

PROPERTIES AND PROSPECTS OF RECEIVING AND APPLICATION OF DEXTRANASES

V. Derkach, V. Krasinko

National University of Food Technologies

Key words:

Dextranase
Glycoprotein
dextranase activity
Producers
Anticavity agent

Article history:

Received 20.12.2012
Received in revised form
25.12.2012
Accepted 20.01.2013

Corresponding author:

E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The main physical and chemical properties of enzymes of dextranases are considered, their amino acid composition is specified, existing types of dextranases and their substratny specificity are described. Biotechnological features of receiving dextranases and their some producers are given. The comparative analysis dextranases activity determination methods are carried out. Importance industrial production adjustment of dextranases pharmaceutical fermental preparations in Ukraine is shown and possibility of their use as anti-cavity protection means is considered.

ВЛАСТИВОСТІ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ОДЕРЖАННЯ І ВИКОРИСТАННЯ ДЕКСТРАНАЗ

В.Ю. Деркач, В.О. Красінько

Національний університет харчових технологій

Розглянуто основні фізико-хімічні властивості ферментів декстраназ, визначено їх амінокислотний склад, описано існуючі типи декстраназ та їх субстратну специфічність. Наведено біотехнологічні особливості одержання декстраназ та деякі їх продуценти. Проведено порівняльний аналіз методів визначення декстраназної активності. Показана важливість налагодження промислового виробництва фармацевтичних ферментних препаратів декстраназ в Україні та оглянуто можливість їх використання як протикарієсного засобу.

Ключові слова: декстраназа, глікопротеїн, декстраназна активність, продуценти, протикарієсний засіб.

Виробництво ферментних препаратів є одним із найважливіших напрямів розвитку біотехнології в світі. З кожним роком зростають об'єми випуску ферментів, розширюється їхній асортимент та сфери використання в харчовій та легкій промисловості, медицині, косметології, аналітичних дослідженнях, сільському господарстві тощо.

Фермент декстраназа, або α -1,6-глюкан-6-глюканогідролаза, (КФ 3.2.1.11) володіє високою специфічністю щодо типів зв'язків між глюкозними залишками. Декстраназа каталізує гідроліз тільки α -1,6-зв'язків виключно у декстрані і олігосахаридів ізомальтозного ряду. Розщеплення манози і α -1,6-зв'язків у точках розгалуження амілопектину і глікогену під дією цієї групи ферментів не відбувається [1, 3, 18].

Вибірковість дії декстранази має важливе значення в медицині, де фармацевтичні препарати декстранази успішно використовуються у стоматології, а також у мікробіологічній промисловості, де α -1,6-глюкан-6-глюканогідролаза застосовується для одержання медичного декстрану (використовують в гематології як замітник плазми крові) шляхом часткового гідролізу високомолекулярного декстрану. З аналітичною метою декстраназа використовується для вивчення структури полісахаридів, що містять α -1,6-глікозидні зв'язки.

Перше повідомлення про існування декстраназ як нової групи ферментів була зроблена Інгельманом у 1948 році. Автор вивчав розщеплення декстрану під дією ферментів із *Cellvibrio fulva* і деяких інших бактерій. Потім було виявлено, що декстранази можуть бути синтезованими також іншими бактеріями (як аеробними, так і анаеробними) за культивування їх на середовищі з декстраном [11].

Вченими була виявлена декстраназна активність у паростках вівса. Було показано, що в'язкість розчину декстрану під дією цього ферменту знижується. Фермент є чутливим до ауксину. Автори дійшли висновку, що у клітинній стінці є схожий з декстраном полісахарид, що і пояснює наявність схожого ферменту, який може діяти на декстран [11, 18].

Інша ферментативна система, яка має декстраназну активність, була виявлена Адроуні та іншими науковцями в кишечнику різних тварин та людини. Виділений фермент мав оптимум рН 6,0 – 6,2 і розщеплював крім декстрану ще і мальтозу, сахарозу, ізомальтозу та крохмаль. Також вдалося відокремити декстраназну активність від амілізної і показати, що декстраназна активність відрізняється за властивостями від сахаразної і мальтазної [11].

