

TARTU ÜLIKOO
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Anneli Aasamets

**Levaansukraas Lsc3 polümeriseerijana: reaktsioonitingimuste
optimeerimine soovitud produktide sünteesiks**

Bakalaureusetöö

Juhendajad
dotsent Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat
teadur Triinu Visnapuu, PhD

TARTU 2013



Euroopa Liit
Euroopa
Regionaalarengu Fond



Eesti tuleviku heaks

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1. Bakterite levaansukraasid. Levaan ja inuliin.	5
1.2. Levaansukraaside biokeemilised omadused	8
1.3. Levaansukraasi reaktsiooniproductide hulga ja spektri sõltuvus ensüümist ja reaktsioonitingimustest	10
1.4. Levaani ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidide kasutamine ja tootmine.....	12
2. EKSPERIMENTAALOSA	14
2.1. Töö eesmärgid.....	14
2.2. Materjal ja meetodika	14
2.2.1. Transformantide kasvatus ja levaansukraasi ekspresseerimine	14
2.2.2. Rakuekstrakti tegemine ja levaansukraasi puhastamine Ni ²⁺ -afiinsuskromatograafiaga	15
2.2.3. Gelelektroforees	16
2.2.4. Levaansukraasi aktiivsuste määramine	16
2.2.5. Levaani tekke ja kineetiliste parameetrite määramine	18
2.2.6. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia	18
2.3. Tulemused ja arutelu.....	19
2.3.1. Temperatuuri mõju levaansukraasi polümeriseerivale aktiivsusele.....	20
2.3.2. Ensüümi koguse optimeerimine levaani ja FOS-ide sünteesiks	22
2.3.3. Substraadi kontsentratsiooni optimeerimine soovitud produktide sünteesiks	26
2.3.4. Levaani sünteesi kineetilised parameetrid	27
2.3.5. Glükoosi inhibeeriva toime uurimine levaani sünteesile	28
KOKKUVÕTE	30
SUMMARY	32
KASUTATUD KIRJANDUS	34
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	39
LISA 1	40
LIHTLITSENTS.....	42

KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsilliin

Da – dalton

DP – polümeerisatsiooniaste (*degree of polymerization*)

ELS – *evaporative light-scattering*

FFI – *Functional Food Ingredients*

FOS – fruktooligosahhariid

Fru – fruktoos

FTF – fruktosüültransferaas

GH – glükosiidi hüdrolaas

Glc – glükoos

HPLC – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (*high-performance liquid chromatography*)

IPTG – isopropüül- β -D-1-tiogalaktopüranosiid

K_m – Michaelis’*e* konstant, mis näitab ensüümi afiinsust substraadile (mM)

Lev – *Lactobacillus reuteri* levaansukraas

LevU – *Zymomonas mobilis*’*e* levaansukraas

Lsc – *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (431 aminohapet)

lsc3 – *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 levaansukraasi Lsc3 geen

Lsc2 – *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 levaansukraas (415 aminohapet)

Lsc3 – *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 levaansukraas (431 aminohapet)

LsrA – *Rahnella aquatilis*’*e* levaansukraas

OD – optiline tihedus (*optical density*)

pv. – patovar; grupp tüvesid, kes nakatavad teatud peremeestaime

SacB – *Bacillus subtilis*’*e* või *B. megaterium*’*i* levaansukraas

SDS-PAGE – Na-dodetsüülsulfaat-polüakrüülamiidgeelelektroforees

TA – transfruktosüleeriv ehk polümeriseeriv aktiivsus (%)

TAE – Tris-atsetaat-EDTA

TEV – tubakaviirus (*tobacco etch virus*)

TLC – õhukese kihi kromatograafia (*thin layer chromatography*)

V_{max} – levaani tekke maksimaalne reaktsioonikiirus (mg/mg x min)

SISSEJUHATUS

Levaansukraas on bakteriaalne eksoensüüm, mis sünteesib substraadist, milleks on peamiselt sahharoos, β -2,6 sidemega fruktaane, nii levaani kui ka fruktooligosahhariide (FOS-e). Paljud taimed ja ka mõned seened ning bakterid toodavad β -2,1 sidemetega fruktaane – inuliini ja FOS-e. Fruktaanidel on mitmeid kasulikke toimeid ja rakendusi. Seni on fruktaanide bioloogilisi efekte uuritud peamiselt inuliinil ja inuliini-tüüpi FOS-idel. Inuliini-tüüpi fruktaane kasutatakse prebiootilise toidulisandina. Kuigi levaani-tüüpi fruktaanide prebiootilisust on seni väga vähe uuritud, on näidatud, et levaani-tüüpi FOS-id on veelgi tõhusama prebiootilise toimega kui inuliini-tüüpi FOS-id. Levaanil on potentsiaalseid kasutusvõimalusi ka toiduainetööstuses, meditsiinis ja kosmeetikas. Levaani turuhind on aga kõrge ja levaani-tüüpi FOS-ide prepaate ei ole praegu kommertsiaalselt saadaval.

Oma bakalaureusetöö tegin projekti „*Design and application of novel levansucrase catalysts for the production of functional food ingredients (Functional Food Ingredients, FFI)*“ SLOMR12215T raames, mille eesmärk on otsida rakendust meie töögrupis isoleeritud *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasile Lsc3, mis on katalüütiliselt väga aktiivne ja stabiilne ning sünteesib sahharoosist nii polümeerset levaani kui ka FOS-e. Projekti eesmärgiks on levaani ja FOS-ide süntees, puhastamine ja nende erinevate kasutusvõimaluste katsetamine. FOS-ide puhastamiseks on tarvis reaktsiooni kõrvalprodukt glükoos reaktsioonisegust eemaldada. Kahjuks on see töömahukas ja keeruline protsess. Alternatiiviks oleks levaani-tüüpi FOS-ide tootmine polümeersest levaanist selle hüdrolyüsil.

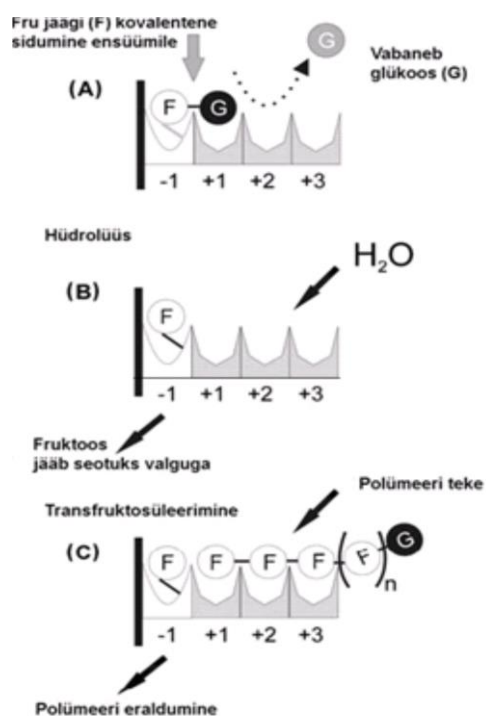
Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli optimeerida reaktsioonitingimusi, mis võimaldaksid Lsc3 valguga sünteesida võimalikult palju levaani. Lisaks erinevatel tingimustel levaani sünteesitaseme hindamisele plaaniti mõõta ka Lsc3 reaktsioonis moodustunud FOS-ide ja jääksahharoosi hulka ning hinnata glükoosi mõju reaktsioonikiirusele. Minu töö eesmärgid on põhjalikumalt kirjeldatud peatükis 2.1.

Töös saadud tulemusi kasutatakse edaspidi FFI projektis levaani ja FOS-ide sünteesitingimuste valimisel. Tulemused pakuvad ka teoreetilist huvi, sest *P. syringae* tüvede levaansukraase ei ole varem sellest aspektist uuritud ning nende reaktsiooniprodukte ei ole kvantiteeritud. Töö tehti TÜMRI Geneetika õppetoolis. Täna oma juhendajaid Triinu Visnapuud ja Tiina Alamäed, kes olid abiks töö planeerimisel ja koostamisel. Lisaks soovin tänada teisi TÜMRI töötajaid ja Heiki Vijat Tallinna Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudist, kes töö valmimisele kaasa aitasid.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Bakterite levaansukraasid. Levaan ja inuliin.

Levaansukraas (EC 2.4.1.10) on bakteriaalne eksoensüüm, mis kuulub glükosiidi hüdrolaaside perekonda 68 (GH68) (www.cazy.org). GH68 perekond koondab endas bakteriaalseid fruktosültransferaase (FTF), mis sünteesivad β -sidemega fruktaane – fruktoosijääkidest koosnevaid oligo- ja polüsahhariide. Neid suhkruid toodetakse peamiselt sahharoosist. Levaansukraas lõhub substraadimolekulis fruktoosi- ja glükosijäägi vahelise glükosiidsideme ja kasutab selle reaktsiooni käigus vabanenud energiat polümeriseerimiseks (joonis 1 A). Ensüümi aktiivtsentrisse seondunud fruktoosijääk liidetakse aktseptoriga. Kui aktseptoriks on vesi, toimub substraadi hüdrolüüs, kui sahharoos või fruktaanahelad, toimub fruktooligosahhariidide või levaani süntees (joonis 1 B, C). Kui aktseptorsaiti seondub glükos, toimub vahetusreaktsioon ja moodustub uuesti sahharoos (Hettwer *et al.*, 1995; Yun, 1996; Ozimek *et al.*, 2006; Velázquez-Hernández *et al.*, 2009).



Joonis 1. Levaansukraasi reaktsioonid.

(A) Sahharoos (FG) seondub ensüümi aktiivtsentri -1 ja +1 alapiirkondadesse, glükosiidside sahharoosi molekulis lõhutakse ja vabaneb glükos.

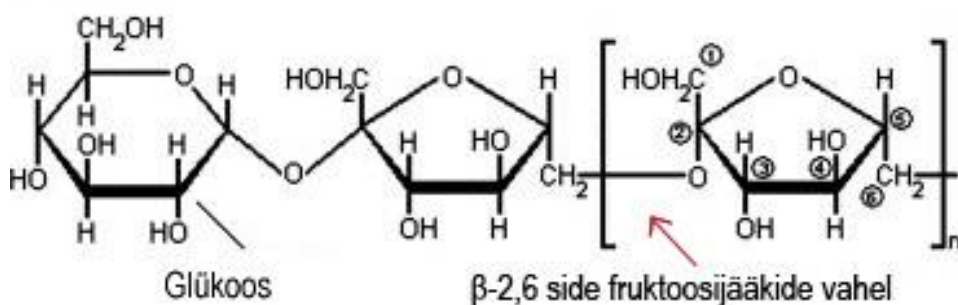
(B) Fruktosijääk liidetakse veele (hüdrolüüs).

(C) Fruktosijääk liidetakse fruktaanile, mis seondub aktiivtsentri piirkondadesse +1 +2 +3 ja toimub polümeriseerimine.

Joonis pärineb artiklist Ozimek *et al.*, 2006 ning lisatud on eestikeelsed selgitused.

Levaansukraasi polümerisatsiooniproduktideks on lühikese ahelaga fruktooligosahhariidid (FOS-id) ja polümeerne levaan (Ozimek *et al.*, 2006; Visnapuu *et al.*, 2009; Lammens *et al.*, 2009). Levaansukraas sünteesib β -2,6 sidemega fruktaane (joonis 2), mis erinevad taimede inuliini-tüüpi fruktaanidest, milles on fruktoosi jääkide vahel β -2,1 side (Banguela ja Hernández, 2006). Inuliin ja levaan erinevad ka ahela pikkuse (molekulmassi) poolest.

