



Dekstranosacharaza *Leuconostoc mesenteroides* – mechanizm biosyntezy dekstranu i oligosacharydów

Celina Kubik, Barbara Sikora, Edward Galas

Instytut Biochemii Technicznej
Politechnika Łódzka, Łódź

Dextranucrase of *Leuconostoc mesenteroides* – Mechanism of Dextran and Oligosaccharides Biosynthesis

Summary

Dextranucrase catalyses the synthesis of α -D-glucopyranosyl homopolymers and oligomers from sucrose as a substrate. This paper is a review of reports on the mechanism of dextran and oligosaccharides synthesis. The presence of a low molecular acceptor dextran (3-20 kDa) or low molecular acceptor sugars in reaction mixtures enables obtaining of dextran with molecular weight in a range from 30 to 80 kDa or oligosaccharides with low d.p., which have gained increased nutritional interest (prebiotics). In these reactions, the hydrolytic enzyme, i.e. dextranase, may be involved together with dextranucrase instead of acceptors.

Key words:

dextran, mechanism, acceptors, clinical dextran, oligosaccharides.

Adres do korespondencji

Celina Kubik,
Instytut Biochemii
Technicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź.

biotechnologia

2 (49) 98-110 2000

1. Wprowadzenie

Biochemia dekstranów jest przedmiotem licznych badań, ponieważ wodne roztwory tych polisacharydów o odpowiedniej budowie i masie cząsteczkowej mają właściwości fizyczne zbliżone do osocza krwi i mogą być używane jako płyny krwiozastępcze. Dekstran nadający się do użytku klinicznego powinien posiadać prawie liniową strukturę i masę z przedziału 30-80 kDa. W przemyśle wytwarzany jest on najczęściej w wieloetapowym

procesie, obejmującym: biosyntezę dekstranu wysokomolekularnego w hodowlach szczepów *Leuconostoc mesenteroides* na podłożach zawierających wysokie stężenia sacharozy, jego izolację z cieczy pohodowlanej oraz kontrolowaną hydrolizę (najczęściej kwasową), a następnie wydzielanie i oczyszczanie frakcji klinicznych (1).

Od lat w wielu ośrodkach badawczych są prowadzone prace nad skróceniem technologicznego procesu otrzymywania dekstranu klinicznego, polegające na sterowaniu jego syntezą. W tym celu do mieszanin reakcyjnych z sacharozą i dekstranosacharazą, katalizującą proces biosyntezy, dodawane są niskocząsteczkowe dekstrany akceptorowe i ustalane są warunki reakcji zapewniające wysoką wydajność frakcji klinicznych (2). Alternatywą tej metody może być synteza dekstranu prowadzona przez dekstranosacharazę w obecności niewielkiej ilości enzymu hydrolizującego ten polimer, czyli dekstranazy.

Trzeba podkreślić, że dekstranosacharaza jest wykorzystywana nie tylko w syntezie dekstranu, ale także – coraz częściej – w syntezie oligosacharydów, uważanych za prebiotyki stymulujące wzrost bifidobakterii w jelicie grubym.

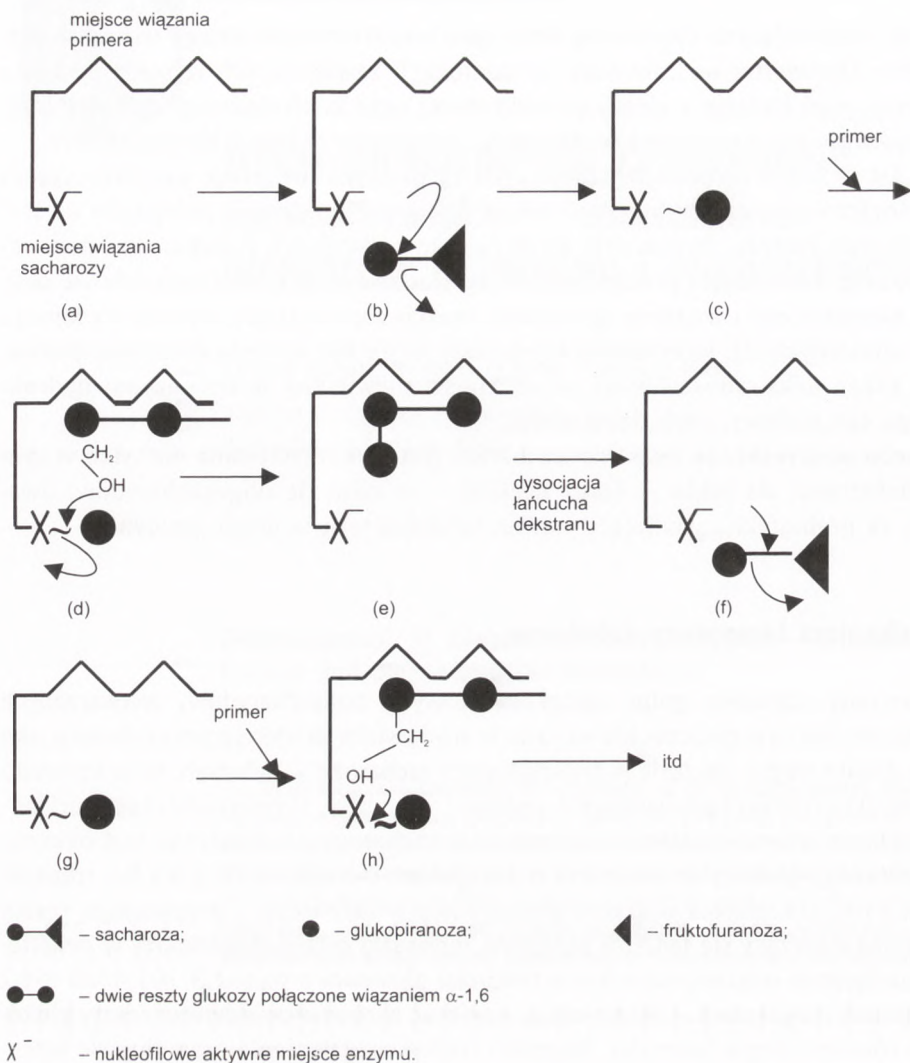
2. Mechanizm biosyntezy dekstranu

Dekstrany stanowią grupę pozakomórkowych polisacharydów, wytwarzanych przez liczne bakterie podczas ich wzrostu w środowisku zawierającym sacharozę jako jedyne źródło węgla. Bakterie przekształcające sacharozę w dekstran, to gramdodatnie ziarniaki z rodziny *Lactobacillaceae*, rodzaju *Leuconostoc*, *Streptococcus* i *Lactobacillus*.

