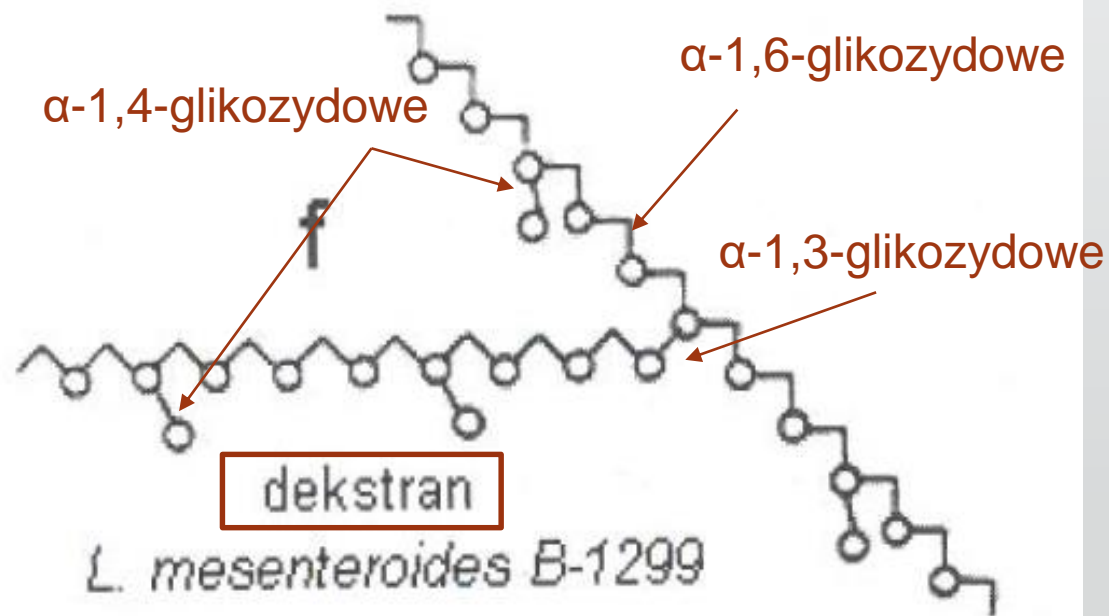
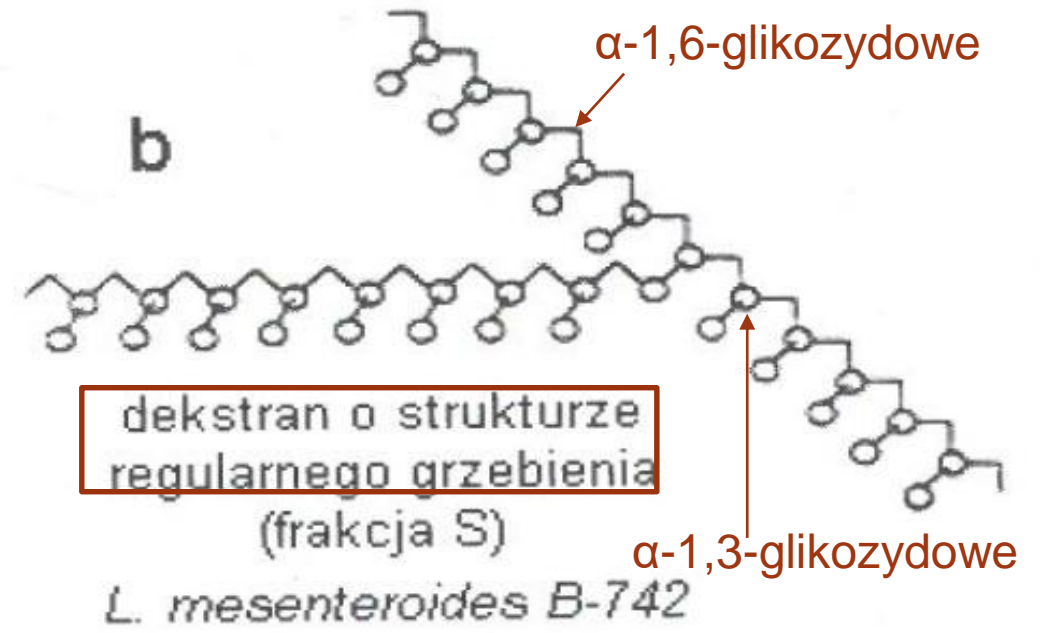
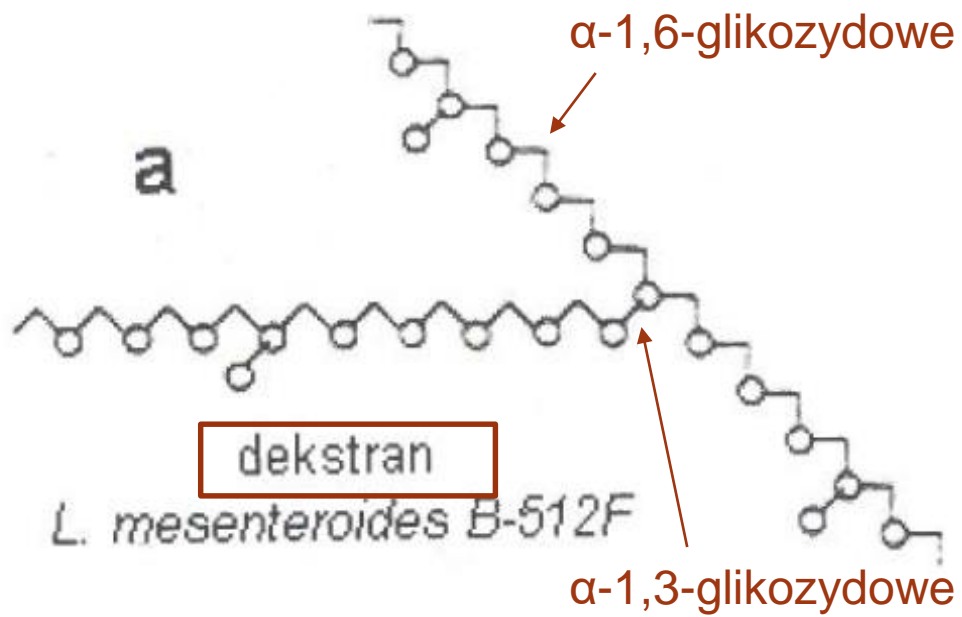
Dekstranaza