Inuliini polümeerisatsiooniate (DP) on suhteliselt madal. Näiteks siguri (*Cichorium intybus*) juurtest ja mugulpäevalildest (*Helianthus tuberosus*) eraldatud inuliini DP on 10-30. Korvõieliste taimede hulgas on suurima DP-ga inuliin (DP kuni 200) eraldatud artishokist (*Cynara scolymus*) (Praznik ja Beck, 1985; Hellwege *et al.*, 2000; Banguela ja Hernández, 2006). Levaani polümeerisatsiooniate on enamasti suurem kui inuliinil ja see sõltub ka konkreetsest levaansukraasist. Levaani molekulmass võib olla enam kui 1×10^5 daltonit (Da) (Vijn ja Smeekens, 1999). *P. syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 levaani keskmine polümeerisatsiooniate, määratuna glükoosi ja fruktoosi sisalduse järgi hüdrolüüsitud levaanis, oli 100 (Visnapuu *et al.*, 2008).



Joonis 2. Levaani struktuur ja sideme tüüp. Levaani ahel algab glükoosijäägiga, mis pärineb esimesest aktseptorina kasutatud sahharoosist. Tähistatud on glükoosijääk ja fruktoosijääkide vaheline β-2,6 side. Joonis on võetud artiklist Arvidson *et al.* (2006).

Levaansukraase leidub paljudes bakterites, nii grampositiivsetes kui ka -negatiivsetes. Grampositiivsetest bakteritest on levaansukraasid näiteks liikidel *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. reuteri*. Gramnegatiivsetest bakteritest toodavad seda valku näiteks *Zymomonas mobilis*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Rahnella aquatilis* ja *Pseudomonas syringae* tüved. Ka halofiilsete arhede (näiteks *Halorubrum lacusprofundi*, *Haloalkalicoccus jeotgali* ja *Haloarcula marismortui*) genoomis kodeeritakse levaansukraase (www.cazy.org; www.brenda-enzymes.org).

Kuigi erinevate mikroobide levaansukraasidel on konserveerunud katalüüsis ja substraadi sidumises osalevad aminohapped, on järjestustes ka varieeruvaid piirkondi ja valkude suurused on bakteriliigiti erinevad. Gramnegatiivsete bakterite levaansukraasid on enamasti väiksemad kui grampositiivsete bakterite vastavad valgud. Näiteks grampositiivsete bakterite *L. sanfranciscensis* ja *L. reuteri* levaansukraasid on vastavalt 879 ja 804 aminohappe pikkused (van Hijum *et al.*, 2004; Tieking *et al.*, 2005), kuid gramnegatiivsete *P. syringae* patovaride levaansukraaside pikkused on kas 415 või 431 aminohapet (Visnapuu *et al.*, 2008;

Visnapuu, 2012). Ensüümi rakust välja suunamiseks on grampositiivsete bakterite levaansukraasidel N-terminaalne signaalpeptiid, mis membraani läbimisel ensüümilt eemaldatakse (Hernández *et al.*, 1999; van Hijum *et al.*, 2006). Gramnegatiivsete bakterite levaansukraasidel on taoline singaalpeptiidist sõltuv sekretsioonimehhanism tuvastatud ainult *G. diazotrophicus*'e levaansukraasil (Hernández *et al.*, 1999). Grampositiivsete bakterite levaansukraasi tööks on vajalikud Ca²⁺ ioonid, mis stabiliseerivad ensüümi struktuuri. Selline kaltsiumi siduv piirkond gramnegatiivsete bakterite levaansukraasidel puudub (Martinez-Fleites *et al.*, 2005; van Hijum *et al.*, 2006).

Levaansukraasid võiksid olla mikroobidele vajalikud mitmetel erinevatel põhjustel. Enamus fruktaane sünteesivad mikroobe elab koos eukarüootsete organismidega. Levaani toodavad ka mitmed taimepatogeendid. On välja pakutud, et taimehaigusi põhjustavatel bakteritel, sh. *P. syringae* tüvedel, on levaani süntees oluline patogeeni säilumiseks taime pinnal ja varajases nakatamisfaasis, kaitstes bakterit taime kaitsemehhanismide eest (Hettwer *et al.*, 1995; Li ja Ullrich, 2001). *Erwinia amylovora* põhjustab pirnipuudel bakterpõletikku ja kudede nekroosi (Geier ja Greider, 1993). See bakter on seni ainuke patogeen, kellel on näidatud levaansukraasi roll taimehaiguse kujunemises – levaansukraasnegatiivsed *E. amylovora* variandid osutusid tunduvalt vähem virulentseteks (Koczan *et al.*, 2009). Lisaks kasutavad mitmed mikroobid fruktaane pindadele kinnitumiseks ja biokile moodustamiseks. Suuõõnes elavate bakterite *Streptococcus gordonii* ja *S. salivarius*'e fruktaanid osalevad hambakatu moodustumises ja kaariese tekkes (Rozen *et al.*, 2001; Song ja Jacques, 1999). Mullabakter *B. subtilis* kasutab levaani mullaosakestele kinnitumiseks ja toksiliste ainete sidumiseks (Ben Ammar *et al.*, 2002).

Mõned fruktaane sünteesivad bakterid on taimede sümbiondid. Näiteks *G. diazotrophicus* on sümbioosis suhkrurooga ja ta sünteesib sahharoosist FOS-e, mis võiksid osaleda substraadina taimefruktaanide sünteesil (Hernández *et al.*, 1995). Fruktaanid on mikroobidele olulised ka keskkonnastressiga toimetulekuks. Arvatakse, et sarnaselt taimedele on ka bakterite jaoks fruktaanid kaitsva toimega kuivastressi korral, stabiliseerides rakumembraane (Valluru ja Van den Ende, 2008; Livingston *et al.*, 2009). Paljud levaani sünteesivad bakterid näiteks *G. diazotrophicus* ja *Geobacillus stearothermophilus* suudavad seda ka lagundada, sest lisaks levaansukraasile ekspresseerivad nad ka levanaasi. Sageli on levaansukraasi ja levanaasi geenid genoomis kõrvuti, moodustades operoni (Li *et al.*, 1997; Menéndez *et al.*, 2002). Seega võiks levaani käsitleda ka kui bakterite rakuvälist varuainet, mida hakatakse nälja korral kasutama.

1.2. Levaansukraaside biokeemilised omadused

Rakuvälised levaansukraasid on vastupidavad varieeruvatele keskkonnatingimustele. Enamasti on erinevatest mikroobidest pärit levaansukraasid stabiilsed temperatuurivahemikus 4-50°C (Song *et al.*, 1998; Ben Ammar *et al.*, 2002; Esawy *et al.*, 2008; Waldherr *et al.*, 2008) ja nende temperatuurioptimumid substraadi hüdrolüüsiks jäävad vahemikku 30-60°C (Sangiliyandi *et al.*, 1999; Baciu *et al.*, 2005; Ozimek *et al.*, 2005; Homann *et al.*, 2007). pH vahemik, milles antud ensüümid katalüüsivad, on samuti üsna lai, 3.0-8.0 (Esawy *et al.*, 2008; Rairakhwada *et al.*, 2010). *B. subtilis*'e ja *Z. mobilis*'e levaansukraasidel on kõrgeim sahharoosi lõhustav aktiivsus kergelt happelises piirkonnas (pH 5-6) (Jang *et al.*, 2001; Esawy *et al.*, 2008) (tabel 1).

Levaansukraasid taluvad hästi ka kõrgeid temperatuure (Hettwer *et al.*, 1995; Visnapuu *et al.*, 2011; Visnapuu, 2012) ning raskemetalliioone ja detergente (Hernández *et al.*, 1995; Hettwer *et al.*, 1995; Sangiliyandi *et al.*, 1999; Esawy *et al.*, 2008; Visnapuu, 2012). Lisaks on paljud levaansukraasid pikemaajalisel säilitamisel väga stabiilsed: näiteks *P. syringae* pv. phaseolicola levaansukraas ei kaotanud temperatuuril 4°C aktiivsust 6 kuu jooksul (Hettwer *et al.*, 1995). *P. syringae* pv. tomato levaansukraas Lsc3 püsis temperatuuril 37°C aktiivsena 30 päeva ja temperatuuril 4°C vähemalt 6 kuud (Visnapuu *et al.*, 2011).

Peamise substraadina kasutab levaansukraas sahharoosi (α -Glc-(1,2)- β -Fru). K_m väärtused sahharoosile on erinevatel ensüümidel erinevad, kuid enamasti on need vahemikus 6.6 kuni 50 mM (tabel 1), mis näitab kõrget kuni mõõdukat afiinsust (Ben Ammar *et al.*, 2002; Homann *et al.*, 2007; Waldherr *et al.*, 2008). On ka levaansukraase, mille afiinsus sahharoosile on palju madalam: näiteks *P. syringae* pv. phaseolicola levaansukraasi K_m sahharoosile on 160 mM (Hettwer *et al.*, 1995) (tabel 1). Lisaks sahharoosile saavad mitmed levaansukraasid kasutada substraadina ka rafinoosi (van Hijum *et al.*, 2004; Trujillo *et al.*, 2004; Visnapuu *et al.*, 2008) ja stahhüoosi (Yanase *et al.*, 2002; Visnapuu *et al.*, 2011). Levaansukraaside substraadid on näidatud joonisel 3.

Sahharoos

α -Glc-(1,2)- β -Fru

Rafinoos

α -Gal-(1,6)- α -Glc-(1,2)- β -Fru

Stahhüoos α -Gal-(1,6)- α -Gal-(1,6)- α -Glc-(1,2)- β -Fru

Joonis 3. Levaansukraaside substraadid. Nende identne osa on näidatud punase kirjaga.

Lisaks erinevatele afiinsustele, on erinev ka levaansukraaside substraadispetsiifika. Näiteks *P. syringae* pv. tomato levaansukraas Lsc3 eelistab sahharoosi rafinoosile ja stahhüoosile (Visnapuu *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2011), kuid *Z. mobilis*'e levaansukraas lõhustab

suurema efektiivsusega hoopis rafinoosi (Yanase *et al.*, 2002). *P. syringae* pv. *phaseolicola* levaansukraas ei suuda seevastu rafinoosi üldse kasutada (Hettwer *et al.*, 1995).

Tabel 1. Erinevate bakterite levaansukraaside biokeemiliste omaduste võrdlus.

Bakter (levaansukraas)	K _m sahharoosile (mM)	Optimumtemperatuur (°C)		pH optimum sahharoosi lõhustamiseks	Viide
		sahharoosi lõhustamiseks	levaani sünteesiks		
<i>B. megaterium</i> (SacB)	6.6	45	em	6.6	(1)
<i>B. subtilis</i> (SacB)	8	em	30	6	(2 ja 3)
<i>L. reuteri</i> (Lev)	9.7	50	em	4.5-5.5	(4)
<i>P. syringae</i> pv. tomato (Lsc3)	18.5	60	20	6	(5 ja 6)
<i>R. aquatilis</i> (LsrA)	50	50	20	6	(7 ja 8)
<i>Z. mobilis</i> (LevU)	125	50	30	5	(9 ja 10)
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> (Lsc)	160	60	18	5.8-6.6	(11)

(1) Homann *et al.*, 2007; (2) Abdel-Fattah *et al.*, 2005; (3) Ortiz-Soto *et al.*, 2008; (4) van Hijum *et al.*, 2004; (5) Visnapuu *et al.*, 2011; (6) Visnapuu, 2012; (7) Ohtsuka *et al.*, 1992; (8) Song *et al.*, 1998; (9) Sangiliyandi *et al.*, 1999; (10) Yanase *et al.*, 2002; (11) Hettwer *et al.*, 1995.