Існує два типи декстраназ:

1. Декстранази, які розщеплюють декстран на великі олігосахариди. Під їх дією в'язкість декстрану швидко падає. Основними кінцевими продуктами є ізомальтоза та ізомальтотріоза, іноді ізомальтопентоза. Ці ферменти є ендодекстраназами.

2. Декстранази, які відщеплюють від молекули декстрану глюкозидні залишки. Ці декстранази можна віднести до екзодекстраназ (α -1,6-глюкозидаз).

Деякі бактерії одночасно синтезують два типи декстраназ: ендо- та екзо- типу. Необхідно підкреслити, що перші із них, як правило, продукуються в середовищі, тоді як інші локалізовані всередині клітини. Такий розподіл, очевидно, має фізіологічний сенс — ендодекстранази розщеплюють декстран до олігосахаридів, які можуть проникнути в клітину, де під дією екзодекстраназ вони розщеплюються до глюкози, яку клітина засвоює.

Виключенням є *Cytophaga johnsonii*, у якої декстраназа зв'язана з клітиною, але представляє собою ендодекстраназу. Було показано, що вона локалізована на зовнішній мембрані клітинної оболонки [11].

Однак не всі відомі декстранази можна віднести до одного з наведених типів. Так, наприклад, внутрішньоклітинна декстраназа із ґрунтових бактерій має подвійний механізм дії. На початку процесу гідролізу фермент розщеплює декстран на великі олігосахариди, діючи як ендодекстраназа. Олігосахариди, які утворилися, далі піддаються розщепленню — від нередукуючого кінця відщеплюються глюкозні залишки (за типом екзодекстраназ). В результаті, за тривалої дії ферменту, декстран повністю розщеплюється до глюкози і розгалужених олігосахаридів. Фермент, який було досліджено, був високоочищений; присутність сторонніх речовин автори виключають [11].

Ученими активно досліджуються декстранази мікроміцетного походження [1 – 6, 8 – 10, 12, 13, 23]. Визначено, що в препаратах декстранази мікроміцетів містяться два типи міцно зв'язаних з білком вуглеводів: адсорбовані і зв'язані ковалентно [18, 3]. На 313 амінокислотних залишків молекули декстранази припадає дев'ять залишків нейтральних вуглеводів і три залишки глюкозаміну; галактозамін і глюкоза відсутні повністю.

Дослідження якісного і кількісного складу маноз показали, що декстраназа містить фукозу, галактозу і манозу у співвідношенні 1:2:6, відповідно. З цього випливає, що маноза є компонентом типового глікопротеїну з глікозиламідним типом зв'язку між вуглеводами і білком. Виявлення трьох залишків глюкозаміну в препараті гомогенної декстранази *Penicillium funiculosum* 15 ще більш підтверджує цей висновок [3].

МІКРОБІОЛОГІЯ

Амінокислотний та вуглеводний склад декранази наведено в *таблиці*. Очевидно, цей фермент є типовим глікопротеїном, в якому зв'язки вуглеводів з білком здійснюються через залишки глюкозаміну.

Амінокислотний і вуглеводний склад декстранази мікроміцетів

Амінокислоти	Кількість залишків на молекулу ферменту	Амінокислоти Вуглеводи	Кількість залишків на молекулу ферменту
Гліцин	54	Глутамат	16
Аланін	24	Тирозин	8
Валін	19	Аргінін	4
Лейцин	16	Гістидин	4
Пролін	17	Лізин	8
Ізолейцин	18	Цистеїн	Сліди
Метіонін	5	Триптофан	6
Фенілаланін	9	Маноза	6
Серин	37	Галактоза	2
Треонін	25	Фукоза	1
Аспарагін	42	Глюкозамін	3

Молекулярна маса декстранази складає 34800 – 40000 дальтон, питома активність — близько 1100 од/мг білка, величина молекулярної активності складає $3,48 \cdot 10^4$ зв'язків/хв/моль ферменту. Для карбогідраз, що діють на високомолекулярні вуглеводи, тобто для гліканаз, ця величина лежить в межах $10^2 - 10^4$. Це засвідчує, що активність декстранази знаходиться на самому високому для гліканаз рівні.