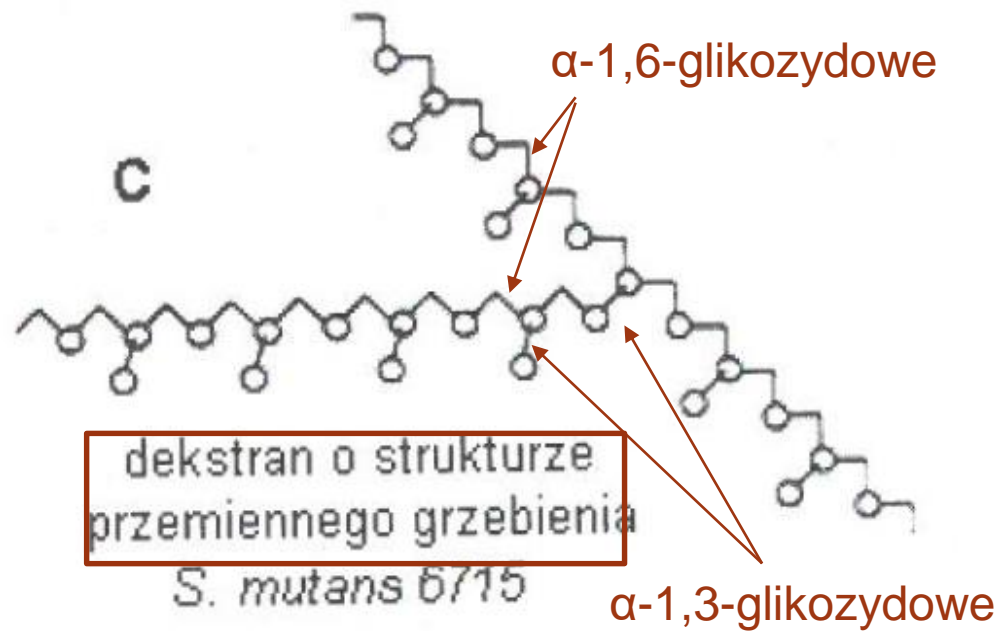
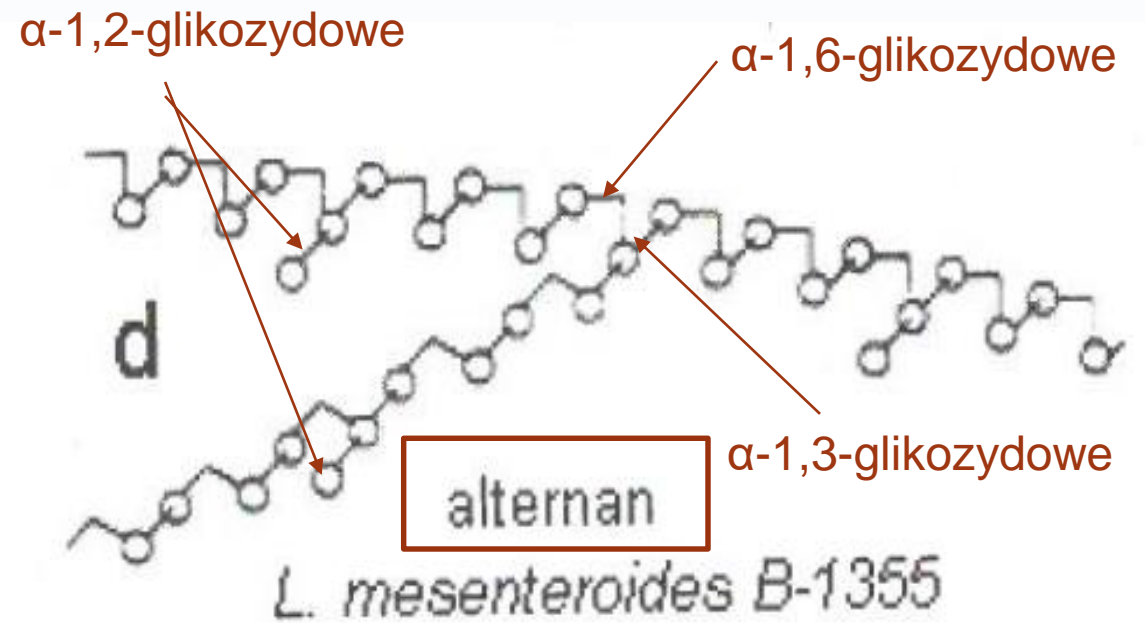
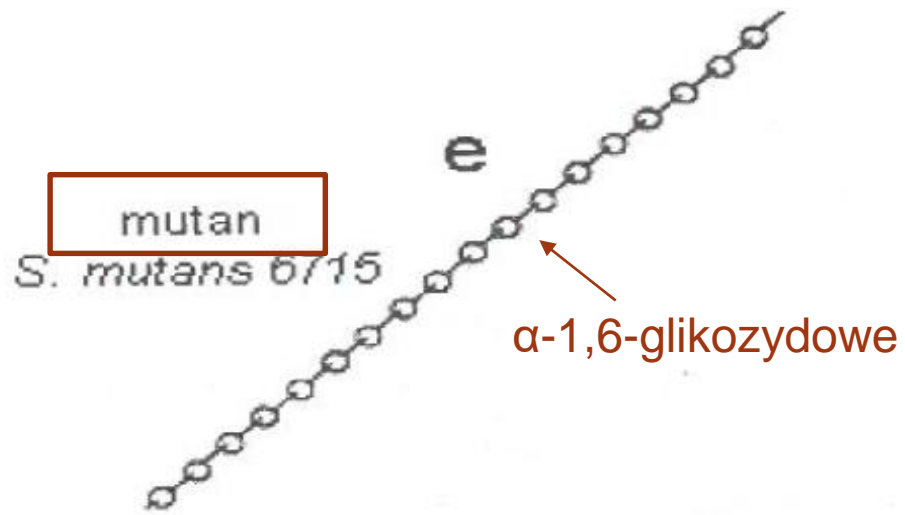
- Dekstranaza
 - **α -D-1,6-glukan-6-glukanohydrolaza (EC 3.2.1.11)**
- Dekstranaza hydrolizuje wiązania **1,6-glikozydowe** w losowo wybranych miejscach, a w efekcie działalności enzymu następuje stopniowy **spadek średniej masy cząsteczkowej dekstranu**