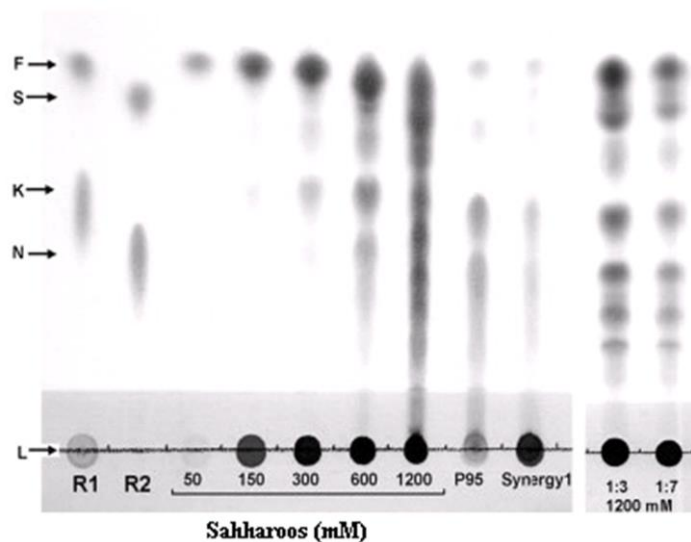
Levaansukraasi reaktsioonis moodustub kõrvalproduktina glükoos (joonis 1 A). On näidatud, et glükoos inhibeerib levaansukraasi polümeriseerivat aktiivsust (Lyness ja Doelle, 1983; Hettwer *et al.*, 1995; Ananthalakshmy ja Gunasekaran, 1999). *P. syringae* pv. *phaseolicola* ja *Z. mobilis*'e levaansukraaside aktiivsus oli täielikult inhibeeritud kui reaktsioonisegusse oli lisatud 30 mM glükoosi (Lyness ja Doelle, 1983; Hettwer *et al.*, 1995). Üheks seletuseks, miks glükoos levaansukraasi tööd inhibeerib, võib olla glükoosi seostumine levaansukraasi aktiivsaiidi +1 alapiirkonda (joonis 1) ja seeläbi konkureerimine teiste fruktosüüli aktseptoriga (sahharoos või fruktaanid) seostumise koha pärast. Seetõttu võiks glükoosi eemaldamine reaktsioonisegust olla soodne ensüümi maksimaalse aktiivsuse säilitamisel ja selle kasutamisel pidevprotsessides. Kirjanduse andmetel saavutati suurem kogus

reaktsiooniprojekte, kui levaansukraasi reaktsioonisegusse lisati glükoosi oksüdaasi, mis oksüdeerib reaktsioonis tekkiva glükoosi glükoonhappeks (Han *et al.*, 2009).

1.3. Levaansukraasi reaktsiooniprojektide hulga ja spektri sõltuvus ensüümist ja reaktsioonitingimustest

Ensüümi päritolu mõjutab nii reaktsiooniprojektide hulka kui ka spektrit. Lisaks sõltuvalt konkreetsest levaansukraasist varieerub sünteesitud levaani molekulmass. Näiteks *B. subtilis*'e ja *B. megaterium*'i levaansukraasid on kõrge protsessiivsusega – nad moodustavad põhiliselt pika ahelaga levaani (Chambert *et al.*, 1974; Homann *et al.*, 2007), samas sünteesib *G. diazotrophicus*'e levaansukraas põhiliselt lühikesi FOS-e (Hernández *et al.*, 1995). *L. reuter*'i levaansukraas toodab suure molekulmassiga (90-100 kDa) levaani, kuid mõne gramnegatiivse bakteri sünteesitud levaan on suhteliselt väikese molekulmassiga (50-60 kDa) (Yanase *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 1995; van Hijum *et al.*, 2001). Lisaks on sünteesitavate FOS-ide spekter ensüümiti erinev. Näiteks *B. megaterium*'i ja *Z. mobilis*'e levaansukraasid toodavad lisaks levaanile põhiliselt trisahhariide 1-kestoosi, 6-kestoosi (joonis 5) ja neokestoosi (Homann *et al.* 2007; Bekers *et al.*, 2002; Vigants *et al.*, 2013), *B. megaterium*'i levaansukraas sünteesib lisaks veel tetrasahhariidi nüstoosi (Homann *et al.*, 2007).

Reaktsiooniprojektide kogust ja mustrit mõjutab temperatuur, keskkonna pH ja substraadi kontsentratsioon reaktsioonisegus. On näidatud, et projektide mustrit mõjutab eelkõige substraadi kontsentratsioon: madalatel kontsentratsioonidel on eelistatud sahharoosi hüdroolüüs ja kõrgetel fruktaanide süntees (Chambert ja Petit-Glatron, 1991; Hernández *et al.*, 1995). Mida kõrgem on substraadi kontsentratsioon, seda rohkem sünteesitakse FOS-e. Näiteks *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgul on uuritud levaani ja FOS-ide sünteesi sahharoosi kontsentratsioonidel 50, 150, 300, 600 ja 1200 mM ja temperatuuril 37°C. Projektide spektrit analüüsiti õhukese kihi kromatograafiaga (TLC) (joonis 4). 50 mM sahharoosist moodustus väga vähe levaani ja TLC plaadil oli näha fruktoosi, mis näitab seda, et toimus sahharoosi hüdroolüüs. 150 mM sahharoosist moodustus rohkem levaani, kuid FOS-ide teket ei olnud veel näha. 300 mM sahharoosist moodustus lisaks levaanile ka kestoosi ning kõrgematel kontsentratsioonidel kui 600 mM moodustus sahharoosist lisaks levaanile näha ka pikema ahelaga FOS-e (Visnapuu *et al.*, 2009). Levaani eelistatud sünteesi madalamal sahharoosi kontsentratsioonil (~250 mM) on näidatud ka *P. syringae* pv. phaseolicola levaansukraasil (Hettwer *et al.*, 1995).



Joonis 4. Lsc3 reaktsiooniproduktide lahutamine õhukese kihi kromatograafiaga (TLC). ~10 µg/ml Lsc3 reageeris erineva koguse sahharoosiga (50, 150, 300, 600 ja 1200 mM) temperatuuril 37°C McIlvaine'i puhvris (pH 6.0). 0.5 µl lahjendamata või 1:3 või 1:7 lahjendatud proovi kanti stardijoonele. Võrdluseks kanti stardijoonele sama kogus oligo- ja polüfruktaanide preparaate (OraftiP95 (P95), OraftiSynergy1 (Synergy1)) ja markersuhkruid (R1: 0.1 M fruktoos (F), 0.1 M 1-kestos (K), 2% levaan (L); R2: 0.1 M sahharoos (S), 0.1 M nüstoos (N)). Joonis pärineb artiklist Visnapuu *et al.* (2009).

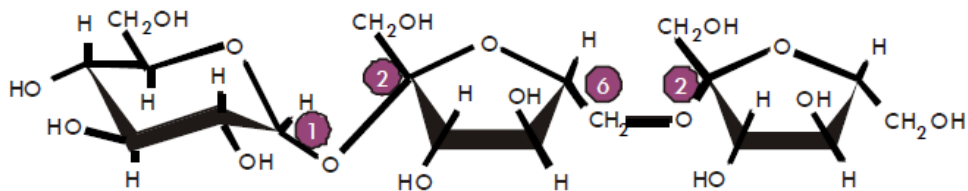
Temperatuur mõjutab reaktsiooniproduktide teket erinevate levaansukraaside puhul erinevalt. Enamasti kehtib seaduspärasus, et polümeriseerivat aktiivsust soodustab madalam ja hüdrolüüsivat aktiivsust kõrgem temperatuur. Näiteks *P. syringae* pv. *phaseolicola* levaansukraasil oli levaani sünteesiks sobivaim temperatuur 18°C, sahharoosi lõhustamiseks aga 60°C (Hettwer *et al.*, 1995). *Z. mobilis*'e levaansukraasil on vastavad optimumid 30°C ja 50°C (Sangiliyandi *et al.*, 1999). Immobiliseeritud *Z. mobilis*'e levaansukraasil on näidatud, et optimumtemperatuur levaani sünteesiks on 4°C (Hettwer *et al.*, 1995; Jang *et al.*, 2001). *B. subtilis*'e ja *Z. mobilis*'e levaansukraas toodab enim FOS-e suurte substraadi kontsentratsioonidel ja kõrgel temperatuuril (Belghith *et al.*, 1996; Euzenat *et al.*, 1997). Sarnaselt temperatuuri mõjule, on ka pH mõju reaktsiooniproduktide hulga ja spektrile sõltuv konkreetsest ensüümist. Näiteks *Z. mobilis*'e levaansukraasi hüdrolüüsivat aktiivsust soodustab pH väärtus üle 7.0 ja põhiliselt sünteesitakse levaani, kui pH langeb alla 6.0 (Goldman *et al.*, 2008). *L. panis*'e levaansukraasi hüdrolüüsiv aktiivsus on suurem, kui pH väärtus on alla 3.0 (Waldherr *et al.*, 2008), aga see võib olla osaliselt seletatav ka substraadi keemilise hüdrolüüsiga happelistes tingimustes.

Kokkuvõtteks võiks öelda, et erinevate bakterite levaansukraasidel on küllalt erinevad biokeemilised omadused. Levaansukraaside puhul ei ole veel selge, millised valgupiirkonnad

ja aminohapped määravad ära reaktsiooniproductide mustri – millises vahekorras moodustub polümeerset levaani, fruktooligosahhariide ja fruktoosi (Meng ja Fütterer, 2003; Martinez-Fleites *et al.*, 2005). Levaansukraasidel on siiski kirjeldatud mutante, mis on praktiliselt kaotanud levaani moodustamise võime ja sünteesivad vaid oligosahhariide (Homann *et al.*, 2007; Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Kahjuks on nende ensüümide katalüütiline aktiivsus tugevasti langenud ja seetõttu ei ole neid võimalik kasutada tööstuslikuks FOS-ide tootmiseks (vt. pt. 1.4.). Siiski on näidatud, et reaktsioonitingimusi varieerides saab levaansukraasidel mõjutada reaktsiooni kulgu ja erineva ahelapikkusega productide moodustumist. Seega saaks reaktsioonitingimuste optimeerimisega saavutada soovitud nihet productide spektris, näiteks sünteesida rohkem levaani või rohkem FOS-e. Kuna aga ensüümid on küllaltki erinevate omadustega, tuleb neid tingimusi optimeerida igale konkreetsele ensüümile.