У деяких літературних джерелах наводяться дані про те, що питома активність ферменту складає 1100 – 1300 од/мг білку, молекулярна маса 34800 ± 2000 , ізоелектрична точка $pI = 4,25$, оптимальна $pH = 5,0$, відношення гексоз до білку 0,2 – 0,6 мг/мг [3, 13, 18].

Промислове виробництво ферментних препаратів декстраназ здійснюється культивуванням мікроорганізмів, які використовують як джерело вуглецю та енергії декстран та/або кетодекстран. Для збільшення виходу декстранази краще використовувати середовище з кетодекстраном, який є похідним декстрану і характеризується тим, що частина групи $-CH(OH)-$ перетворені в кетонні групи $-CO-$. Кетодекстран можна отримати за допомогою диметилсульфоксиду і ангідриду ортової кислоти. Його вміст у середовищі повинен бути в межах $0,1 \div 10 \%$. За умови використання інших джерел вуглецю синтез ферменту відчутно знижується, що пояснюється інгібуванням його індукції.

Основну групу продуцентів декстраназ становлять міцеліальні гриби родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Spicaria*, *Humicola*, *Sporotrichum*, *Amixiella* та інші. Здатність дріжджів синтезувати декстраназу, головним чином, спостерігається у видів роду *Lipomyces*. Серед актиноміцетів на здатність до синтезу декстранази було досліджено 240 культур роду *Chromogenes*. Як продуценти екзо- та ендодекстраназ використовують представників роду *Bacteroides*, а також бактерії видів *Lactobacillus bifidum* і *Bacillus subtilis* [1, 2, 4, 5, 6, 8, 11].

Активність декстраназ в основному оцінюють за вимірюванням концентрації редуруючих цукрів, що утворюються при гідролізі декстрану. Проте такий метод не можна застосовувати для ферментів, що розщеплюють декстран до продуктів середнього або високого ступеня полімеризації. Нефелометричний та вискозиметричний методи аналізу малочутливі та достатньо трудомісткі, потребують багато часу та препаратів.

Існує нова методика вимірювання активності декстраназ на основі нерозчинного, зафарбованого барвником Remazol Brilliant Blue, субстрату сефадексу G-200. Суть методу заключається в проведенні гідролізу в оптимальних умовах. Проби відбирають через певні проміжки часу. Реакцію зупиняють поміщуючи пробу в киплячу водяну баню на 5 хв. За процесом розщеплення зафарбованого субстрату спостерігають спектрофотометрично. Максимальна оптична густина реєструється при $D_{595 \text{ нм}}$ в 1 см скляній кюветі проти контрольного розчину субстрату без ферменту [16, 18].

Перспективи практичного застосування декстранази полягають у використанні її як компоненту протикарієсних препаратів та композицій для ротової порожнини.

Зубні пасти та зубні гелі зазвичай включають в себе речовини, що виконують функції полірування, піноутворення, ароматизаторів, зволожувачів, підсолоджувачів, відбілювачів тощо. Іншими важливими компонентами, що використовуються по догляду за порожниною рота, є ферменти [19, 20, 21].

Як відомо, провідним етіологічним та патогенетичним фактором розвитку карієсу зубів і гінгівіту є утворення м'якого зубного нальоту, який складається, головним чином, з мікроорганізмів, білків і полісахаридів, зокрема декстранів, що забезпечують адгезію (налипання) зубного нальоту до поверхні зуба з подальшим руйнуванням емалі і утворенням карієсу. Саме завдяки декстрану забезпечується утворення щільного конгломерату мікроорганізмів карієсогенної мікрофлори (каменів) [18, 19].

Фармакологічні властивості декстранази базуються на її здатності каталізувати розщеплення зв'язків декстрану, що входить до складу зубного нальоту. Декстраназа інтенсивно (до 94 %) розщеплює декстран зубного нальоту, має яскраво виражену антибактеріальну дію стосовно карієсогенної мікрофлори [19, 21]. Відомо, що чим вищою є гігієна ротової порожнини, тим кращий стан пародонта. Але навіть регулярне чищення зубів не позбавляє повністю і надовго від зубного нальоту, тим більше, що цукор може залишатися в мікротріщинах ясен. Декстраназа є єдиним засобом, що попереджує утворення зубного нальоту і в цьому сенсі дію препарату можна вважати проривом в області лікування, профілактики карієсу та захворювань пародонту, і саме це вигідно відрізняє декстраназу від інших пропонованих на ринку препаратів.