Enzymem odpowiedzialnym za konwersję sacharozy do dekstranu jest dekstranosacharaza (2-glukozylotransferaza α -1,6-glukan: D-fruktoza EC 2.4.1.5.), transglikozylaza rozszczepiająca wiązania glikozydowe w sacharozie i przenosząca reszty glukozy na tworzący się łańcuch polimeru. Jednostki α -D-glukopiranozy w dekstranie są połączone wiązaniami α -1,6 w łańcuchu głównym oraz α -1,3, α -1,4 lub α -1,2 w miejscach rozgałęzień. Gałęzie mogą zawierać zarówno pojedyncze reszty glukozy, jak również długie łańcuchy. Stopień i rodzaj rozgałęzienia oraz długość łańcuchów bocznych w dekstranie zależą od szczepu użytego do jego wytwarzania oraz od warunków biosyntezy (3).

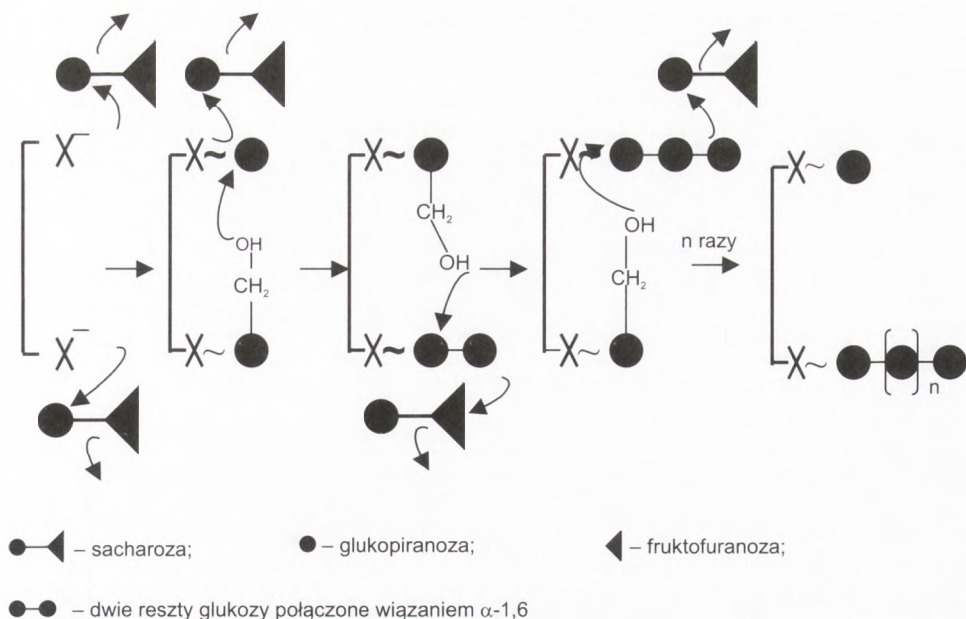
Do wyjaśnienia mechanizmu konwersji sacharozy do dekstranu przyczyniły się głównie prace takich autorów jak: Boveya (4-6), Tsuchiya i in. (7), Eberta i in. (8) oraz Robyta i in. (9-13), którzy stosowali w eksperymentach znakowaną sacharozę. Mechanizm tej reakcji jest inny niż syntezy większości polisacharydów, wymagających w charakterze prekursorów pochodnych nukleotydów i monocukrów (UDPG, ADPG) lub ufosforylowanych cukrów. W konwersji sacharozy do dekstranu i fruktozy, energia potrzebna do wytworzenia wiązań glikozydowych w polimerze pochodzi z rozkładu wiązania glukoza-fruktoza w sacharozie.

W latach pięćdziesiątych dla biosyntezy dekstranu proponowano mechanizm zależny od primera, czyli wcześniej uformowanego łańcucha polimeru, którego nieredu-



Rys. 1. Hipoteza mechanizmu syntezy dekstranu przez dekstranosacharazę *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, zależnego od primera (wg 3 – za zgodą).

kujące końce są niezbędne dla dodania nowej jednostki monomeru (rys. 1). Kabayashi i in. (14) zakładali istnienie w centrum aktywnym dekstranosacharazy dwóch rodzajów miejsc przyłączenia substratu, jednego – dla sacharozy i drugiego – dla primerowego dekstranu (rys. 1a). Według tej hipotezy wydłużanie primera ma miejsce, gdy nukleofil enzymu (prawdopodobnie grupa karboksylanowa) atakuje (rys. 1b) C-1 reszty glukozy w sacharozie dając kowalencyjne połączenie pośrednie glukozyl-enzym (rys. 1c). C-6-OH nieredukującego końca primera kieruje atak na C-1 glukozy w związku pośred-