Hydroliza dekstranu

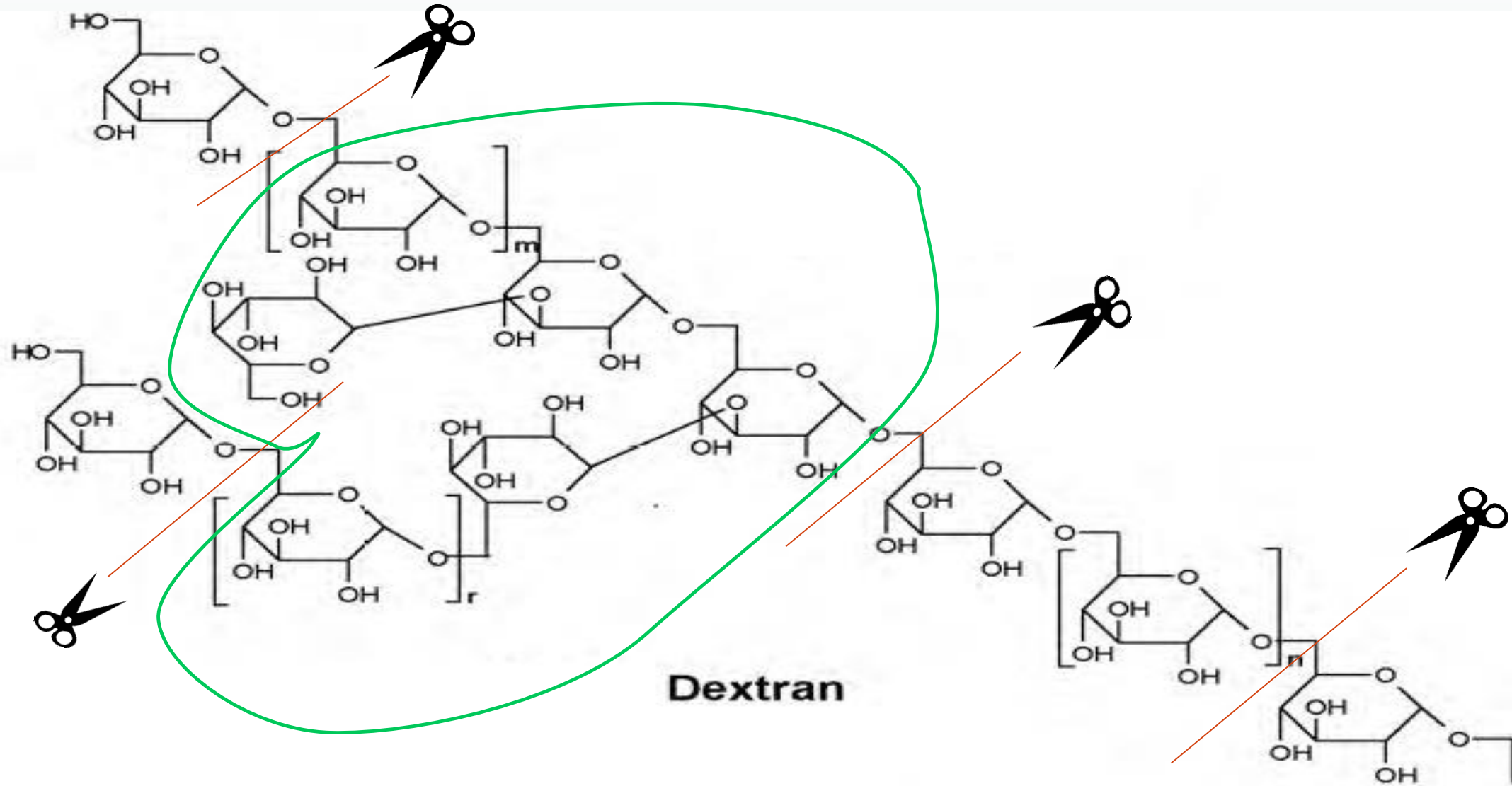








Hydroliza dekstranu





Optymalne warunki pH i temperatury dla działania dekstranazy

Szczep	Optymalne pH	Optymalna temperatura
<i>Penicillium lilacinum</i>	5.0 – 6.0	50 – 60°C
<i>Paecilomyces lilacinum</i>		
<i>Penicilium minioluteum</i>	5.0	50°C
<i>Chaetomium gracile</i>	3.0 – 7.0	do 85°C
<i>Chaetomium erraticum</i>		

(Jimenez 2005; 2009)



Dextranases	Source		Optimum Value		
			pH	Temperature	
	Bacteria	<i>Brevibacterium fuscum</i> var. <i>Dextranlyticum</i> [15]	7.0-7.5	NR	
		<i>Streptococcus mutans</i> [16]	5.5	37 °C	
		<i>Streptomyces anulatus</i> (two enzymes) [48]	7.0	40 y 50 °C	
		<i>Flavobacterium</i> sp. M-73 [19]	7.0	35 °C	
		<i>Thermoanaerobacter wiegelsii</i> [38]	5.5	70 °C	
		Strain of <i>Thermoanaerobacter</i> [39]	4.5-5.5	80 °C	
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> [47]	5.5	65-70 °C	
		Yeast	<i>Lipomyces starkeyi</i> [21]	5.0	55 °C
		Recombinant	Fungi	<i>Paecilomyces lilacinum</i> in <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> and <i>Griberella</i> [46]	NR
<i>Penicillium minioluteum</i> in <i>Pichia pastoris</i> [32]	4.0-5.0			57 °C	
Bacteria	<i>Streptococcus sobrinus</i> in <i>Escherichia coli</i> [34]			5.3	39 °C





Dekstranaza w przemyśle cukrowniczym

- brak ujednoliconej metody badania aktywności dekstranazy
- aktywność enzymu wyrażona w różnych jednostkach: U/g, DU/g, U/ml i DU/ml



Dekstranaza w przemyśle cukrowniczym

Dekstranaza	
skoncentrowana	nieskoncentrowana
25 000 – 58 000 DU/ml najczęściej 48 000-58 000 DU/ml	< 25 000 DU/ml najczęściej < 6 000 DU/ml



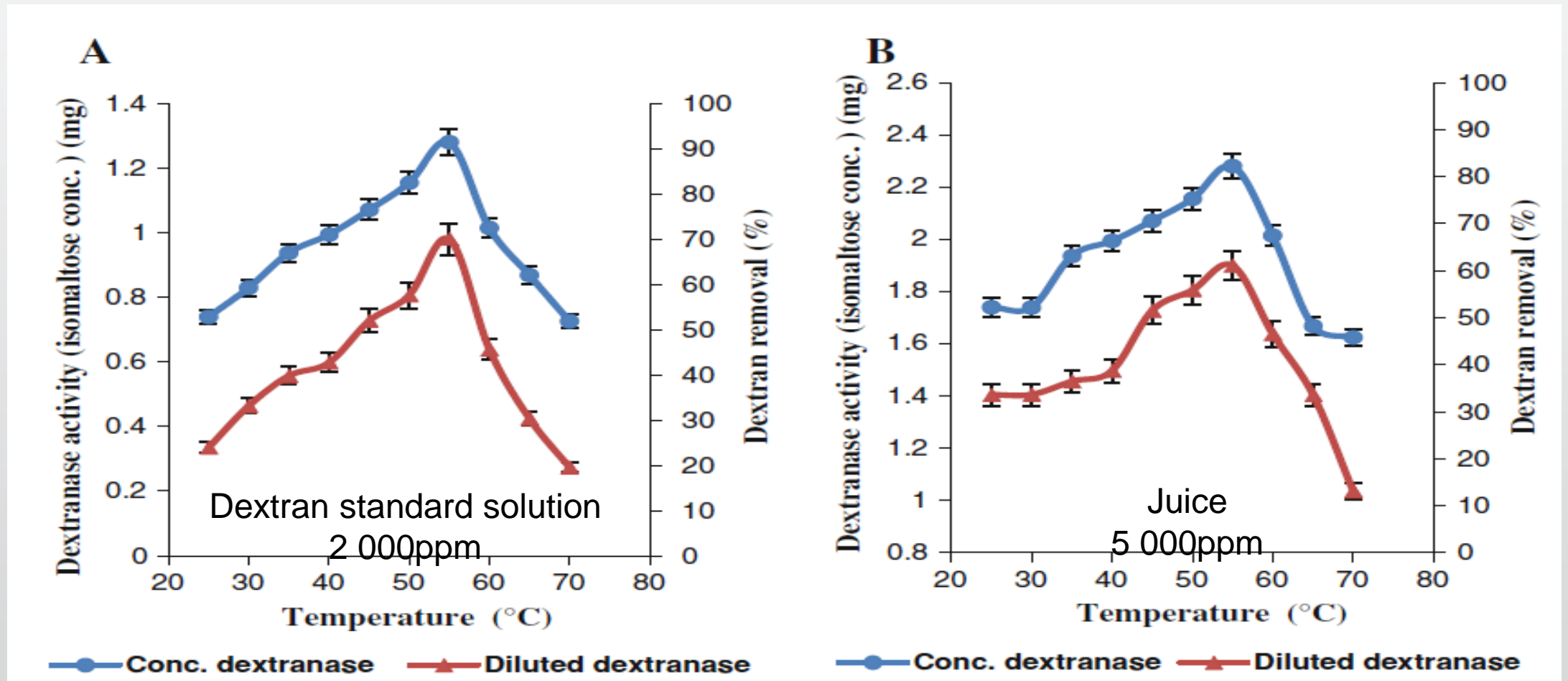
Aktywność dekstranazy regulowana jest przez kilka czynników:

- **Temperatura**
- **pH środowiska**
- **stężenie substratu**
- **czas reakcji**
- **wyściowa zawartości dekstranu**
- **rodzaju, wyjściowej aktywności oraz zastosowanej dawki enzymu**



Aktywność dekstranazy regulowana jest przez kilka czynników:

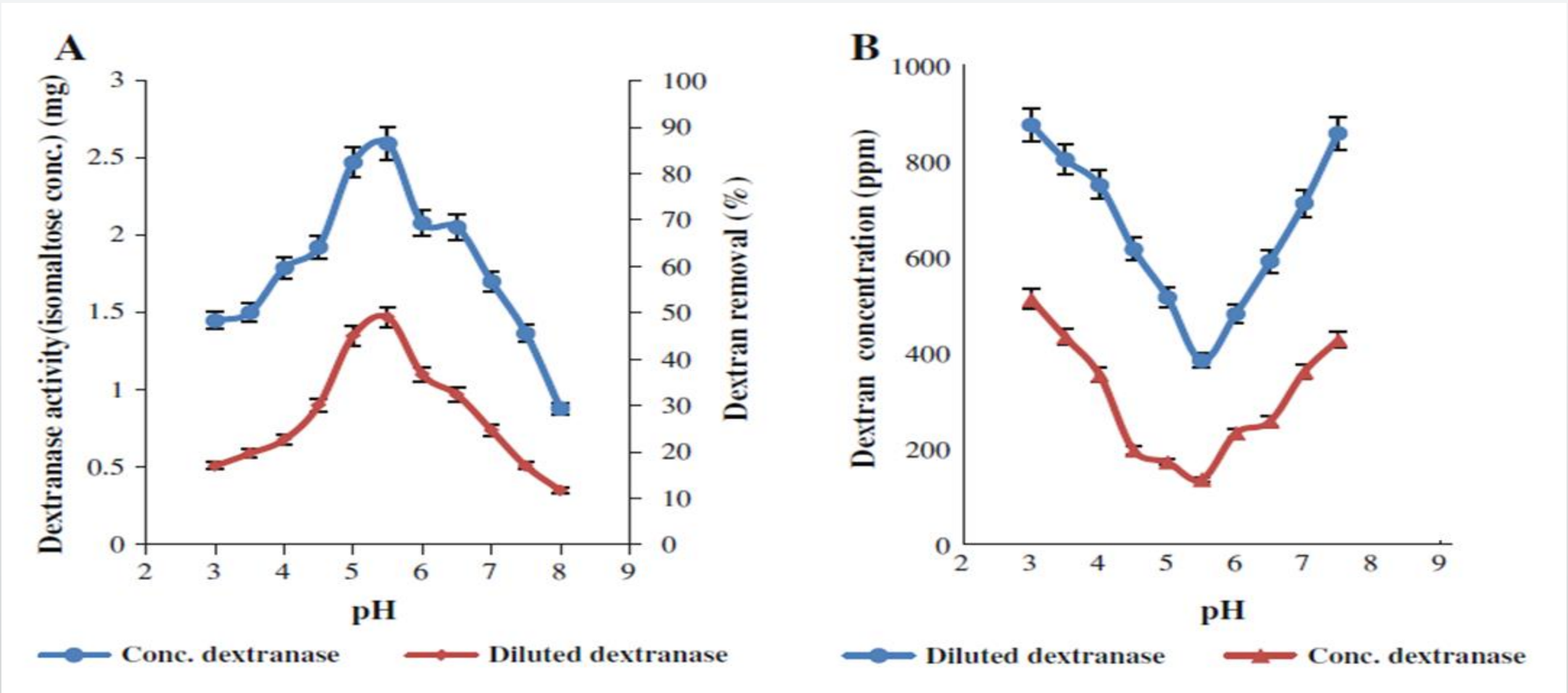
- temperatura





Aktywność dekstranazy regulowana jest przez kilka czynników:

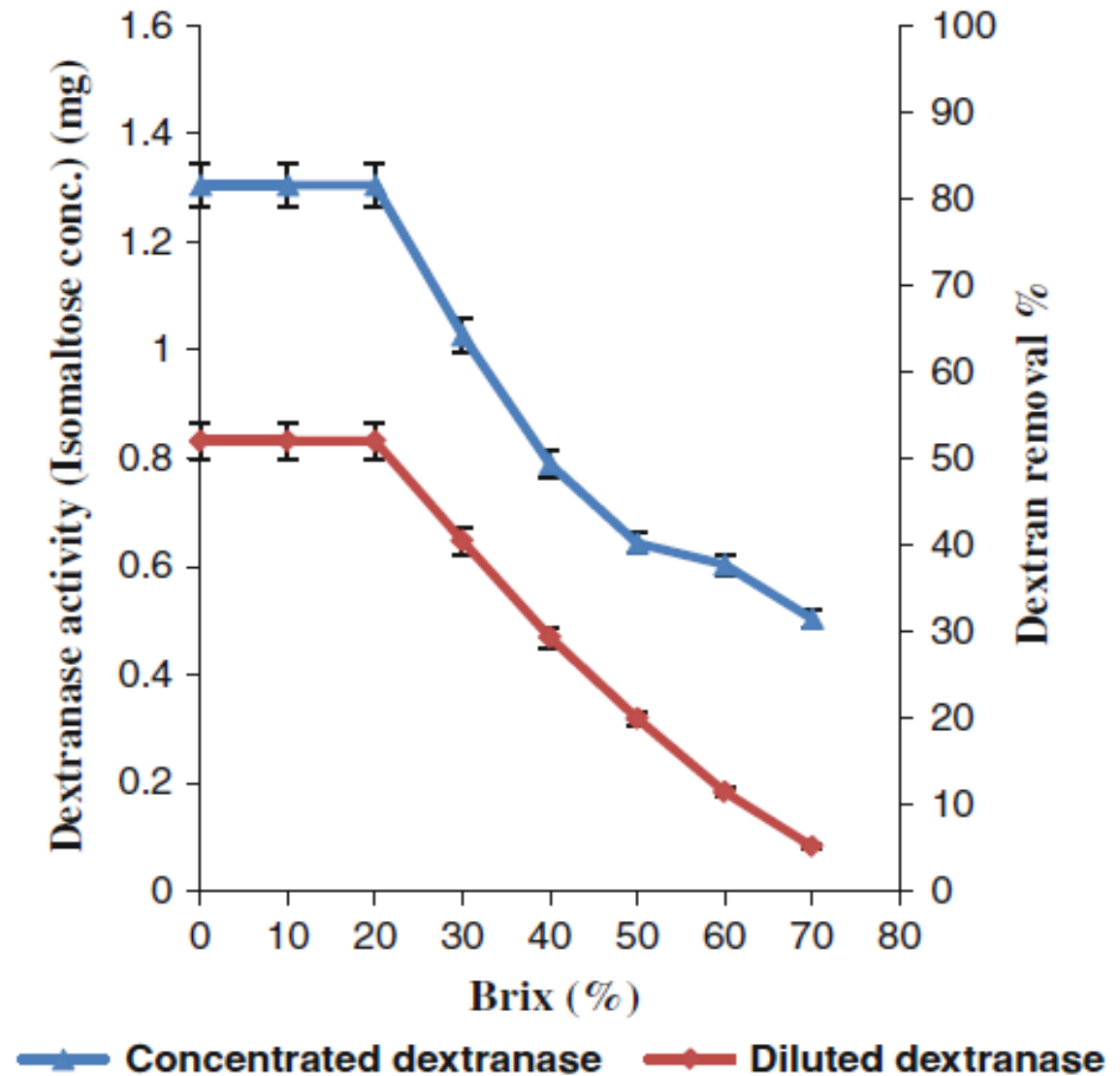
- pH środowiska





Aktywność dekstranazy regulowana jest przez kilka czynników:

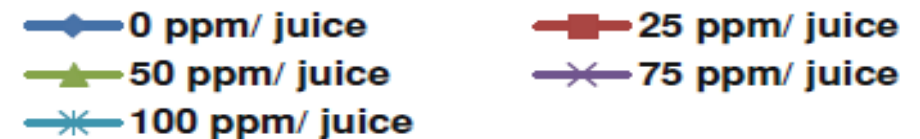
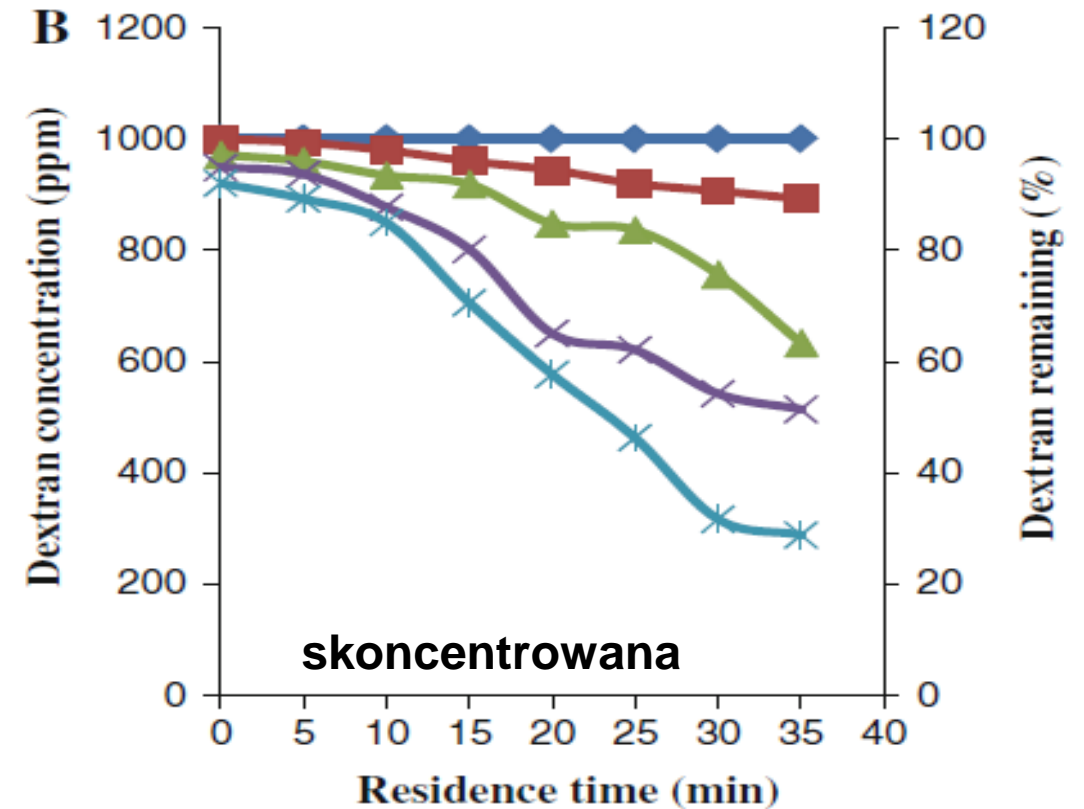
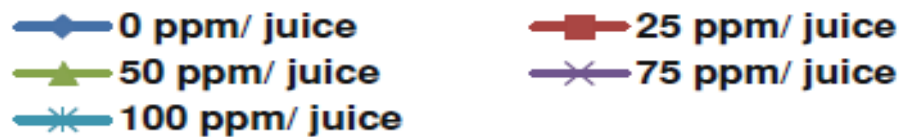
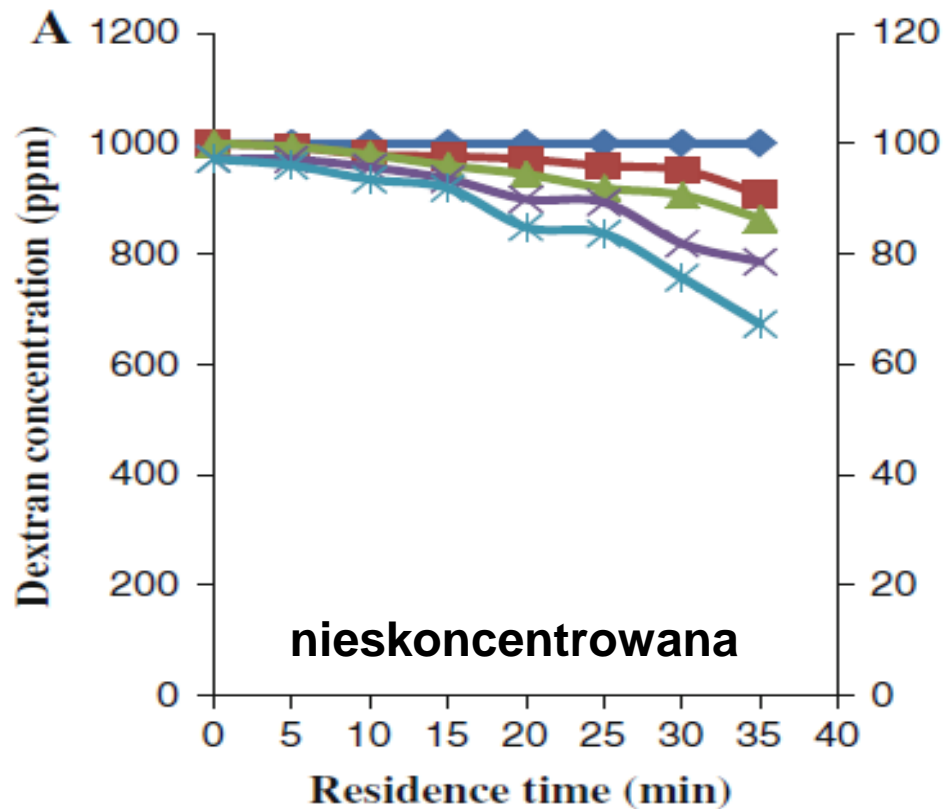
- stężenie substratu