1.4. Levaani ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidide kasutamine ja tootmine

Levaansukraasi reaktsiooniproductidel – oligo- ja polüfruktaanidel – on mitmeid kasutusvõimalusi meditsiinis, toiduainetööstuses ja kosmeetikas. FOS-id pakuvad eelkõige huvi oma prebiootilise toime poolest ja neid saab kasutada funktsionaalsete toidulisanditena. FOS-id on inimesele seedumatud ja jämesoolde jõudes soodustavad nad kasulike bakterite (nt. bifidobakterite) paljunemist (Marx *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 2010; Roberfroid *et al.*, 2010). Siiani on enim uuritud inuliini-tüüpi FOS-ide prebiootilist efekti, sest neid on lihtne siguri ja daalia juurtest eraldatud inuliinist tööstuslikult toota (<http://www.orafti.com/>). Substraadi kättesaadavus ja hind on ka üks peamisi põhjuseid, miks vastavate FOS-ide mõju soolemikroobide kooslustele on palju enam uuritud kui levaani-tüüpi FOS-ide omi. Kirjanduses viidatakse peamiselt tööle Marx *et al.* (2000), milles näidati, et β -2,6 sidemega levaani-tüüpi FOS-id on bifidobakteritele tõhusama prebiootilise toimega kui β -2,1 sidemega FOS-id. Selle uurimuse jaoks valmistati levaanitüüpi FOS-id *Z. mobilis*'e rakkudega sünteesitud levaanist, mida hüdrolüüsi lühiajaliselt väävelhappega ja hüdrolüüsiproductide hulgast eraldati sobiva ahelapikkusega FOS-id (Marx *et al.*, 2000). Lühima ahelaga levaanitüüpi FOS on 6-kestoos (joonis 5). 6-kestoosi sünteesivad sahharoosist ka mõne seeneliigi invertaasid ja neid valke on muteeritud, et suurendada 6-kestoosi saagist (Lafraya *et al.*, 2011; Abreu *et al.*, 2013).



Joonis 5. Lühim levaanitüüpi FOS, 6-kestos (Banguela ja Hernández, 2006). Näidatud on molekuli struktuur ja sidemes osalevad süsinikud.

Levaani-tüüpi FOS-ide tegemine levaanist on praeguse seisuga kallis ja pole majanduslikult mõttekas. Selle aasta kataloogihindade kohaselt maksab 1 g *Erwinia herbicola* (praegune nimi *Pantoeae agglomerans*) levaani 263 eurot ja 1 g *Z. mobilis*'e levaani 205 eurot. Kui võrdluseks võib tuua daalia mugulatest puhastatud inuliini hinna, siis see on 192 eurot 100 g kohta (<http://www.sigmaaldrich.com/>). Seega oleks vaja otsida odavamaid võimalusi levaani sünteesimiseks.

Põhimõtteliselt võib ka levaanil olla prebiootilist toimet. Aastal 2010 näidati, et jämesooles arvukalt esindatud bakteril *Bacteroides thetaiotaomicron* on endolevanaasi geen ja ta on võimeline kasvama levaanil kui ainsal süsinikuallikal. Valk, mis saadi selle geeni ekspresseerimisel *E. coli*'s, oli võimeline levaani FOS-ideks lagundama (Sonnenburg *et al.*, 2010). Seega võiks soolebakter *B. thetaiotaomicron* toota levaanist probiootilistele jämesoolebakteritele kasutamiseks β -2,6 sidemega FOS-e.

Polümeerse levaani füüsikaliste omaduste tõttu (viskoossus, vastupidavus sooladele, kõrgele temperatuurile ning hapetele ja alustele) on tal mitmeid kasutusvõimalusi paljudes valdkondades. Kuna levaan lahustub nii vees kui ka õlis, saab teda kasutada toiduainetööstuses paksendajana ja emulgaatorina. Teda saab kasutada veel stabilisaatorina, kapslite materjalina ja vereplasma asendjana (Bekers *et al.*, 2005; Banguela ja Hernández, 2006). Levaanile on leitud potentsiaalset kasutust ka kosmeetika valdkonnas, sest tal on ärritunud nahale põletikuvastane toime ja ta stimuleerib rakkude paljunemist (Kim *et al.*, 2005). Levaanil on näidatud ka vähivastast ja immuunsüsteemi stimuleerivat toimet (Calazans *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2004; Dahech *et al.*, 2012; Abdel-Fattah *et al.*, 2012; Esawy *et al.*, 2013).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Meie töörühmas on käsil SA Archimedese kaudu Euroopa Liidu finantseeritav projekt „*Design and application of novel levansucrase catalysts for the production of functional food ingredients (Functional Food Ingredients, FFI)*“. Projekt algas 2012. aasta oktoobris ja selle eesmärk on kasutada *Pseudomonas syringae* pv. tomato Lsc3 valku biotehnoloogilistes rakendustes. Lsc3 valk on meie töögrupis isoleeritud ning oleme näidanud, et ta on katalüütiliselt väga aktiivne ning sünteesib sahharoosist potentsiaalse biotehnoloogilise väärtusega fruktaane, levaani ja fruktooligosahhariide (Visnapuu *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2009; Visnapuu *et al.*, 2011). FFI projekt näeb ette Lsc3 valguga levaani ja fruktooligosahhariidide ensümaatilist sünteesi, produktide eraldamist, puhastamist, analüüsimist ja nende kasutusvõimaluste uurimist. Et levaani ja fruktooligosahhariidide sünteesimine oleks võimalikult tõhus ja odav, on vaja seda protsessi uurida ja optimeerida.

Käesolev bakalaureusetöö toimus FFI projekti raames ja selles püstitati järgmised eesmärgid:

1. Ekspresseerida *Escherichia coli*'s ja puhastada *P. syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraas Lsc3;
2. Optimeerida Lsc3 reaktsioonitingimusi, et saavutada võimalikult väikese valgu koguse kohta maksimaalne sünteesitava levaani kogus. Varieeritavateks parameetriteks valiti reaktsiooni läbiviimise temperatuur, substraadi (sahharoosi) ja levaansukraasi kogus reaktsioonisegus;
3. Selgitada, kuidas muutub Lsc3 valguga sahharoosist sünteesitavate fruktooligosahhariidide kogus ja spekter ajas kahel erineval temperatuuril ja sahharoosi kontsentratsioonil.
4. Teha kindlaks, kas glükoos inhibeerib Lsc3 valgul levaani teket.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Transformantide kasvatus ja levaansukraasi ekspresseerimine

Rekombinantse levaansukraasi ekspresseerimiseks elektroporeeriti levaansukraasi geeni *lsc3* sisaldav pURI3-lsc3TEV plasmiid (Mardo *et al.*, 2012) *E. coli* tüvesse BL21(DE3) (*hsdS gal (λCIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)*) (Studier ja Moffatt, 1986). pURI3-lsc3TEV plasmiidilt ekspresseerides lisandub Lsc3 valgule N-terminaalne His₆-järjestus, mis on eemaldatav tubakaviiruse TEV (*tobacco etch virus*) proteaasiga tänu vastavale lõikekohale

sünteesitavas valgus (Curiel *et al.*, 2011). Transformante kasvatati ampitsilliini (0.15 mg/ml) sisaldavas LB tard- või vedelsöötmes 37°C. Vedelkultuure aereeriti loksutil (180 pööret min). *Lsc3* geeni olemasolu rakkudes kontrolliti PCR-iga, kasutades praimeripaari T7 (5' taatacgactactataggg 3') ja Lsc1ja3Rev1 (5' tgcgcttcggttgataatagg 3'), millega amplifitseeriti *lsc3* geenist 760 ap pikkune DNA fragment.

Aktiivse levaansukraasi olemasolu transformantides kontrolliti kolooniate fenotüübi alusel. Selleks külvati transformandid 10% sahharoosi sisaldavale LB Amp söötmele, millele oli *lsc3* geeni ekspressiooni algatamiseks lisatud 1 mM IPTG-d (isopropüül-β-D-1-tiogalaktopüranosiid). Rakke kasvatati temperatuuril 37°C üleöö ja seejärel inkubeeriti tassi kuni 7 päeva toatemperatuuril. Levaansukraasi ekspressiooni näitas limaste (levaani sünteesivate) kolooniate moodustumine.

Levaansukraasi puhastamiseks kasvatati pURI3-*lsc3*TEV transformante LB Amp vedelsöötmes 37°C loksutil üleöö ja külvati edasi 200 ml samasse söötmesse. Kultuuri algne optiline tihedus (OD₆₀₀) oli 0.05 ning bakterirakke kasvatati loksutil temperatuuril 37°C ~2 h kuni OD₆₀₀ väärtuseni 0.5. *Lsc3* tootmine indutseeriti IPTG-ga (lõppkontsentratsioon 0.5 mM) ja järgnevalt inkubeeriti rakke madalamal temperatuuril (22°C) 20 h, mil toimus rakkudes levaansukraasi süntees.

2.2.2. Rakuekstrakti tegemine ja levaansukraasi puhastamine Ni²⁺-afiinsuskromatograafiaga

Rakuekstrakt valmistati ja His₆-*Lsc3* valk puhastati nagu on varem näidatud artiklis Visnapuu *et al.* (2011). Rakuekstraktide tegemiseks sadestati bakterirakud tsentrifuugimisega (2400 g, 10 min, 4°C), pesti 10 ml 50 mM K-fosfaatpuhvriga (pH 7.0) ja suspendeeriti 10 ml sonikeerimispuhvris A (10% glütserool, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl ja 10 mM imidasool; pH 6.0). Rakkude purustamiseks külmutati rakud vedelas lämmastikus ja sulatati üles (korraldi 3 korda) ning seejärel sonikeeriti (Ultrasonic Homogenizer, Cole-Parmer, USA). Purustatud rakkude suspensiooni tsentrifuugiti (2400 g, 20 min, 4°C) ja eraldatud supernatanti kasutati rakuekstraktina.

Rekombinantse His₆-*Lsc3* valgu puhastamiseks kasutati ÄKTAprime plus kromatograafiasüsteemi (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi), HisTrap 1 ml FF kolonni (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi) ning tootjapoolset protokollit (*Templates: Affinity Purification any HisTrap*). Levaansukraasi elueerimiseks kolonnist kasutati 0.5 M imidasooli sisaldavat puhvrit (10% glütserool, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl ja 0.5 M imidasool; pH 6.0). Rekombinantse levaansukraasi olemasolu kogutud fraktsioonides kontrolliti

denatureeriva polüakrüülamiidgeelelektroforeesiga (SDS-PAGE). Levaansukraasi sisaldavad fraktsioonid koguti ning pandi SERVAPOR 44145 dialüüsिमembraani, mis laseb läbi väiksemaid molekule kui 12-14 kilodaltonit (kDa) (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Saksamaa). Valgulahust dialüüsiti temperatuuril 4°C 24 h tunni jooksul 0.02% Na-asiidi sisaldavas McIlvaine'i puhvril (130 mM Na₂HPO₄ ja 40 mM sidrunhape; pH 6.0). Valgupreparaat kontsentreeriti Amicon Ultra tseftrifugifiltritiga (Merck Millipore, USA), mida ei läbi suuremad molekulid kui 10 kDa. Saadud preparaadis määrati valgusisaldus ja levaansukraasi koguaktiivsus (pt. 2.2.4.) ning seda kasutati edaspidistes katsetes puhta valgupreparaadina.

2.2.3. Geelelektroforees

PCR-iga saadud DNA fragmendid lahutati etiidiumbromiidi sisaldaval (lõppkonts. 0.35 µg/ml) 1% agarosgeelil 0.5 x TAE puhvril (40 mM Tris-atsetaatpuhver, 1 mM EDTA; pH 8.2). Geelile kantavatele proovidele lisati glütserooli sisaldavat geelivärvi (6 x DNA Loading Dye, Thermo Scientific) ja geelelektroforees toimus toatemperatuuril pingel 10 V/cm. Produktide suuruse määramiseks kasutati GeneRuler™ 1kb DNA suurusmarkerit (Thermo Scientific). DNA fragmendid visualiseeriti ultravioletvalguses (UV Transilluminator-iga (UVP, USA).