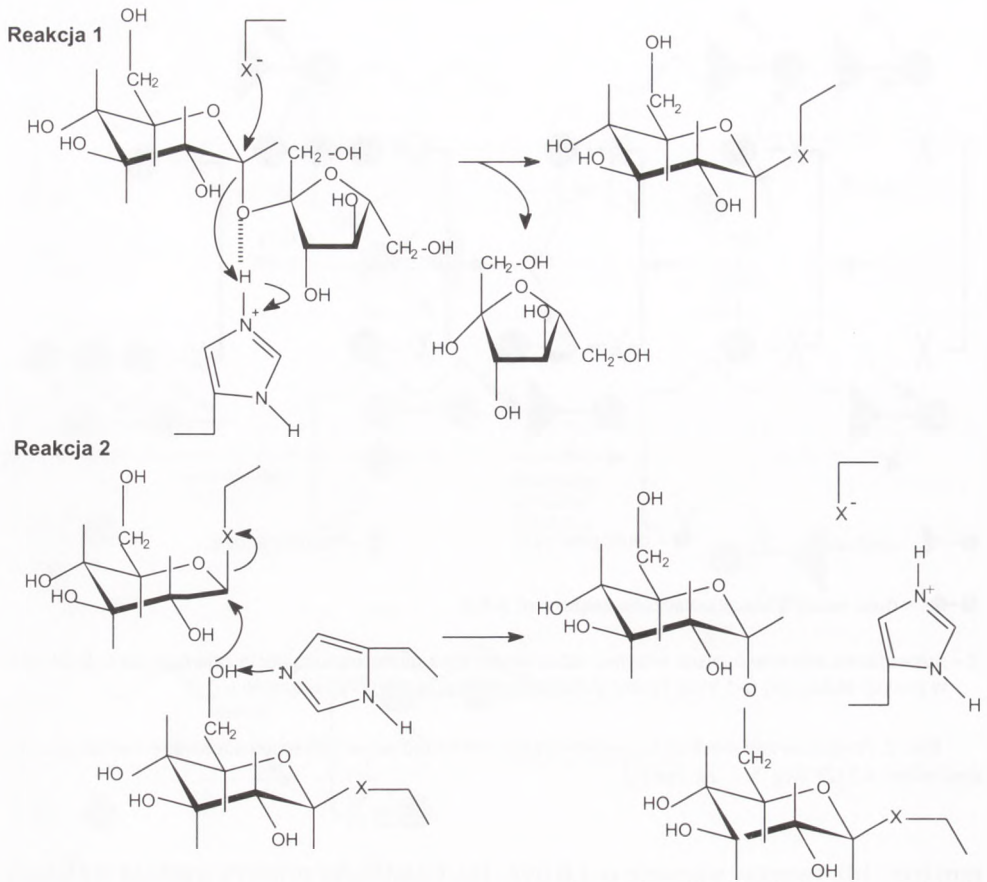


X^- nukleofilowe aktywne miejsce enzymu, które łącząc się z glukopiranozą tak ją orientuje, że C-6-OH jest w pozycji atakującej C-1 innej reszty glukopiranozy i może utworzyć wiązanie α -1,6.

Rys. 2. Proponowany mechanizm polimeryzacji dekstranu przez dekstranosacharazę *Leuconostoc mesenteroides* B-512F (wg 3 – za zgodą).

nim (rys. 1d), tworząc wiązanie α -1,6 (rys. 1e). Częsteczka primera wydłuża się wtedy o jedną resztę glukozy. Aby synteza mogła być kontynuowana, łańcuch z nowo wprowadzonym glukozylem musi oddysocjować z miejsca przyłączenia primera (rys. 1f), i musi dołączyć się kolejna cząsteczka primera (rys. 1h). Synteza wg tego mechanizmu jest zatem procesem nieskończonym. Problemy wynikające z przyjęcia tej hipotezy pojawiły się, gdy opisano syntezę glukanu przez dekstranosacharazy konstytutywnych szczepów *Leuconostoc* i *Streptococcus* w nieobecności polisacharydu jako primera. Trudności wynikały też z konieczności wyjaśnienia mechanizmu tworzenia wiązań rozgałęziających. Bovey (4) postulował co prawda istnienie enzymu rozgałęziającego, jednak nie został on nigdy wyodrębniony. W dalszych badaniach wykazano, że dodany dekstran nie stymuluje reakcji przez działanie jako primer (11).

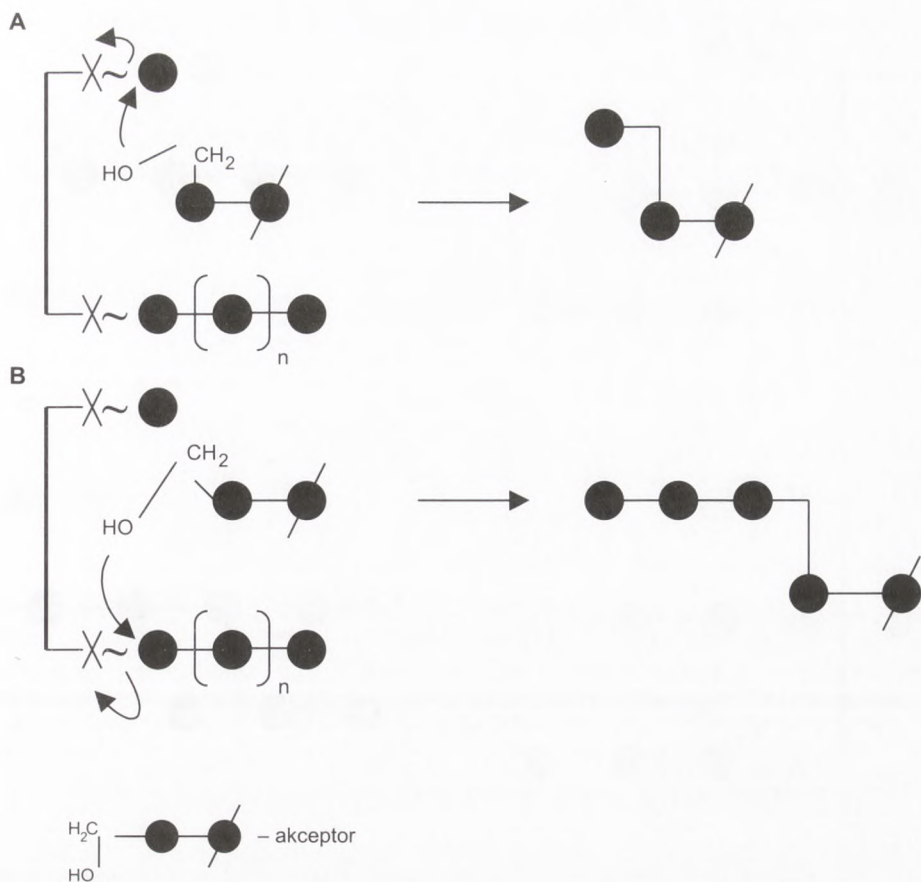
Drugą hipotezę mechanizmu syntezy dekstranu, zakładającą kolejne dodawanie jednostek glukozy do redukującego końca, zaproponował Ebert i Patat (15), a dane eksperymentalne potwierdzające tę hipotezę zaprezentował Robyt i in. (9). Na rysunku 2 przedstawiono mechanizm syntezy kolejnych wiązań 1,6- α -glikozydowych dekstranu przez dekstranosacharazę *Leuconostoc mesenteroides* B-512F. Polega on na istnieniu dwóch aktywnych miejsc nukleofilowych, które atakując cząsteczkę sacharozę usuwają z niej fruktozę, a wiążą glukozę. C-6-OH jednej reszty glukozy kieruje