Aktywność dekstranazy regulowana jest przez kilka czynników:

- czas reakcji





Stabilność dekstranazy w czasie

Spadek aktywności po 90 dniach (temp. 4°C)

skoncentrowana

0,5%

nieskoncentrowana

8%

Spadek aktywności po 90 dniach (temp. 25°C)

skoncentrowana

9%

nieskoncentrowana

46%





Dekstranaza skoncentrowana

- **wyższa aktywność**
- **bardziej stabilna w czasie**



Aktywność enzymów zmienia się podczas jego przechowywania

Znaczący wpływ na obniżenie jego aktywności mają:

- **warunki magazynowania**
- **postać w jakiej enzym jest przechowywany**
(w postaci skoncentrowanej czy nieskoncentrowanej).



Oznaczanie aktywności dekstranazy



Na 28 Kongresie ICUMSA w 2012 r. w Cambridge,
zapropnowana została prosta miareczkowa
metoda do wyznaczenia aktywności dekstranazy,
wyrażonej w DU/ml (DU - z angielskiego 28
„dextranase unit”).



Metoda opiera się na:

- **Produktami reakcji są izomaltooligosacharydy.**
- **Aktywność dekstranazy bada się poprzez hydrolizę dekstranu i pomiar ilości cukrów redukujących**
- **Zawartość cukru redukującego oznacza się metodą Hanesa.**



Definicja aktywności dekstranazy w metodzie

- **1 unit of dextranase activity (DU)**

- to ilość enzymu, która hydrolizuje wzorcowy roztwór dekstranu T2000, produkując cukry redukujące odpowiadające sile redukcji 1 mikromola ($1 \mu\text{mol}$) tiosiarczanu sodu w czasie jednej minuty w następujących warunkach:

temperatura - 37 °C

pH - 5.8

Obliczanie aktywności dekstranazy



$$DU / ml = (C - T) * 2,5 * N$$

C – objętość tiosiarczynu sodu zużyta do miareczkowania próby kontrolnej, ml

T – objętość tiosiarczynu sodu zużyta do miareczkowania próby (średnia z dwóch prób), ml

N - wielokrotność rozcieńczenia enzymu (np. 0.5g/L – N=2000)



Badania własne



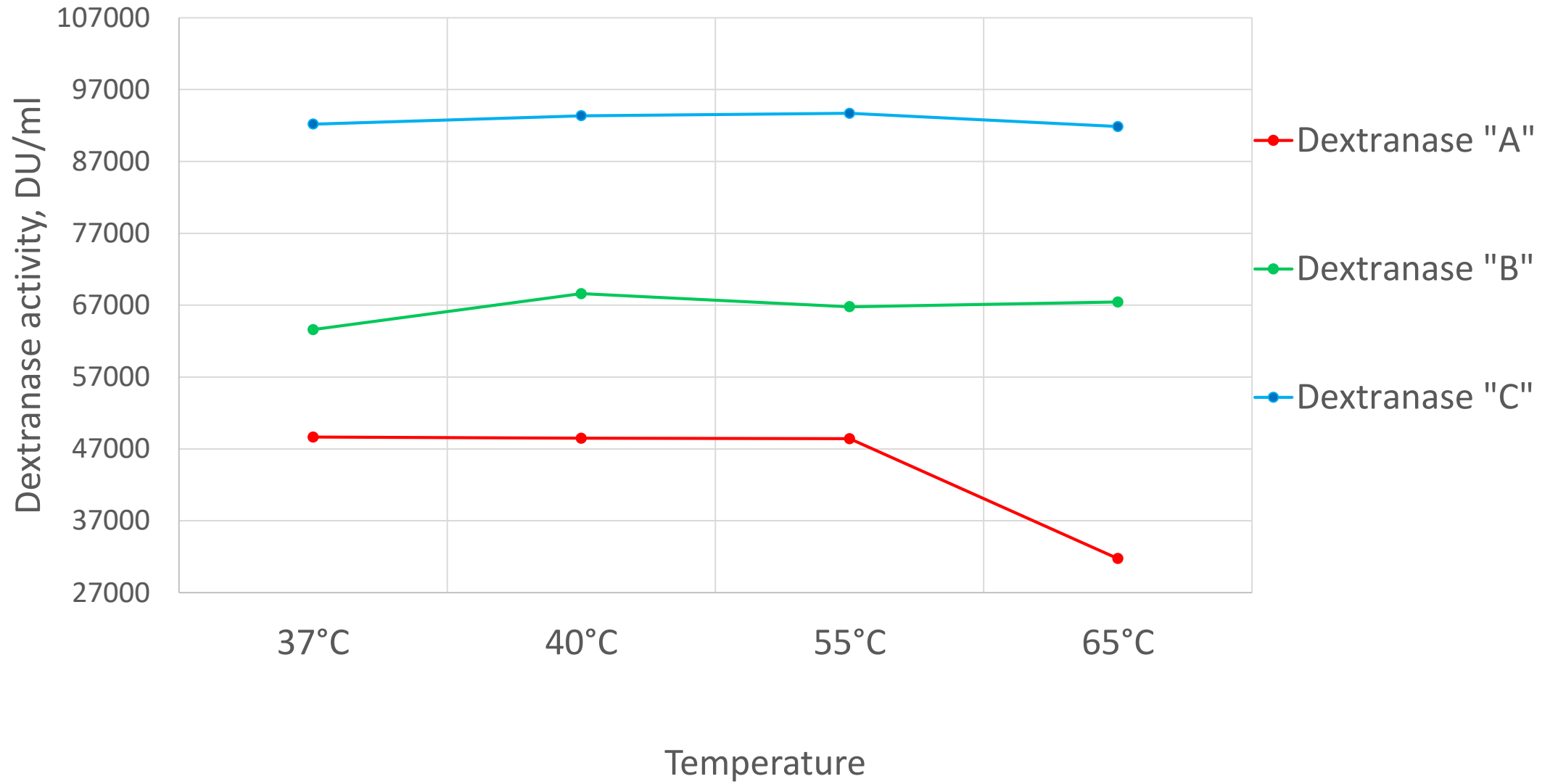


Cel pracy

Oznaczenie aktywności dostępnych na rynku preparatów dekstranazy (trzech enzymów) podnosząc temperaturę hydrolizy wzorcowego roztworu dekstranu do 40, 55 i 65°C.