Застосування препарату з профілактичною метою забезпечує повне зняття зубного нальоту. Запобігає утворенню каменів і карієсу, зміцнює ясна, відбілює зуби, забезпечує 100 % профілактику карієсу у дітей [19].

Наразі у світі виготовляються препарати, що містять у своєму складі декстраназу, а саме: дитяча зубна паста Lion Clinica (Японія), LACALUT Brilliant White (LACALUT Brilliant White Sensitive (30 RDA, для зубів з підвищеною чутливістю емалі)), LACALUT Brilliant White Classic (50 RDA, для нормальної емалі), LACALUT Brilliant White Menta (110 RDA, для курців і любителів кави і чаю), «Декстраназа», «Декстраліз», оральні композиції з поєднанням ферментів декстранази з α -1,3-глюканазою, декстранази з мутаназою.

Висновок

Для задоволення вітчизняних потреб доцільно здійснювати виробництво протикарієсного препарату декстранази в Україні. З огляду на корисні властивості, відсутність побічної дії, економічну доцільність виробництва, декстраназа користуватиметься попитом на ринку вітчизняних фармацевтичних препаратів.

Перспективним напрямом дослідження є поєднання декстранази з іншими ферментами для підвищення якості зняття та розчинення зубного нальоту, що попереджуватиме виникнення карієсу.

Література

1. *Образование* декстраназ мицелиальными грибами и актиномицетами / К.А. Виноградова, Г.А. Черкасова, Л.И. Петрова, [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — 1975. — Т. 9, — № 5. — С. 730 – 734.
2. *Декстраназа* *Fusarium solani* / Т.Н. Данилова, В.И. Максимов, Г.А. Молодова, С.С. Сазонова // Прикладная биохимия и микробиология. — 1978. — Т. 14, № 5. — С. 694 – 697.
3. *Данилова Т.Н.* Углеводный компонент декстраназы *Penicillium funiculosum* / Т.Н. Данилова, В.И. Максимов, Г.А. Молодова // Прикладная биохимия и микробиология. — 1983. — Т. 19, № 1. — С. 104 – 109.
4. *Декстраназная* активность почвенных дрожжей липомицетов / О.Н. Зинченко, А.Н. Лобанок, И.П. Бабьева [и др.] // Микробиология. — 1991. — Т. 60, Вып. 5. — С. 833 – 835.