Rys. 3. Mechanizm rozszczepienia sacharozy i tworzenia wiązania α -1,6 przez dekstranosacharazę (wg 3 – za zgodą). Reakcja 1 – nukleofilowa wymiana i protonacja cząstki fruktozy w celu utworzenia związku pośredniego glukozył-enzym. Reakcja 2 – tworzenie wiązania α -1,6 przez atak C-6-OH na C-1 kompleksu enzym-glukoza, wspomagany usunięciem protonu z grupy hydroksylowej przez grupę imidazolową.

atak na C-1 drugiej i tworzy się wiązanie α -1,6. Uwolniony nukleofil atakuje kolejną cząsteczkę sacharozy, tworząc pośrednie połączenie enzym-glukozył. C-6-OH tego nowego intermediatu atakuje C-1 izomaltozyłowej jednostki, tworząc izomaltotriozyl-enzym. Przebiega zatem proces, w którym glukozył i rosnący łańcuch dekstranozyłu są przenoszone naprzemiennie między dwoma miejscami nukleofilowymi dekstranosacharazy (mechanizm *ping-pong*).

Robyt i Eklund (13) rozważając stereochemię tej reakcji stwierdzili, że wiązania jednostek glukozyłowych i dekstranozyłowych z enzymem muszą mieć β -konfigurację, aby nastąpiła przemiana sacharozy do dekstranu, a hydroksylowa grupa przy C-6 jest wówczas stereochemicznie właściwie ułożona w stosunku do grupy C-1 jednostki dekstranu. Założenia te zostały przedstawione na rysunku 3.



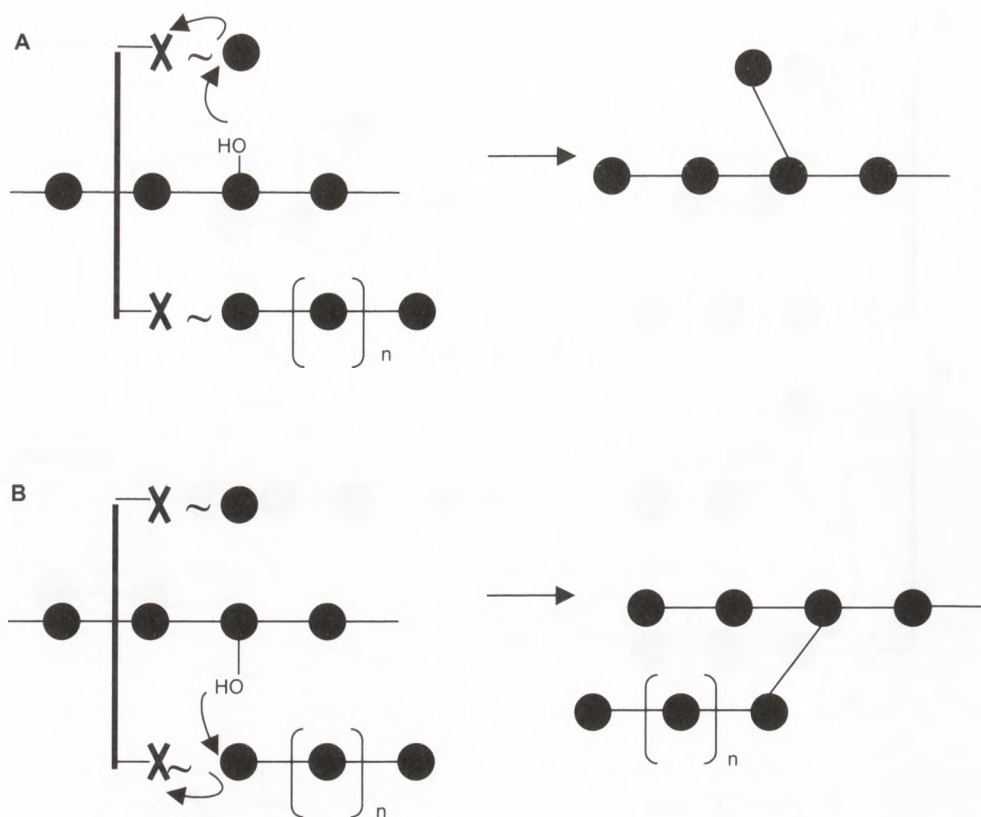
Rys. 4. Mechanizm reakcji akceptorowej dekstranosacharazy *Leuconostoc mesenteroides* B-512F (wg 3 – za zgodą).