Rakulüsaatides sisalduvad valgud ja puhastatud levaansukraasi proovid lahutati 10% glütsiin-SDS-polüakrüülamiidgeelil (Sambrook ja Russell, 2001), et hinnata rekombinantse Lsc3 valgu ekspressioonitaset *E. coli*'s ja kontrollida levaansukraasi olemasolu puhastatud valku sisaldavates fraktsioonides. Rakulüsaati (12 µl) ja valgu puhastamise fraktsioonidest pärit proovi (5 µl) suspendeeriti 4 x Laemmli puhvril (Laemmli, 1970) ning kuumutati 5 min 96°C. Geelid voolutati toatemperatuuril ja pingel 10 V/cm Mini-PROTEAN Tetra süsteemiga (BIO-RAD, USA). Seejärel värviti geelid Coomassie Brilliant Blue R250 lahusega ning levaansukraasi asukohta geelil hinnati valkude suurusmarkeri PageRuler SM0671 (Thermo Scientific) valkude liikumise alusel.

2.2.4. Levaansukraasi aktiivsuste määramine

Levaansukraasi koguaktiivsuse määramine

Levaansukraasi koguaktiivsuse määramiseks mõõdeti sahharoosi kasutamisel vabanenud glükoosi hulka, mis näitab levaansukraasiga reageerinud sahharoosi hulka. Selleks kasutati Glucose Liquicolor'i reaktiivi (Human GmbH, Saksamaa) ja eelnevalt väljatöötatud meetodikat (Visnapuu *et al.*, 2008). Levaansukraasi koguaktiivsust määrati Lsc3 valku

ekspresseeriva *E. coli* rakuekstraktist ja puhastatud levaansukraasi preparaadist kasutades sobivat kogust rakuekstrakti või puhastatud valku. Reaktsioonisegu sisaldas lisaks levaansukraasile McIlvaine'i puhvrit (pH 6.0) ja 100 mM sahharoosi ning reaktsioon viidi läbi temperatuuril 37°C. Sobivatel ajapunktidel pipeteeriti 50 µl reaktsioonisegu 150 µl Tris puhvrissi (200 mM; pH 8.3) ning proove kuumutati 5 minutit temperatuuril 96°C. Proovis sisalduva glükoosi hulk määrati mõõtes lahuse optilist tihedust lainepikkusel 500 nm. Levaansukraasi koguaktiivsus väljendati glükoosi hulvana mikromoolides, mis moodustus 100 mM sahharoosi hüdrolyüsil ühe minuti jooksul ühe mg valgu kohta (µmol/mg x min; U/mg).

Valgu kontsentratsiooni määramine

Valgu kontsentratsioonid rakulüsaadist ja puhastatud levaansukraasi preparaadist määrati Lowry *et al.* (1951) meetodil. Valgu sisaldus puhastatud valgu preparaadist määrati ka ekstinktsioonikoeffitsiendi (ϵ) alusel. Selleks mõõdeti valgulahuse OD lainepikkusel 280 nm mikroplaadi lugejaga Tecan Sunrise (Tecan Group Ltd., Šveits). Andmed koguti Tecan i-control programmiga (Tecan Group Ltd., Šveits) ja valgu kontsentratsioon arvutati valemiga: $C \text{ (mg/ml)} = OD_{280} / (\epsilon \times L)$, kus $\epsilon = 1.665 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ja $L = 0.05 \text{ cm}$. Ekstinktsioonikoeffitsient arvutati ExPASy Proteoomika Serveris (Gasteiger *et al.*, 2005; <http://web.expasy.org/protparam/>).

Levaansukraasi polümeriseeriva aktiivsuse määramine

Levaansukraasi polümeriseeriva aktiivsuse ehk transfruktosüleeriva aktiivsuse (TA) määramiseks inkubeeriti reaktsioonisegu temperatuuril 37°C 20 h. Reaktsioonisegu sisaldas 10.9 µg/ml puhastatud levaansukraasi ja 300 või 1200 mM sahharoosi McIlvaine'i puhvris (pH 6.0). Reaktsioonisegu maht oli 1 ml. Erinevatel ajapunktidel (1 h, 3 h, 6 h ja 20 h) võeti 200 µl proovi ja reaktsioon peatati kuumutamise temperatuuril 96°C 5 minuti jooksul. Termiliselt fikseeritud proovides analüüsiti reaktsioonisegu koostist HPLC meetodiga (pt. 2.2.6. ja lisa 1). Analüüsid tegi Heiki Vija (Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut, Tallinn). HPLC analüüsil määratud glükoosi ja fruktoosi kontsentratsioonide vahe kaudu arvutati levaansukraasi polümeriseeriv (transfruktosüleeriv) aktiivsus. See näitab, kui suur osa reageerinud sahharoosist pärinevast fruktoosist polümeriseeriti ehk kasutati levaani ja FOS-ide sünteesiks. Polümeriseerivat aktiivsusust väljendati protsendina valemiga: $([Glc] - [Fru_v] / [Glc]) \times 100$, milles [Glc] on glükoosi sisaldus ja [Fru_v] on polümeriseerimata fruktoosi sisaldus reaktsioonisegus (Yanase *et al.*, 2002; Visnapuu *et al.*, 2011).

2.2.5. Levaani tekke ja kineetiliste parameetrite määramine

Levaani sünteesi aktiivsuse iseloomustamiseks määrati Lsc3 valgul levaani tekke kineetilised parameetrid – afiinsus sahharoosile levaani sünteesiks (K_m ; mM) ja maksimaalne levaani tekke kiirus (V_{max} ; mg levaani mg valgu kohta minutis, mg/mg x min). Levaani tekke kineetika hindamiseks inkubeeriti levaansukraasi (7.2 µg puhastatud valku ml reaktsioonisegu kohta) temperatuuril 30°C mikrotiiterplaatidel (Cat.-No. 655 185, CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Saksamaa) McIlvaine'i puhvris (pH 6.0). Substraadina lisati erinevas kontsentratsioonis (40-400 mM) sahharoosi. Reaktsioonisegu maht ühes kannukeses oli 200 µl. Levaani teket mõõdeti mikroplaadilugejaga Tecan Sunrise (Tecan Group Ltd., Šveits) lainepikkusel 400 nm 20 tunni vältel ja andmed koguti Tecan i-control programmiga (Tecan Group Ltd., Šveits). Sünteesitud levaani kogus arvutati Lsc3 valguga sünteesitud ja puhastatud levaani kaliiberkõvera alusel (T. Visnapuu). Arvutamiseks kasutati valemit $C \text{ (mg/ml)} = OD_{400} \times 18.3$.

Kineetiliste parameetrite (K_m ja V_{max}) arvutamiseks kasutati programmi SigmaPlot 2001 (Systat Software Inc., USA) ensüümikineetika moodulit (Enzyme Kinetics Module 1.1) ja tulemusi analüüsiti vastavalt Michaelis-Menten'i võrrandile.

Ensüümi kontsentratsiooni mõju uurimiseks levaani tekkele inkubeeriti erinevad kogused puhastatud Lsc3 valku (lõppkonts. reaktsioonisegus 1.33-13.0 µg/ml) mikrotiiterplaatidel (Cat.-No. 655 185, CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Saksamaa) McIlvaine'i puhvris (pH 6.0) kahel erineval temperatuuril (30°C või 37°C) ja kahel erineval sahharoosi kontsentratsioonil (300 mM ja 1200 mM). Reaktsioonisegu maht ühes kannukeses oli 200 µl. Levaani teket mõõdeti ja tekkinud levaani hulk arvutati nagu on kirjeldatud ülalpool.

2.2.6. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

Levaansukraasi reaktsiooniproduktid lahutas kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) meetodil Heiki Vija (Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut, Tallinn). Glükoosi, fruktoosi, sahharoosi ja FOS-ide kogus määrati sarnaselt Downes ja Terry (2010) kirjeldatud metoodikale (lisa 1).

Proovid, millest reaktsiooniproduktide hulka ja spektrit määrati olid järgmised:

1) 1., 3., 6. ja 20. tunnil peatatud reaktsioonid, milles Lsc3 (10.9 µg/ml) reageeris kahe erineva sahharoosi kontsentratsiooniga (300 mM või 1200 mM) temperatuuril 37° (pt. 2.2.4.).

2) 20. tunnil peatatud reaktsioonid, milles erinevad kogused ensüümi (1.3-13.0 µg/ml) pandi reageerima kahel sahharoosi kontsentratsioonil (300 mM ja 1200 mM) ja kahel temperatuuril (30°C ja 37°C) (pt. 2.2.5.).

Levaansukraasi reaktsioonisegudest valmistati sobivad lahjendused 20% etanoolilahusesse nii, et suhkru sisaldus ei ületaks 5 mg/ml. Suhkrute (fruktoos, glükoos, sahharoos ja rafinoos) kindla kontsentratsiooniga lahuste põhjal tehtud kaliibergraafikute alusel määrati suhkrate kogused reaktsioonisegudes. Suhkrute analüüsiks kasutati kromatograafi Aquity UPLC (Waters, USA) ning suhkrud detekteeriti Aquity ELS (*evaporative light-scattering*) detektoriga (Waters, USA). Standardsuhkrute kolonnist väljumisaegade alusel identifitseeriti uuritavates proovides vastavad ained (vt. lisa 1). Vaba glükoosi ja fruktoosi sisalduse järgi arvutati transfruktosüleeriv aktiivsus (pt. 2.2.4.).

2.3. Tulemused ja arutelu

Meie töögrupis on eelnevalt ekspresseeritud ja põhjalikumalt iseloomustatud *P. syringae* DC3000 pv. tomato levaansukraase Lsc2 ja Lsc3 (Visnapuu *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2009; Visnapuu *et al.*, 2011; Alamäe *et al.*, 2012). Neid ensüüme iseloomustab levaansukraaside hulgas suhteliselt kõrge afiinsus sahharoosile (~20 mM) ning suur katalüütiline aktiivsus. Näiteks Lsc3 suudab katalüüsida sekundi jooksul ~500 sahharoosi molekuli lõhustamist (Visnapuu *et al.*, 2011; Alamäe *et al.*, 2012). Pseudomonaadidest pärinevate levaansukraaside hulgas on Lsc2 ja Lsc3 erilised selle poolest, et võivad substraadina kasutada lisaks nende põhilisele substraadile, sahharoosile, ka trisahhariid rafinoosi (Visnapuu *et al.*, 2008) ja tetrasahhariid stahhüoosi (Visnapuu *et al.*, 2011; Visnapuu, 2012) (joonis 3). Lisaks on Lsc3 valk biotehnoloogilise potentsiaaliga, sest toodab ka fruktooligosahhariide (FOS-e) ning on võimeline transfruktosüülida ka nn. mittetraditsioonilisi aktseptoreid, näiteks ksüloosi, ksülobioosi, sorbitooli, arabinoosi, sünteesides neist potentsiaalselt uute kasutusvõimalustega suhkruid (Visnapuu *et al.*, 2009; Visnapuu *et al.*, 2011).