5. Биосинтез и свойства декстраназы *Lipomyces kononenkoae* / О.Н. Зинченко, А.Г. Лобанок, З.А. Рожкова, В.И. Шишло // Микробиология. — 1989. — Т. 58, № 4. — С. 571 – 575.
6. Зинченко О.Н. Грибная и дрожжевая декстраназы: свойства и перспективы использования в сахарной промышленности / О.Н. Зинченко, А.Г. Лобанок, В.И. Шишло // Прикладная биохимия и микробиология. — 1993. — Т. 29, № 6. — С. 851 – 855.
7. Козинер В.Б. Полисахарид декстран, его биологическое действие и практическое применение / В.Б. Козинер // Успехи современной биологии. — 1966. — Т. 62, № 2 (5). — С. 197 – 214.
8. Лобанок Л.Г. Влияние условий культивирования и состава питательной среды на синтез декстраназы грибом *Aspergillus insuetus* Г-116 / Л.Г. Лобанок, О.Н. Зинченко, В.И. Шишло // Прикладная биохимия и микробиология. 1982. — Т. 18, № 5. — С. 664 – 669.
9. Стабилизация препаратов *Penicillium funiculosum* 15 и *Fusarium solani* при нагревании и лиофилизации / В.И. Максимов, Т.И. Данилова, А.К. Хасирджеева, В.И. Молодова // Прикладная биохимия и микробиология. — 1979. — Т. XV, Вып. 6. — С. 846 – 851.
10. Максимов В.И. Очистка декстраназы *Penicillium funiculosum* / В.И. Максимов, Г.А. Молодова // Прикладная биохимия и микробиология. 1977. — Т. 13, № 3. — С. 452 – 458.
11. Преображенская М.Е. Декстраны и декстраназы / М.Е. Преображенская // Успехи биологической химии. — 1975. — Т. 10, №16. — С. 56 – 60.
12. Петрова Л.И. Синтетическая среда для биосинтеза декстраназы *Penicillium funiculosum* 15 / Л.И. Петрова, Г.А. Молодова // Прикладная биохимия и микробиология. — 1974. — Т. 10, №1 — С. 820 – 825.
13. Петрова Л.И. Условия образования декстраназы *Penicillium funiculosum* 15 / Л.И. Петрова, Г.А. Молодова, Н.Н. Бурцева // Прикладная биохимия и микробиология. — 1975. — Т. 11. — С. 63 – 66.
14. Розенфельд Е.Л. Расщепление декстрана α -1,6-декстранглюкозидазой печени *in vivo* / Е.Л. Розенфельд. // Биохимия. — 1963. — Т. 28, № 3. — С. 552 – 557.
15. Саенко А.С. α -1,6-Декстранглюкозидаза в органах человека / А.С. Саенко // Проблемы гематологии и переливания крови. — 1963. — Т. 8, № 8. — С. 57 – 59.
16. Халикова Э.Ф. Нерастворимый окрашенный субстрат для определения декстраназной активности / Э.Ф. Халикова // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38, № 1. — С. 103 – 107.
17. Чопик О.В. Применение фермента декстраназы на свекловичном заводе в Шибере / О.В. Чопик // Сахарная промышленность. — 1985. — № 4. — С. 52 – 53.
18. Khalikova E. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and application / E. Khalikova, P. Susi, T. Korpela // Microbiology and molecular biology reviews. — June, 2005, p. 306 – 325.
19. Pat. 6254856 B1 USA. Compositions for the removal of dental plaque / Rie Tsuchiya — Publ. 03.06.2001.
20. Pat. 3627643 USA, CO7g7/028. Method of producing dextranase / John P. Viccaro, John M. Weaver — Publ. 16.05.1972
21. Pat. 4438093 USA, A61K7/28. Oral composition containing dextranase and α -1,3 glucanase and a method for preventing and suppressing oral diseases using the same / Kazuo Shimada, Masami Sudo — 20.04.1984
22. Pat. 6156553 USA, C12N 9/46. Recombinant enzyme with dextranase activity / Tove Christensen, Claus Crone Fuglsang, Charlotte Johansen — Publ. 05.12.2000
23. Zhang H, Wu D, Huang L, Hu X, Wang X. Purification, characterization of an extracellular dextranase from an isolated *Penicillium sp.* 2011 Apr; 51(4):495 – 503.
24. Maina NH, Virkki L, Pynnönen H, Maaheimo H, Tenkanen M. Structural analysis of enzyme-resistant isomaltooligosaccharides reveals the elongation of α -(1 $\rightarrow$ 3)-linked branches in *Weissella confusa* dextran // Biomacromolecules. 2011 Feb 14;12(2):409-18. Epub 2011 Jan 5 PMID: 21207960 [PubMed — indexed for MEDLINE]

СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ДЕКСТРАНАЗ

В.Ю. Деркач, В.О. Красинько

Национальный университет пищевых технологий

Рассмотрены основные физико-химические свойства ферментов декстраназ, определен их аминокислотный состав, описаны существующие типы декстраназ и их субстратная специфичность. Приведены биотехнологические особенности получения декстраназ и некоторые их продуценты. Проведен сравнительный анализ методов определения декстраназной активности. Показана важность налаживания промышленного производства фармацевтических ферментных препаратов декстраназ в Украине и рассмотрена возможность их использования как противокариесного средства.

Ключевые слова: *декстраназа, гликопротеин, декстраназная активность, продуценты, противокариесное средство.*