Akceptor przyłącza się do miejsca wiązania akceptora w taki sposób, że C-6-OH z nieredukującego końca atakuje C-1 glukozyłu (A) lub dekstranozyłu (B), uwalniając odpowiednio trisacharyd (A) lub łańcuch dekstranu (B).

Fu i Robyt (16) wykazali, że dla zajścia reakcji niezbędna jest obecność dwóch imidazolowych grup histydyny. Te dwie grupy są donorami protonów koniecznych do odszczepienia wolnej fruktozy. Imidazolowa grupa w drugim etapie jest reprotynowana, przyjmując proton z grupy 6-hydroksylowej intermedyatu enzym-glukozył, co ułatwia nukleofilowy atak i utworzenie wiązania α -1,6.

Zakończenie wzrostu łańcucha dekstranu następuje w tzw. reakcji akceptorowej (rys. 4).

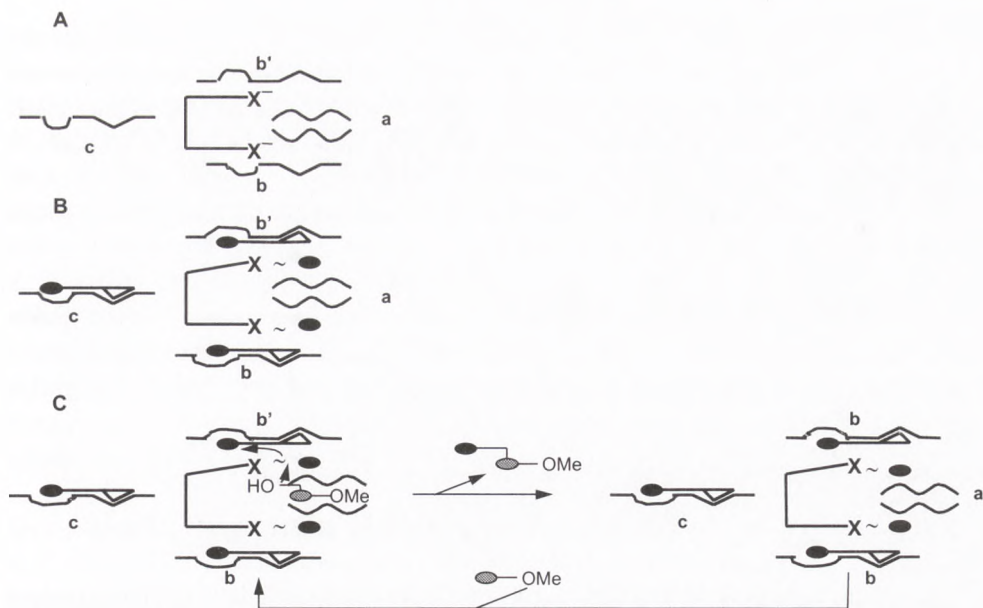
Mechanizm reakcji akceptorowej polega na przyłączeniu akceptora do aktywnego miejsca w taki sposób, że jedna z jego grup hydroksylowych jest tak zorientowana, aby mógł nastąpić atak nukleofilowy na C-1 połączenia reszty glukozyłowej lub dekstranozyłowej z enzymem.



Rys. 5. Mechanizm syntezy wiązań rozgałęziających przez dekstranosacharazę *Leuconostoc mesenteroides* B-512F z udziałem dekstranu wprowadzonego z zewnątrz (wg 3 – za zgodą).

C-3-OH akceptorowego dekstranu kieruje atak na C-1 glukozy (A) lub dekstranozylu (B) tworząc rozgałęzienie z pojedynczą jednostką glukozy (A) lub długimi gałęziami (B).

Akceptorem może być fruktoza, sacharoza lub inny cukier, jak również cząsteczka dekstranu. Małe cząsteczki akceptorowe kończą wzrost liniowego polimeru, natomiast w przypadku dekstranu jako akceptora mogą tworzyć się wiązania rozgałęziające (rys. 5). Jest to uzależnione od masy cząsteczkowej akceptorowego dekstranu. Jeżeli jest ona niska, C-6-OH z nieredukującego końca akceptorowego dekstranu kieruje atak na C-1 glukozy z redukującego końca łańcucha dekstranu pozostającego w kompleksie z enzymem i odrywa dekstranozyl. Tworzy się wiązanie α -1,6 i łańcuch dekstranu wydłuża się. Wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej akceptorowego dekstranu dostępność grupy C-6-OH jest coraz bardziej ograniczona i wtedy częściej C-3-OH kieruje atak na C-1 tworząc wiązanie α -1,3. W ten sposób może być wytwarzany dekstran z pojedynczą jednostką glukozy w łańcuchu bocznym, jak i długimi gałęziami (17).



Rys. 6. Model inhibicji dekstranosacharazy *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM przy wysokich stężeniach sacharozy (wg 18 – za zgodą).

A – centrum aktywne dekstranosacharazy: dwa miejsca wiążące sacharozę (b i b'), allosteryczne miejsce wiązania sacharozy (c) i miejsce wiązania akceptora (a);

B – allosteryczna inhibicja dekstranosacharazy przy wysokim stężeniu sacharozy;

C – reakcja akceptorowa allosterycznie inhibowanej dekstranosacharazy z metylo- α -D-glukopiranozydem.