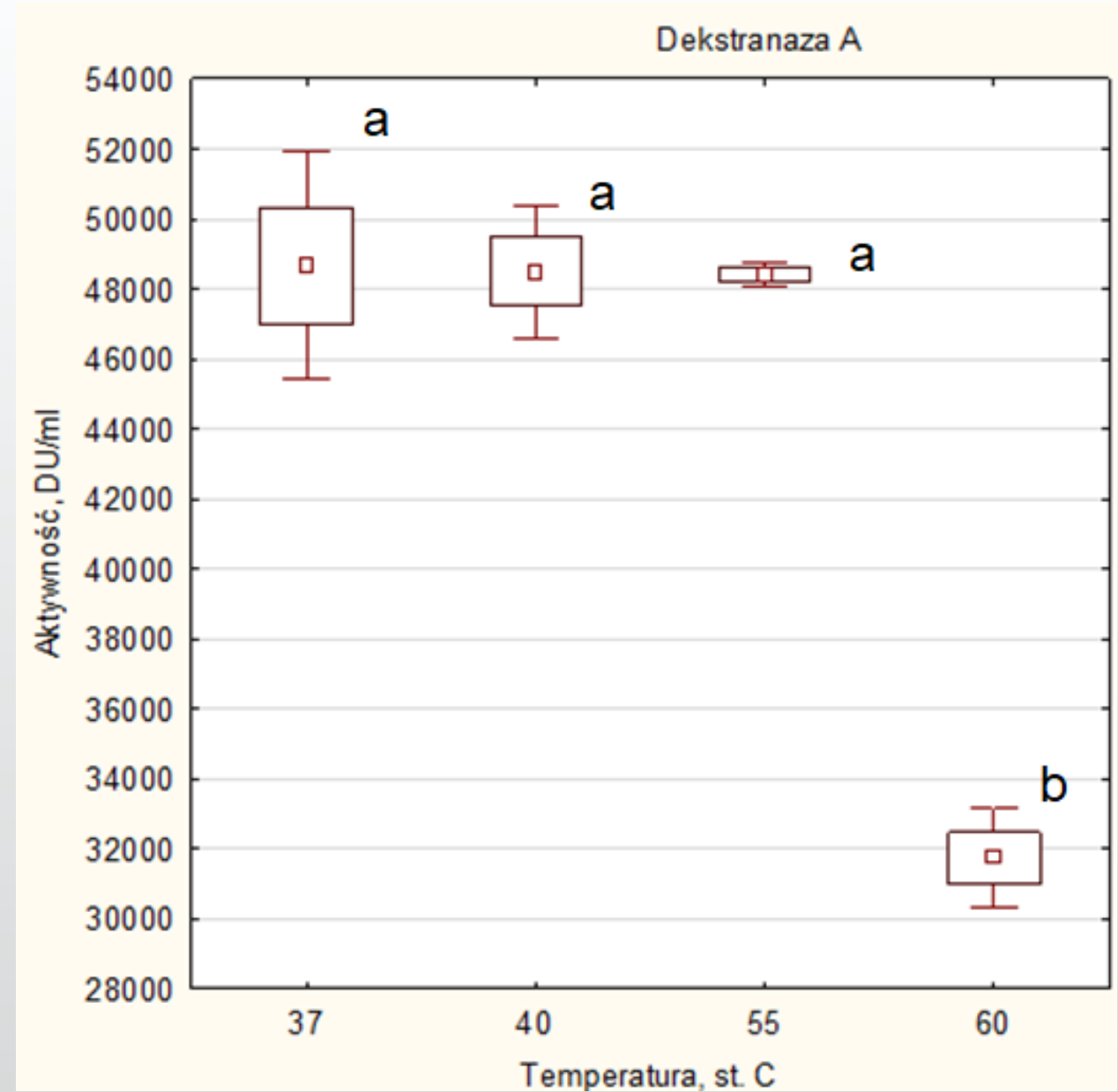
Wyniki aktywności dekstranazy porównano z wynikami uzyskanymi w temperaturze 37°C.







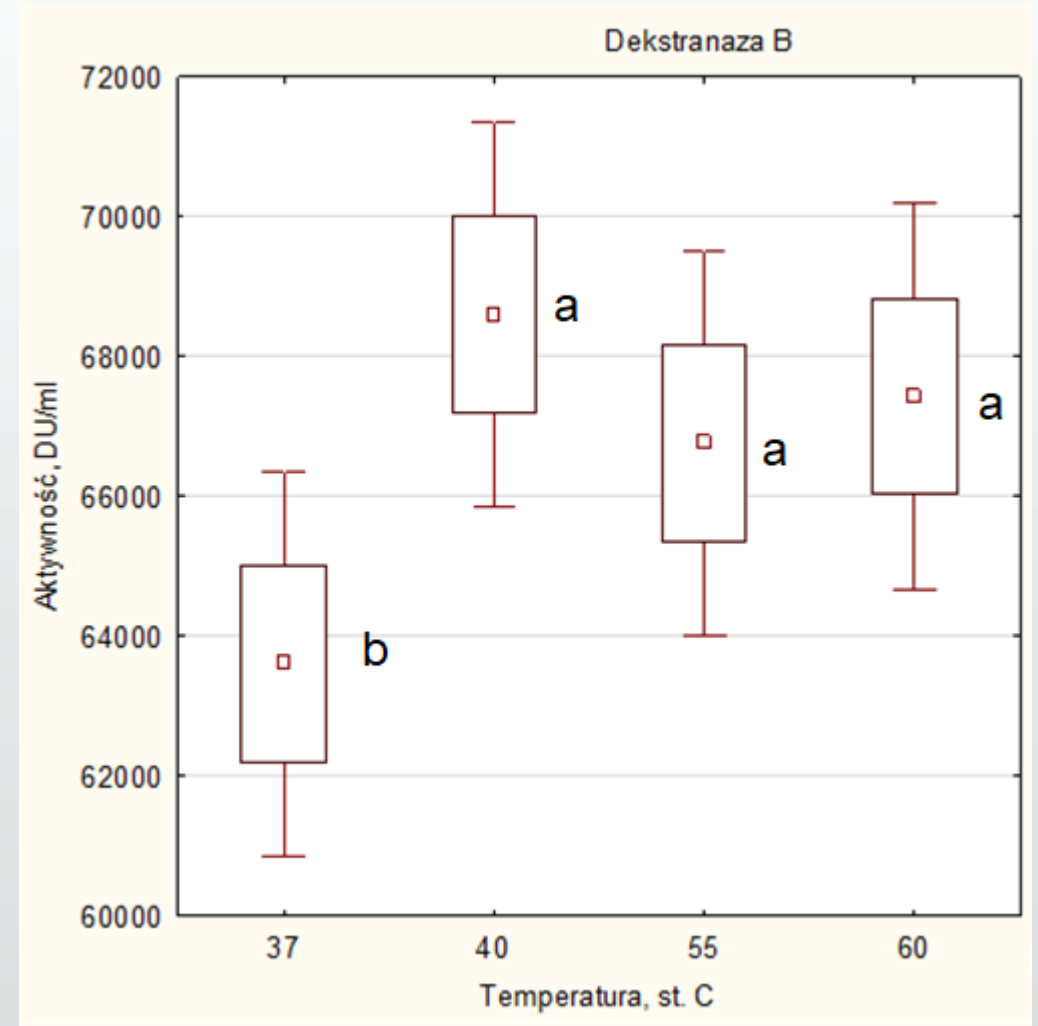
	Dextranase „A”			
Temperatura, °C	37	40	55	65
No	Activity, DU/ml			
1	43000	45333	47667	28333
2	43000	45333	47667	28333
3	44000	46333	48167	28833
4	46000	46333	48167	31833
5	46000	46833	48167	32833
6	49000	48333	48667	32833
7	50000	49333	48667	33333
8	52000	49833	48667	33333
9	55500	53333	48667	33833
10	58000	53833	49667	33833
<i>n</i>	10	10	10	10
\bar{x}	48650	48483	48417	31733