On näidatud, et levaansukraaside katalüütilised omadused sõltuvad reaktsioonitingimustest, näiteks temperatuurist ja substraadi kontsentratsioonist (Chambert ja Petit-Glatron, 1991; Hernández *et al.*, 1995; Hettwer *et al.*, 1995; Euzenat *et al.*, 1997; Sangiliyandi *et al.*, 1999). Oleme varem näidanud, et Lsc3 polümeriseerimisvõime ja produktide spekter sõltub suurel määral substraadi kontsentratsioonist (Visnapuu *et al.*, 2009), kuna transfruktosüülamiseks on vaja kõrget sahharoosi kontsentratsiooni reaktsioonisegus. Näiteks 1.2 M sahharoosi korral kantakse rohkem kui 70% reageerinud sahharoosist pärinevatest fruktoosijääkidest üle mõnele

veest erinevale aktseptorile ja polümerisatsiooniproduktidena moodustuvad erineva ahelapikkusega fruktaanid (Visnapuu *et al.*, 2011). Kui madalal sahharoosi kontsentratsioonil sünteesib Lsc3 peamiselt levaani, siis alates 600 mM sahharoosi kontsentratsioonist moodustub ka arvestatav hulk FOS-e (Visnapuu *et al.*, 2009). Seni oleme saanud moodustuvaid reaktsiooniprodukte detekteerida õhukese kihi kromatograafiaga ning FOS-e ka mass-spektromeetriaga. Kahjuks ei võimalda kumbki meetod reaktsiooniproduktide kvantitatiivset analüüsi.

Käesolevas töös uurisin reaktsioonitingimuste mõju Lsc3 valgu polümeriseerivale aktiivsusele, et leida optimaalne substraadi ja ensüümi kontsentratsioon ning sobiv temperatuur võimalikult suure koguse levaani sünteesiks. Kuna FFI projekti raames seati koostööpartnerite laboratooriumis Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudis sisse suhkrute HPLC analüüsi süsteem, siis sai võimalikuks ka FOS-ide kvantiteerimine Lsc3 reaktsioonisegus. Lisaks määrasin ja analüüsisin levaansukraasil Lsc3 levaani tekkega seotud kineetilisi parameetreid ja levaani sünteesi potentsiaalset inhibeerumist glükoosiga.

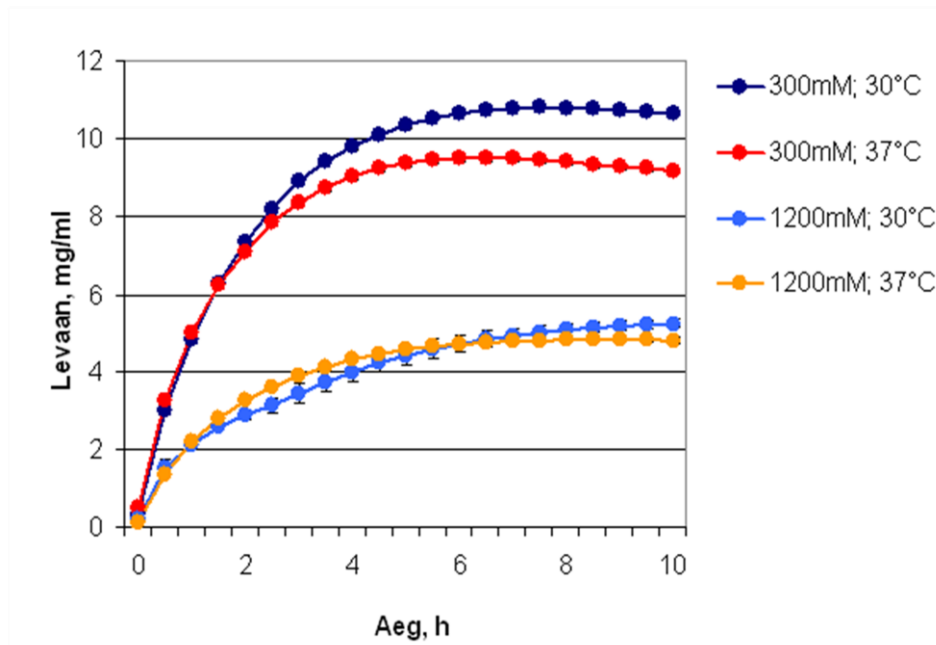
Lsc3 valgu polümeriseerimisomaduste uurimiseks valk ekspresseeriti ja puhastati Ni²⁺-afiinsuskromatograafiaga (pt. 2.2.1. ja 2.2.2.). Lsc3 koguaktiivsused määrati nii rakuekstraktist kui ka puhastatud valgu preparaadist nagu kirjeldatud peatükis 2.2.4. Rakuekstraktis oli Lsc3 koguaktiivsus 69 µmol/mg x min ja puhastatud Lsc3 valgul oli vastav väärtus 377 µmol/mg x min. Seda puhastatud Lsc3 valku kasutati käesoleva töö kõikides katsetes.

2.3.1. Temperatuuri mõju levaansukraasi polümeriseerivale aktiivsusele

Levaansukraasid katalüüsivad nii substraadi hüdrolyüüsi- kui ka polümerisatsioonireaktsiooni, mille temperatuurioptimumid võivad olla erinevad. Kirjanduse andmetel soodustab levaansukraaside hüdrolyüütilist aktiivsust kõrgem temperatuur ja polümeriseerivat aktiivsust madalam temperatuur (Hettwer *et al.*, 1995). Meie grupis on varem näidatud, et *P. syringae* pv. tomato Lsc3 polümeriseeriv aktiivsus, kui substraadiks oli 1200 mM sahharoos, oli temperatuuril 60°C 67%, kuid temperatuuril 20°C tõusis see 80%-ni (Visnapuu *et al.*, 2011). Käesolevas töös uurisime polümerisatsioonireaktsiooni kulgu kahel temperatuuril: 30°C ja 37°C. Levaani teket saab hinnata spektrofotomeeriliselt, sest levaan moodustab vesilahuses hägu (Vigants *et al.*, 2001; Visnapuu *et al.*, 2011). Reaktsioonisegu neeldumist tänu häguse levaani tekkele mõõdetakse lainepikkusel 400 nm ja seda saab teha nii küvetis kui ka mikrotiiterplaadil (Visnapuu *et al.*, 2011).

Mõõtsime levaani sünteesi mikrotiiterplaatidel 300 mM ja 1200 mM sahharoosist 20 h jooksul, lisades Lsc3 valku erinevas koguses: lõppkontsentratsioon reaktsiooniseigus jäi vahemikku 1.3-13.0 µg/ml. Vastavat metoodika on kirjeldatud peatükis 2.2.5. Tulemused näitavad, et temperatuuril 30°C moodustus mõnevõrra rohkem levaani võrreldes 37°C-ga. Joonisel 6 on näitena toodud tulemused katsest, kus kasutatud Lsc3 sisaldus reaktsiooniseigus oli 7.2 µg/ml. Kümne tunniks oli 300 mM sahharoosist temperatuuril 30°C moodustunud 10.6 ± 0.1 mg/ml levaani, vastav väärtus temperatuuril 37°C oli 9.2 ± 0.1 mg/ml. *P. syringae* pv. *phaseolicola* Lsc optimumtemperatuur levaani moodustumiseks oli 18°C, kusjuures temperatuuril 4°C sünteesiti levaani rohkem kui temperatuuril 37°C (Hettwer *et al.*, 1995). Kuna meil kasutada olev aparatuur ei võimaldanud automaatset optiliste tiheduste registreerimist temperatuuril alla 30°C, siis käesoleva bakalaureusetöö raames tehtud katsetes pole kasutatud madalamaid temperatuure. Edaspidi on plaanis uurida levaani sünteesi kineetikat ka madalamatel temperatuuridel.

Nägime, et kõrgemal sahharoosi kontsentratsioonil (1200 mM), kus oli sünteesitud ka oluliselt vähem levaani, oli temperatuuri mõju levaani sünteesile väiksem: temperatuuril 30°C oli kümne tunniks levaani tekkinud vaid 0.4 mg/ml rohkem kui kõrgemal temperatuuril (joonis 6).



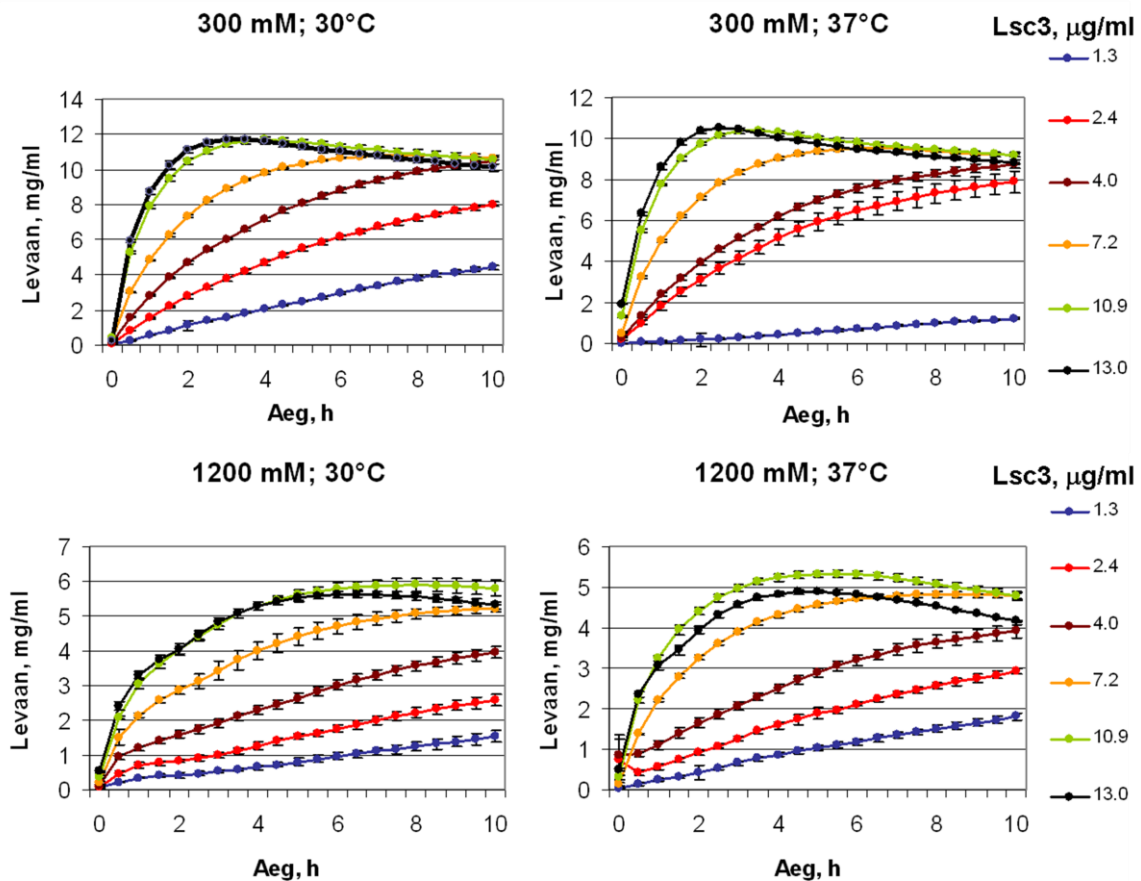
Joonis 6. Levaani teke (mg/ml) 300 mM ja 1200 mM sahharoosist 10 h jooksul temperatuuridel 30°C ja 37°C. Reaktsioon viidi läbi McIlvaine'i puhvis, levaansukraasi kontsentratsioon oli 7.2 µg/ml. Levaani teket mõõdeti lainepikkusel 400 nm ja tekkinud levaani kogus arvutati kaliiberkõvera alusel. Joonisel esitatud tulemused ja standardhälbed on arvutatud 4 korduse põhjal.