3. Kontrolowana synteza dekstranu i produktów akceptorowych

3.1. Model inhibicji dekstranosacharazy wysokim stężeniem sacharozy

Podczas typowej reakcji dekstranosacharazy z sacharozą tworzy się dekstran i fruktoza. Wyjściowe stężenie sacharozy ma istotny wpływ na ilość i masę syntetyzowanego dekstranu. Przy 2% stężeniu sacharozy w mieszaninie reakcyjnej powstaje prawie wyłącznie wysokomolekularny polimer, a ze wzrostem jej stężenia maleje ilość i masa cząsteczkowa dekstranu. Sacharoza w stężeniu ponad 14% staje się inhibitorem syntezy. Tworzą się wówczas znaczne ilości oligosacharydów, a także wzrasta stężenie glukozy, będącej produktem reakcji akceptorowej z wodą. Na podstawie dotychczasowej wiedzy o mechanizmie syntezy dekstranu i reakcji akceptorowych, Tanriseven i Robyt (18) zaproponowali model wyjaśniający inhibujące działanie wysokich stężeń sacharozy na dekstranosacharazę (rys. 6). Według niego w centrum aktywnym enzymu znajdują się dwa miejsca o dużym powinowactwie do sacharozy (b, b') i jedno wiążące akceptor (a). Akceptor związany z miejscem akcep-

torowym reaguje z glukozylem lub dekstranozylem, które są kowalencyjnie dołączone do X-nukleofilowych grup w aktywnym centrum enzymu. Przy stężeniach sacharozy powyżej 7% przyłącza się ona do trzeciego miejsca wiązania sacharozy (c) i allosterycznie zmienia konformację centrum aktywnego enzymu w taki sposób, że przeciwdziała to interakcji między dwiema glukozylowymi grupami i synteza dekstranu nie rozpoczyna się. W nieobecności akceptora, jednostki glukozylowe mogą być uwalniane w reakcji akceptorowej z wodą, co wyjaśnia zwiększoną ilość glukozy, w przypadku gdy stężenie sacharozy jest większe od 7%. Glukoza ta, jak i powstająca fruktoza, działając jako akceptory powodują uwolnienie kolejnych glukozyli z wytworzeniem oligocukrów. Allosterycznie inhibowany enzym również może wiązać akceptor w jego miejscu wiążącym i reagować z glukozą z kompleksu glukozyl-enzym, dając produkty akceptorowe.

3.2. Bezpośrednia synteza dekstranu o pożądanej masie cząsteczkowej

Dekstran o stosunkowo niskiej masie cząsteczkowej (do kilkudziesięciu tysięcy daltonów) może być otrzymywany w sposób bezpośredni, gdy do mieszaniny reakcyjnej dodawany jest niskomolekularny dekstran, pełniący rolę akceptora łańcucha polimeru.

Opatentowany przez Tomczak (19) sposób wytwarzania dekstranu o masie $40 \div 80$ kDa polegał na hodowli bakterii *Leuconostoc mesenteroides* w podłożu zawierającym obok wymaganych składników sacharozę (2%) oraz dekstran o niskiej masie ($3 \div 20$ kDa) w ilości $0,5 \div 2\%$, przy pH $5,5 \div 6,5$. W takich warunkach podczas etapu biosyntezy dekstranosacharazy nie powstawał dekstran wysokocząsteczkowy. W drugim etapie wykorzystywano oddzielony od biomasy bakteryjnej enzym, który dodawano do roztworu zawierającego $20 \div 30\%$ całkowitej ilości stosowanej w procesie sacharozy i dekstranu akceptorowego (w proporcji 10:1). Następnie dozowano stopniowo pozostałą ilość tych składników do końcowego stężenia sacharozy $30 \div 50\%$. Dodawanie w trakcie trwania procesu roztworu sacharozy i dekstranu akceptorowego pozwoliło uniknąć tworzenia się oligosacharydów. Wydajność frakcji klinicznych wynosiła od 35,5 do 39,5%.

W celu otrzymania dekstranu o kontrolowanej masie molekularnej Paul i in. (20) prowadzili wielostopniową syntezę enzymatyczną z udziałem oczyszczonej dekstranosacharazy B-512F, w obecności maltozy (M). Dwustopniowa synteza umożliwiła uzyskanie dekstranu o masie cząsteczkowej 20 kDa. W pierwszym stopniu procesu, w którym akceptorem reszt glukozylowych była maltoza, utrzymywanie niskiego stosunku S/M (2,1-6,5), przy 12% stężeniu sacharozy (S), pozwoliło na uzyskanie oligosacharydów z wydajnością ok. 90%. Ich masa cząsteczkowa była liniowo zależna od stosunku S/M. Otrzymane oligosacharydy autorzy stosowali jako akceptory (A) w drugim stopniu syntezy. Na tym etapie masa cząsteczkowa powstającego produktu zależała nie tylko od stosunku S/A, ale i od masy akceptorowego oligosacharydu.

Wprowadzając kolejne stopnie syntezy, w których jako akceptory stosowane były niskomolekularne dekstrany otrzymywane po każdym etapie procesu, uzyskiwano dekstrany o masie cząsteczkowej ok. 100 kDa.

W latach dziewięćdziesiątych Kim i Day (21-24) jako bezpośrednią metodę produkcji dekstranu o określonej masie cząsteczkowej zaproponowali fermentację mieszanych kultur z wykorzystaniem szczepów *Leuconostoc mesenteroides* B-512F i *Lipomyces starkeyi* ATCC 74054. W celu przygotowania inokulum do fermentacji, prowadzili oddzielne hodowle obu szczepów na odpowiednich podłożach i w ustalonych warunkach, aż do osiągnięcia fazy stacjonarnej. Następnie oba inokula mieszały w odpowiednich proporcjach (3:1) i dodawali do podłoża produkcyjnego zawierającego sacharozę, ekstrakt drożdżowy i sole mineralne. Dekstranosacharaza wytwarzana przez szczep bakteryjny przemieniała obecną w podłożu sacharozę w dekstran i fruktozę. Jednocześnie dekstranaza produkowana przez drożdże, działając na dekstran, redukowała rozmiary polimeru podczas jego wytwarzania. Prowadząc fermentację mieszanych kultur Kim i Day uzyskali całkowitą wydajność dekstranu w granicach 35-41% w stosunku do użytej sacharozy, czyli 73-85% wydajności teoretycznej. W optymalnych warunkach, tj. w pH 5,2, temperaturze 28°C, przy 0,85% stężeniu ekstraktu drożdżowego i 30% sacharozy (dodawanej stopniowo w trakcie fermentacji) dekstran kliniczny stanowił 93% całkowitej ilości wytworzonego polisacharydu.