* a,b – homogenous groups



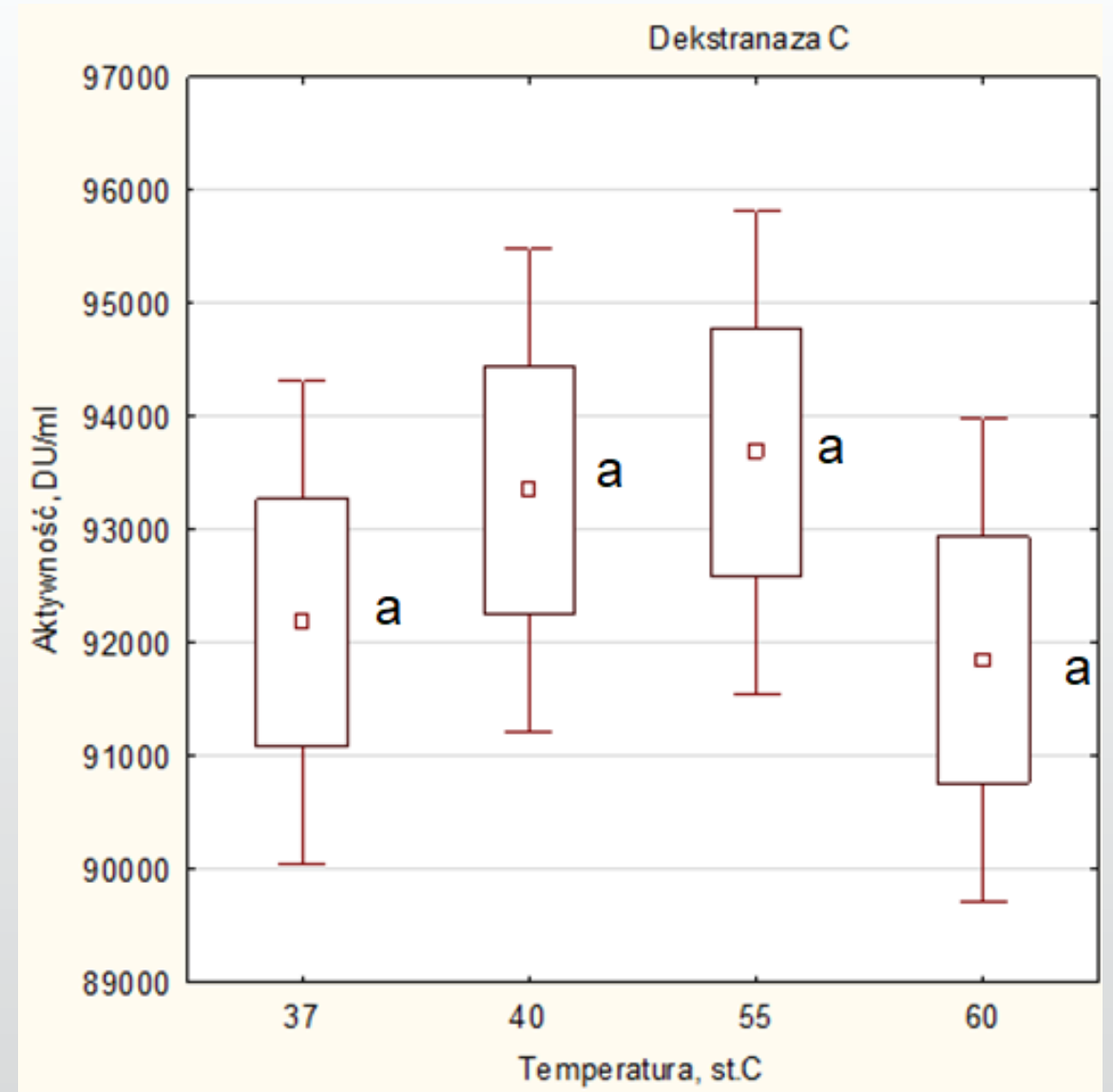
	Dextranase „B”			
Temperatura, °C	37	40	55	65
No	Activity, DU/ml			
1	57000	62000	60167	60833
2	58000	63000	61167	61833
3	59500	64500	62667	63333
4	62000	67000	65167	65833
5	63500	68500	66667	67333
6	64000	69000	67167	67833
7	66000	71000	69167	69833
8	68000	73000	71167	71833
9	69000	74000	72167	72833
10	69000	74000	72167	72833
n	10	10	10	10
\bar{x}	63600	68600	66767	67433



* a,b – homogenous groups



	Dextranase „C”			
Temperatura, °C	37	40	55	65
No	Activity, DU/ml			
1	86333	87500	87833	86000
2	87833	89000	89333	87500
3	88333	89500	89833	88000
4	92333	93500	93833	92000
5	92833	94000	94333	92500
6	93333	94500	94833	93000
7	94833	96000	96333	94500
8	94833	96000	96333	94500
9	95333	96500	96833	95000
10	95833	97000	97333	95500
n	10	10	10	10
\bar{x}	92183	93350	93683	91850
PSDr %	3.7	3.7	3.7	3.8



* a,b – homogenous groups



Wyniki

- Stwierdzono istotne statystycznie różnice w aktywności mierzonej w temperaturze 65°C w stosunku do pozostałych temperatur (37, 40 i 55°C) dla enzymu A.
- Stwierdzono statystycznie istotne różnice w aktywności mierzonej w temperaturze 37°C w stosunku do pozostałych temperatur (40, 50 i 55°C) dla enzymu B.
- Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w aktywności dekstranazy mierzonej we wszystkich badanych temperaturach dla enzymu C.



Wnioski

- Należy opracować jednolitą definicję aktywności dekstranazy oraz metodę jej oznaczania z uwzględnieniem warunków fabrycznych.
- Zastosowanie dekstranazy w procesie produkcji cukru powinno być poprzedzone weryfikacją aktywności enzymu w odniesieniu do warunków temperaturowych, w jakich będzie on stosowany.
Na tej podstawie należy dobrać optymalną dawkę enzymu.



Dziękuję za uwagę



aneta.antczak@p.lodz.pl