TLC analüüsiga ja mass-spektromeetria meetodiga on näidatud, et Lsc3 toodab lisaks levaanile ka FOS-e (Visnapuu *et al.*, 2009). Reaktsiooniproductide spektrit on võimalik temperatuuriga mõjutada. Näiteks *B. subtilis*'e levaansukraasi puhul toodeti kõrgematel temperatuuridel FOS-e rohkem võrreldes madalamate temperatuuridega (Euzenat *et al.*, 1997). Käesolevas töös näitasime, et levaani tekke osakaalu saab suurendada temperatuuri ja substraadi sisalduse langetamisega (joonis 6). Samas FOS-ide hulk, mis sünteesiti 1200 mM sahharoosist temperatuuridel 30°C ja 37°C, ei erinenud omavahel oluliselt (vt. tabel 1; pt. 2.3.2.).

2.3.2 Ensüümi koguse optimeerimine levaani ja FOS-ide sünteesiks

Ensüümide heteroloogiline süntees ja puhastamine ei ole odav ning seetõttu on puhtad ensüümid kallid. Firma Sigma-Aldrich müüb *Pseudomonas aurantiaca* (sünonüüm *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*) levaansukraasi hinnaga 235 eurot (500 mg). Hoolimata kõrgest hinnast on sellel ensüümil eriaktiivsus ~50 korda madalam kui Lsc3 valgul (Visnapuu *et al.*, 2011). Meie andmetel teised firmad puhastatud levaansukraasi ei müü. Kui ensüümi kasutada biokeemiliseks sünteesiks, siis peaks ta olema võimalikult kõrge katalüütilise aktiivsusega ja teda tuleks reaktsioonisegusse lisada parajal määral, et ensüümi mitte liigselt kulutada. Siis saaks vajalikku produkti sünteesida võimalikult efektiivselt ja see oleks ka majanduslikult mõttekas.

Selleks, et määrata levaani tootmiseks optimaalne Lsc3 valgu kogus, mõõtsime levaani teket 20 h jooksul erinevatel ensüümi kontsentratsioonidel (1.3-13.0 µg/ml). Reaktsioon viidi läbi mikrotiiterplaatidel, kahel erineval sahharoosi kontsentratsioonil (300 mM ja 1200 mM) ja kahel erineval temperatuuril (30°C ja 37°C). Kõikidel testitud tingimustel oli märgata ensüümi koguse mõju levaani tekkele – mida rohkem oli ensüümi reaktsioonisegus, seda rohkem ja kiiremini tekkis levaani (joonis 7). Kui valgu kogus oli reaktsioonisegus kõrgem kui 7.2 µg/ml, siis ensüümi koguse suurendamine enam märkimisväärset efekti ei andnud (joonis 7). Kui kasutati suuri ensüümi koguseid, siis hakkas levaani kontsentratsioon reaktsioonisegus mõne aja möödudes peale maksimaalse taseme saavutamist uuesti langema, mis võib olla põhjustatud levaansukraasi omadusest mõningal määral ka tekkinud levaani hüdrolüüsida (Yanase *et al.*, 1992; Jang *et al.*, 2007; Visnapuu *et al.*, 2011). Samas on võimalik, et kui levaani kontsentratsioon lahuses ületab teatud taseme, siis hakkab polüfruktaan agregeeruma ja tema neeldumisomadused muutuvad. See võiks seletada kõvera kuju joonisel 7.

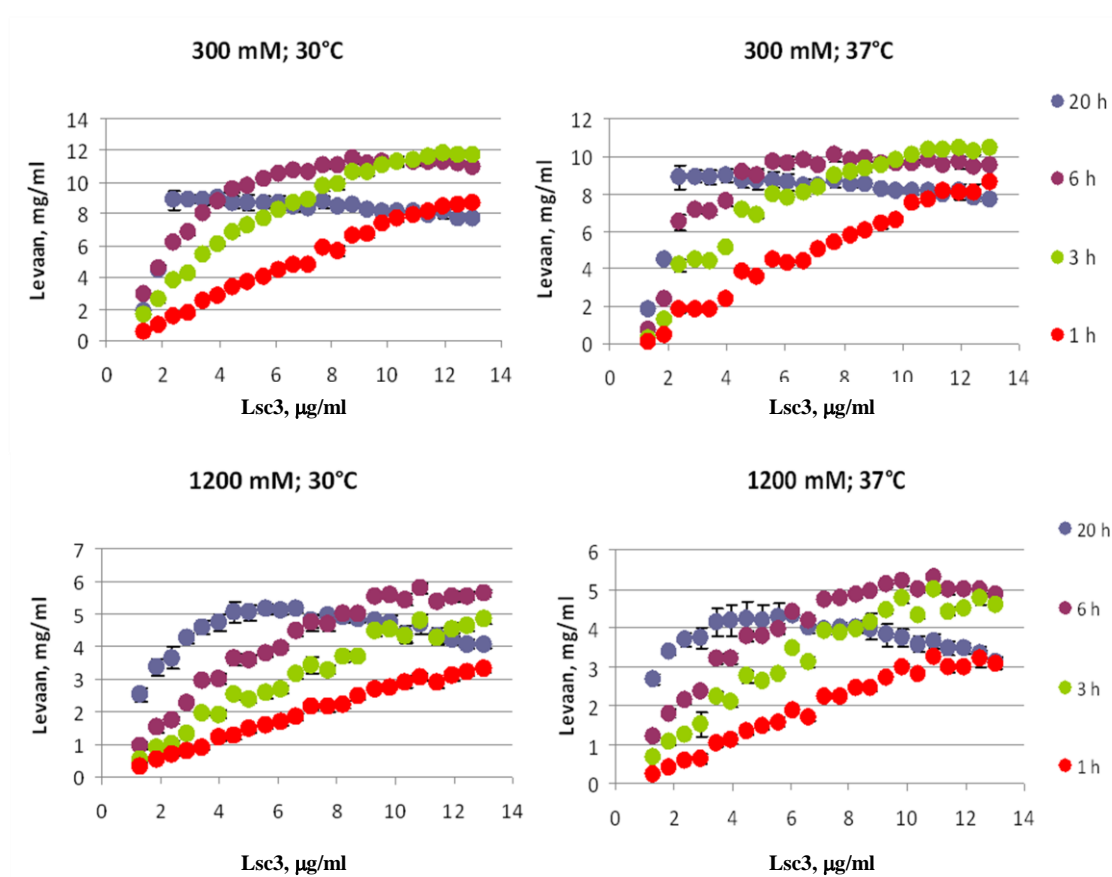


Joonis 7. Levaani teke (mg/ml) 10 h jooksul kahel erineval sahharoosi kontsentratsioonil (300 mM ja 1200 mM) ja kahel erineval temperatuuril (30°C ja 37°C). Reaktsioon toimus McIlvaine'i puhvris (pH 6.0) ning kasutati puhastatud levaansukraasi Lsc3 (1.3-13.0 µg/ml). Levaani teket mõõdeti mikrotiiterplaadi kannukestes lainepikkusel 400 nm ja tekkinud levaani kogus arvutati levaani kaliiberkõvera alusel (pt. 2.2.5.). Joonisel esitatud tulemused ja standardhälbed on arvatud 4 korduse põhjal.

Optimaalne ensüümi hulk maksimaalse levaanikoguse saamiseks sõltub ka reaktsiooniajast. Kui reaktsiooni viia läbi 20 h jooksul, siis on võimalik suur kogus levaani sünteesida ka väikest ensüümikogust kasutades. Levaansukraas on väga stabiilne ensüüm ja seetõttu püsib ta kaua katalüütiliselt aktiivsena (Visnapuu *et al.*, 2011). Nägime, et kui reaktsiooniaeg oli 20 h, siis sahharoosi kontsentratsioonil 300 mM oli optimaalseks Lsc3 hulgaks reaktsioonisegus 2.4 µg/ml ning 1200 mM sahharoosi puhul ~ 5 µg/ml (joonis 8).

Kui on tarvis suures koguses levaani sünteesida lühema aja jooksul, siis tuleks lisatava ensüümi kogust suurendada. Minu tulemuste alusel on 300 mM sahharoosist temperatuuril 30°C 6 h jooksul saavutatav maksimumilähedane levaani kogus siis, kui lisada ~7 µg/ml ensüümi. Kui kasutada 1200 mM sahharoosi, siis on kuue tunni jooksul võimalik saada maksimaalne levaani kogus lisades ~9 µg/ml ensüümi (joonis 8). Kui reaktsiooniaega veelgi

lühendada (1 või 3 tunnini), siis tuleks maksimaalse levaani koguse saamiseks ensüümi kogust veelgi tõsta (~12 µg/ml) (joonis 8).



Joonis 8. Levaani teke (mg/ml) 1., 3., 6. ja 20. reaktsioonitunniks erinevatel Lsc3 kontsentratsioonidel (1.3-13.0 µg/ml) reaktsioonisegudes. Täiendav informatsioon reaktsiooni tingimuste kohta on esitatud joonise 7 allkirjas ja pt. 2.2.5. Joonisel esitatud tulemused ja standardhälbed on arvatud 4 korduse põhjal.

Arvutasime sünteesitud levaani koguse ka reaktsioonisegusse lisatud 1 mg valgu kohta. 20. reaktsioonitunniks oli kõige rohkem levaani sünteesitud ühe mg ensüümi kohta siis, kui valku lisati vähe. See näitab, et juba väiksest valgu hulgast piisab arvestatava koguse levaani saamiseks juhul, kui pikemat aega reaktsiooni läbi viia. 300 mM sahharoosi puhul temperatuuril 30°C saavutati maksimaalne levaani hulk (3.7 g levaani mg Lsc3 valgu kohta) 20. reaktsioonitunniks siis, kui valku lisati reaktsioonisegusse 2.4 µg/ml. Kui ensüümi lisati 13.0 µg/ml, oli vastav arv ainult 0.6 g, mis näitab, et ensüümi ülelaadmise puhul toodab ensüümi ühik tunduvalt vähem levaani.

Maksimaalseks FOS-ide sünteesiks on optimaalne ensüümi kogus võrreldes levaani sünteesi reaktsiooniga erinev. Siiski kehtis samasugune trend, et Lsc3 hulga suurendamine reaktsioonisegus mõjus FOS-ide sünteesile pigem pärssivalt. Seda näitas 20. tunni proovide

analüüs HPLC-ga. Selgus, et meie katsetes kasutatud kõige väiksema koguse ensüümiga (1.3 µg/ml) oli võimalik 1 mg Lsc3 valgu kohta sünteesida palju rohkem FOS-e kui suuremate ensüümi kogustega (tabel 1). Kui ensüümi lisati reaktsioonisegusse 1.3 µg/ml, siis sünteesiti 20. reaktsioonitunniks 1200 mM sahharoosist ligikaudu 60 g FOS-e ühe mg ensüümi kohta. Tulemus suurima uuritud Lsc3 kontsentratsiooni (13.0 µg/ml) puhul oli ligi 15 x väiksem (~4 g FOS-e mg ensüümi kohta). Järeldame, et kui reaktsiooni viia läbi 20 h jooksul, on optimaalne Lsc3 kogus FOS-ide sünteesiks ligikaudu 1.3 µg/ml või isegi madalam (tabel 2). Kõige suurem hulk FOS-e (62.8 g/mg) saadi siis, kui reaktsioon viidi läbi temperatuuril 37°C ja kasutati kõrgemat sahharoosi kontsentratsiooni (tabel 2). Segude kromatograafiline analüüs näitas, ensüümi kontsentratsioon reaktsioonisegus mõjutab ka FOS-ide spektrit. Kui ensüümi kogus oli väiksem, siis suurenes pikema ahelaga FOS-ide osakaal (kuni DP 7) (vt. joonis 9).