Proces fermentacji kultur mieszanych posiada wiele zalet. Przede wszystkim eliminuje się w nim etapy hydrolizy kwasowej i frakcjonowania (niski współczynnik polidispersji dekstranu). Lepkość brzeczeki hodowlanej jest ok. 10-krotnie niższa niż w procesie tradycyjnym, co umożliwia łatwiejsze oddzielenie komórek. Rozmiar dekstranu może być regulowany przez zatrzymanie fermentacji w momencie osiągnięcia żądanej wielkości polisacharydu.

Doniesienia o wykorzystaniu dekstranazy przy produkcji dekstranu klinicznego pojawiły się w literaturze znacznie wcześniej. Już w latach sześćdziesiątych Novak i Witt (25) opatentowali metodę produkcji dekstranu klinicznego z zastosowaniem dekstranazy z *Aspergillus wentii*. Wprowadzając do podłoża z sacharozą filtrat po hodowli *Aspergillus wentii* i zaszczepiając je bakteriami *Leuconostoc mesenteroides*, po 18 godzinach hodowli otrzymywali z 30% wydajnością dekstran o masie 50 ÷ 100 kDa.

3.3. Oligosacharydy jako produkty reakcji akceptorowych

Oligosacharydy tworzą się obok dekstranu, wtedy gdy w mieszaninie reakcyjnej oprócz sacharozy znajdują się inne cukry, wykorzystywane jako akceptory. Reszta glukozy z sacharozy przenoszona jest wówczas przez dekstranosacharazę na wolną grupę hydroksylową sacharydu akceptorowego. Najczęściej jest to wiązanie przez grupę OH przy C-6 z nieredukującego końca akceptora. Wyróżnia się dwie klasy akceptorów. Do pierwszej z nich zalicza się akceptory dające homologiczne serie oli-

gosacharydów, różniących się od siebie o jednostkę glukozy. Takimi akceptorami są np. maltoza, glukoza i izomaltoza. Drugą klasę stanowią akceptory, które tworzą pojedyncze produkty, zawierające o jedną jednostkę glukozy więcej niż wyjściowy cukier. Zalicza się do nich m.in. fruktozę, laktozę, rafinozę. W tabeli 1 przedstawiono główne akceptory i pierwsze produkty transglikozylacji (3).

Tabela 1

Produkty akceptorowe tworzone przez dekstranosacharazę *Leuconostoc mesenteroides* B-512F (wg 3 – za zgodą)

Akceptor	Pierwszy produkt akceptorowy
maltoza	panoza*
izomaltoza	izomaltotrioza*
nigeroza	6 ² -O- α -D-glukopiranozylonigeroza*
D-glukoza	izomaltoza*
laktoza	2 ⁶ _C -O- α -D-glukopiranozylolaktoza
celobioza	2 ¹ -O- α -D-glukopiranozylocelobioza*
D-fruktoza	leukroza (5-O- α -D-glukopiranozylo-D-fruktoza)
rafinoza	2 ⁶ _C -O- α -D-glukopiranozylorafinoza
melibioza **	—
D-glucitol **	—
D-mannoza	α -D-glukopiranozylo- β -D-mannopiranozyd
D-galaktoza	α -D-glukopiranozylo- β -D-galaktofuranozyd
α , β -trehaloza	β -izomaltozylo- α -D-glukopiranozyd
	α -izomaltozylo- β -D-glukopiranozyd
β , β -trehaloza	β -izomaltozylo- β -D-glukopiranozyd
α , α -trehaloza ***	—
maltotrioza	6 ³ -O- α -D-glukopiranozylomaltotrioza*
	6 ¹ -O- α -D-glukopiranozylomaltotrioza*

* produkty akceptorowe działając jako akceptory tworzą serie homologicznych izomaltooligosacharydów;

** struktura produktu akceptorowego nie została określona;

*** produkt akceptorowy nie tworzy się.

Istnieje możliwość regulacji kierunku przenoszenia reszt glukozylowych z sacharozy, dzięki czemu syntezę dekstranu i produktów akceptorowych można prowadzić w sposób kontrolowany. Stwierdzono, że na ilość syntetyzowanego dekstranu oraz na ilość i różnorodność tworzonych produktów akceptorowych wpływają: stosunek stężeń akceptora do sacharozy, stężenie akceptora i sacharozy oraz stężenie enzymu. Według badań Su i Robyta (26), gdy stężenie sacharozy jest stałe i stosunek akceptora do sacharozy wzrasta, wówczas rośnie stężenie, ale maleje różnorodność

produktów akceptorowych i spada ilość syntetyzowanego dekstranu. Natomiast, gdy stosunek akceptora do sacharozy jest stały (1:1) i stężenie ich wzrasta, obniża się ilość produkowanego dekstranu, ale nie maleje ilość i różnorodność wytwarzanych produktów akceptorowych. Na dystrybucję produktów reakcji wpływa również stężenie enzymu w mieszaninie reakcyjnej. Przy wzroście ilości enzymu zawartość syntetyzowanego dekstranu maleje, natomiast wzrasta ilość i różnorodność produktów akceptorowych.

Rodzaj tworzących się produktów akceptorowych zależy również od pochodzenia dekstranosacharazy. Niektóre z nich, np. dekstranosacharaza z *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 obok α -1,6 tworzy znaczną liczbę wiązań α -1,2-glikozydowych, obecnych również w produktach akceptorowych otrzymywanych z udziałem tego enzymu (27).

W ostatnich latach zainteresowanie oligosacharydami rośnie ze względu na prebiotyczne działanie wielu z nich. Do prebiotyków zaliczane są m.in. izomaltooligosacharydy (IMO_s). Jedną z metod ich otrzymywania jest opisane działanie dekstranosacharazy w roztworach sacharozy, w obecności cukrów akceptorowych (tab. 1).

Interesującą alternatywą otrzymywania IMO_s z sacharozy przy udziale dekstranosacharazy jest prowadzenie procesu nie w obecności akceptorów, ale enzymu hydrolizującego dekstran, tj. dekstranazy (EC 3.2.1.11). Dekstranosacharaza łączy reszty glukozy wiązaniem α -1,6-glikozydowym, dekstranaza zaś degradując je uwalnia izomaltooligosacharydy, które mogą być produktami końcowymi lub akceptorami. W zależności od warunków reakcji, np. stężenia sacharozy, można otrzymywać różny skład produktów reakcji: od przewagi glukozy do wyższych IMO_s (28,29).

Izomaltooligosacharydy stanowią również końcowe produkty reakcji hydrolizy enzymatycznej dekstranu z udziałem dekstranazy (30).

W roztworach dekstranosacharazy z sacharozą i fruktozą jako akceptorem tworzy się leukroza, w której glukoza połączona jest z fruktozą wiązaniem α -1,5 (tab. 1). Produktami ubocznymi reakcji tworzenia leukrozy są izomaltuloza i trehaluloza. Rodzaj tworzonego disacharydu zależy od tautomerycznej formy przyłączonej fruktozy. Böker i in. (31) sugerują, że leukroza tworzona jest z piranozowej formy fruktozy, izomaltuloza – tylko z furanozowej, zaś trehaluloza – z obu form. Fruktoza, będąca głównym produktem ubocznym przy syntezie dekstranu, działając jako akceptor reszt glukozydowych obniża wydajność polimeru.

4. Podsumowanie

Dekstranosacharaza, której funkcją *in vivo* jest biosynteza dekstranu z sacharozy w reakcji transglikozylacji, *in vitro* może też katalizować w obecności odpowiednich akceptorów syntezę dekstranu o niskiej masie cząsteczkowej z przedziału wymaganego dla preparatów klinicznych oraz oligosacharydów o różnym stopniu polimeryzacji. Znajomość mechanizmów tych reakcji daje możliwość ich sterowania. W pro-

cesach sterowanej syntezy obok dekstranosacharazy można także wykorzystywać dekstranazę, która działając w tej samej mieszaninie reakcyjnej degraduje tworzący się łańcuch polimeru z uwolnieniem produktów o stopniu polimeryzacji zależnym od stężenia użytego enzymu.

Literatura

1. Alsop R. M., (1983), *Progress Ind. Microb.*, 18, 1-24.
2. Lee S., Choi S., Kim E., Koo Y., (1992), *J. Chem. Tech. Biotech.*, 53, 21-27.
3. Robyt J. F., (1995), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 51, 133-164.
4. Bovey F. A., (1959), *J. Polymer Sci.*, 35, 167-182.
5. Bovey F. A., (1959), *J. Polymer Sci.*, 35, 183-190.
6. Bovey F. A., (1959), *J. Polymer Sci.*, 35, 191-198.
7. Tsychiya H. M., Hellman N. N., Koepsell H. J., (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 2412-2420.
8. Ebert K. H., Schenk G., (1968), *Z. Naturforsch.*, 23b, 788-798.
9. Robyt J. F., Kimble B. K., Walseth T. F., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, 165, 634-640.
10. Robyt J. F., Martin P. J., (1983), *Carbohydr. Res.*, 113, 634-639.
11. Robyt J. F., Taniguchi H., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, 174, 129-135.
12. Robyt J. F., Walseth T. F., (1978), *Carbohydr. Res.*, 61, 433-445.
13. Robyt J. F., Enklund S. H., (1982), *Bioorg. Chem.*, 11, 115-132.
14. Kobayashi M., Yokoyama I., Matsuda K., (1986), *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2585-2590.
15. Ebert K. H., Patat F., (1962), *Carbohydr. Res.*, 17b, 738-745.
16. Fu D., Robyt J. F., (1990), *Carbohydr. Res.*, 20, 93-106.
17. Robyt J. F., Walseth T. F., (1978), *Carbohydr. Res.*, 61, 433-445.
18. Tanriseven A., Robyt J. F., (1993), *Carbohydr. Res.*, 245, 97-104.
19. Tomczak E., Ziobrowski J., (1982), Patent PRL 114 224.
20. Paul F., Oriol E., Auriol D., Monsan P., (1986), *Carbohydr. Res.*, 149, 433-441.
21. Kim D., Day D. F., (1995), *Lett. Appl. Microbiol.*, 20, 268-270.
22. Kim D., Day D. F., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 844-848.
23. Kim D., Deok-Young J., Kwan-Hwa P., Day D. F., (1996), *Biotechnol. Lett.*, 18 (9), 1031-1034.
24. Kim D., Hyun-Chang S., Day D. F., (1996), *Biotechnol. Tech.*, 10 (4), 227-232.
25. Novak L. J., Witt E. E., (1961), Patent USA, 2 972 567.
26. Su R., Robyt J. F., (1993), *Carbohydr. Res.*, 248, 339-348.
27. Paul F., Lopez Munguia A., Remaud M., Pelenc V., Monsan P., (1992), Patent USA, 5 141 858.
28. Monsan P., Paul F., (1995), *FEMS Microb. Rev.*, 16, 187-192.
29. Monsan P., Paul F., Auriol D., (1995), *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 750, 357-363.
30. Brown C. F., Inkerman P. A., (1992), *J. Agric. Food Chem.*, 40, 227-233.
31. Böker M., Jördening H. J., Buchholz K., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 856-864.