Tabelist 2 on näha, et ensüümi kogust suurendades Lsc3 transfruktosüüliv aktiivsus väheneb. Kui 1200 mM sahharoosiga 1.3 µg/ml Lsc3 puhul on see üle 80%, siis valgu kogust 10 x tõstes langeb see 65%-ni. Järeldame, et kui ensüümi lisada liiga palju, siis suureneb tema hüdroolüüsiv aktiivsus. Kui ensüümi lisatakse suures koguses, siis saab kohe alata kiire sahharoosi lõhustamine, reaktsioonisegusse hakkab kogunema glükoos ja see võib inhibeerida transfruktosüülimisreaktsiooni. Lisaks võib ensüüm sahharoosi sisalduse vähenemisel hakata sünteesitud levaani eksoaktiivsusega hüdroolüüsima.

Tabel 2. Lsc3 koguse mõju transfruktosüleerivale aktiivsusele (TA, %) ja FOS-ide tekkele 20. reaktsioonitunniks 300 mM ja 1200 mM sahharoosist temperatuuridel 30°C ja 37°C.

Lsc3, µg/ml	Transfruktosüleeriv aktiivsus (TA, %)				FOS (g/mg Lsc3 valgu kohta)			
	300 mM sahharoos		1200 mM sahharoos		300 mM sahharoos		1200 mM sahharoos	
	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C
1.3	55	50	82.2±0.6	81.2±0.2	4.6	7.0	59.7±0.3	62.8±5.4
2.4	51	44	80.4±0.2	80.2±1.6	3.1	3.0	32.6±0.8	33.7±1.9
4.0	47	42	77.1±0.1	63.2±0.7	1.5	1.6	17.5±0.1	10.5±0.5
7.2	43	33	69.5±0.2	67.9±0.2	0.8	0.4	8.0±0.3	9.4±1.0
10.9	39	27	67.9±0.7	63.0±0.9	0.4	0.4	4.3±0.2	4.1±1.2
13.0	38	24	65.6±0.3	64.7±0.4	0.3	0.1	3.6±0.0	3.5±0.6

* Tabelis esitatud tulemused 1200 mM sahharoosi puhul on arvatud vähemalt kahe korduse keskmisest. 300 mM sahharoosi kontsentratsiooniga proovides oli suhkrute sisaldus väike, mistõttu ei saadud neid kahes korduses analüüsida. Produktid kvantiteeriti HPLC analüüsiga (lisa 1) ja arvutused tehti nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.4.

2.3.3. Substraadi kontsentratsiooni optimeerimine soovitud produktide sünteesiks

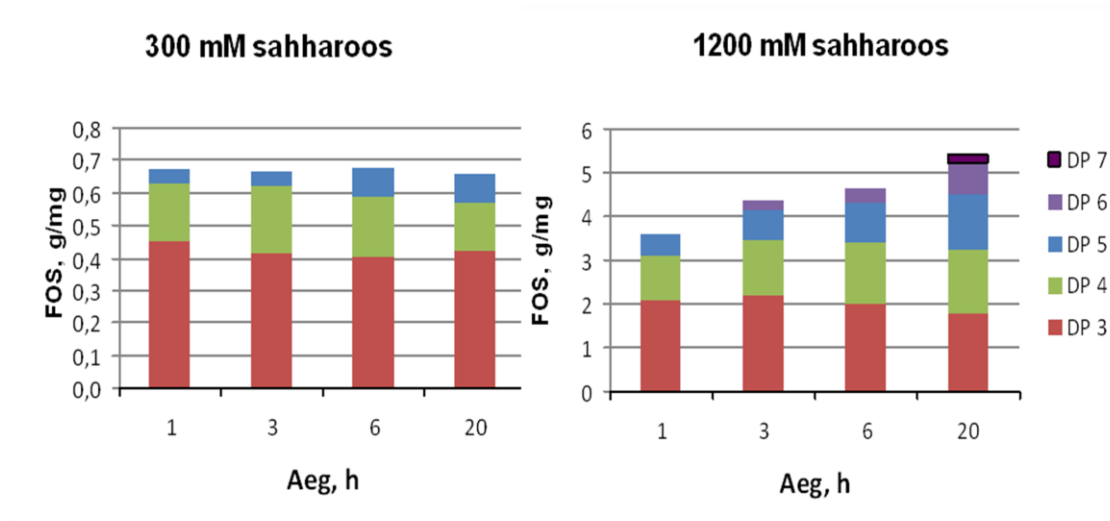
Eelnevalt on näidatud, et Lsc3 sünteesib toatemperatuuril (23°C) 1200 mM sahharoosist 3 korda vähem levaani kui 300 mM sahharoosist. Seega soodustab levaani sünteesi sahharoosi madalalam kontsentratsioon (Visnapuu *et al.*, 2009).

Kõrgematel substraadi kontsentratsioonidel on eelistatud transfruktosüüliv aktiivsus ja hüdrolüüsiv aktiivsus on madalam (Chambert ja Petit-Glatron, 1991; Hernández *et al.*, 1995). See kehtib ka Lsc3 valgu kohta, mille puhul suurim TA väärtus määrati 1200 mM sahharoosi puhul (Visnapuu *et al.*, 2011). Järelikult hakkab Lsc3 kõrgetel substraadi kontsentratsioonidel sünteesima FOS-e ja levaani osakaal reaktsiooniproduktide hulgas väheneb. Eelnevalt on näidatud, et Lsc3 hakkab FOS-e sünteesima alates sahharoosi kontsentratsioonist 300 mM (Visnapuu *et al.*, 2009).

Käesolevas töös soovisime teada saada, kui palju sünteesib Lsc3 valk FOS-e kahel sahharoosi kontsentratsioonil, 300 mM ja 1200 mM. Reaktsioon viidi läbi 20 h jooksul temperatuuril 37°C, Lsc3 kogus reaktsiooniseigus oli 10.9 µg/ml. Produktide olemasolu ja kogust määrati HPLC-ga (pt. 2.2.6. ja lisa 1). Glükoosi ja fruktoosi kontsentratsioonide vahe järgi arvutati välja ka transfruktosüleeriv aktiivsus (TA). 1200 mM sahharoosil oli TA 63% ning 300 mM sahharoosi puhul palju madalam, 27%. Need tulemused sobivad kirjanduse andmetega (Chambert ja Petit-Glatron, 1991; Hernández *et al.*, 1995) ja meie varem avaldatud tulemustega Lsc3 polümeriseeriva aktiivsuse kohta (Visnapuu *et al.*, 2011). Kuigi TA väärtus on Lsc3 valgul väiksema sahharoosisisalduse korral madalam kui 1200 mM sahharoosi puhul, sünteesib ensüüm levaani oluliselt rohkem 300 mM sahharoosist (vt. joonis 6).

Tulemused FOS-ide analüüsi kohta on esitatud joonisel 9. On näha, et 1200 mM sahharoosist sünteesitakse mg valgu kohta tõepoolest oluliselt rohkem fruktooligosahhariide kui 300 mM sahharoosist. 1200 mM sahharoosist sünteesib Lsc3 temperatuuril 37°C 20 tunni jooksul 5.4 ± 1.1 g FOS-e mg valgu kohta, kuid 300 mM sahharoosist vaid 0.7 ± 0.1 g/mg (joonis 9). Lisaks mõjutab FOS-ide teket ja spektrit ka reaktsiooniaeg – esimese tunni jooksul sünteesib Lsc3 1200 mM sahharoosist 3.6 ± 0.1 g/mg FOS-e, 20. reaktsioonitunniks on vastav väärtus oluliselt tõusnud (joonis 9).

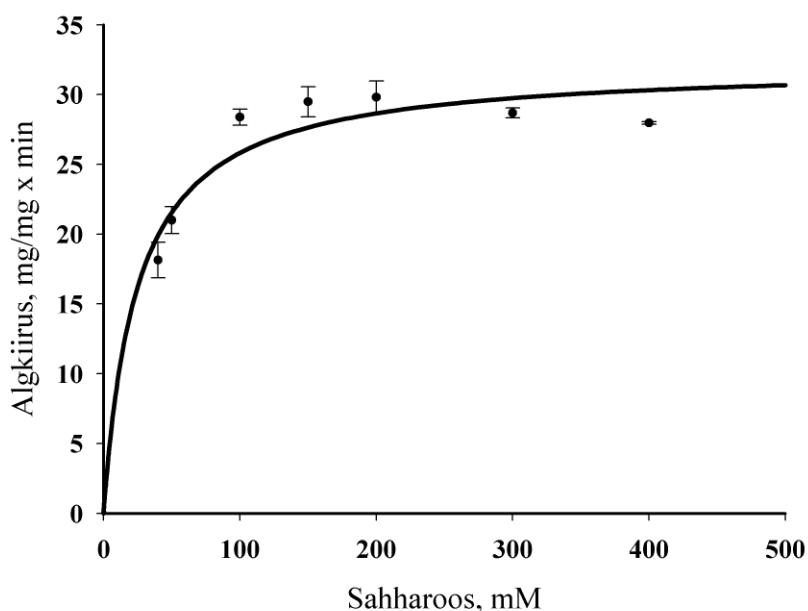
Meie katsed näitasid, et substraadi kontsentratsioon mõjutab ka FOS-ide spektrit. Pikemad FOS-id (DP 6) ilmuvad 1200 mM sahharoosi puhul reaktsiooniproduktide hulka alates kolmandast reaktsioonitunnist ja DP 7 produktid on näha alles 20. h proovis. 300 mM sahharoosist moodustuvad ainult lühemad FOS-id (kuni DP 5) ja neid tekib vähe (joonis 9).



Joonis 9. FOS-ide koguse ja spektri sõltuvus reaktsiooniajast ja sahharoosi kontsentratsioonist. Kahel sahharoosi kontsentratsioonil (300 mM ja 1200 mM) erinevateks aegadeks (1 h, 3 h, 6 h, 20 h) sünteesitud fruktooligosahhariidide (DP 3, DP 4, DP 5, DP 6, DP 7) koguhulk ja spekter. Proovid analüüsiti HPLC-ga (lisa 1).

2.3.4. Levaani sünteesi kineetilised parameetrid

Et uurida sahharoosi kontsentratsiooni mõju levaani tekkele, analüüsisime Lsc3 valgul levaani sünteesi kineetilisi parameetreid (K_m , V_{max}). His-märgiseta Lsc3 valguga K_m sahharoosi lõhustamiseks on 20.6 ± 2.1 mM ja His-märgisega valguga 18.5 ± 2.5 mM (Visnapuu *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2011). Vastavad tulemused on mõõdetud sahharoosist glükoosi eraldumise järgi. Käesolevas töös soovisime määrata His-märgisega Lsc3 valguga K_m ja V_{max} sahharoosile, mõõtes levaani teket. Selleks mõõtsime levaani tekke algkiirusi erinevatel sahharoosi kontsentratsioonidel (40-400 mM). Ensüümi kogus reaktsioonisegus oli $7.2 \mu\text{g/ml}$ ja temperatuur 30°C . Töötlesime andmeid Michaelis-Menten'i võrrandi alusel ja leidsime, et K_m sahharoosile levaani tekkeks oli 24.7 ± 5.1 mM (vt. joonis 10), mis on veidi kõrgem kui vastav väärtus sahharoosi lõhustamise reaktsioonil. Lsc3 valguga levaani sünteesi maksimaalkiirus oli 32.2 ± 1.2 mg levaani mg valguga kohta minutis.



Joonis 10. *P. syringae* pv. tomato Lsc3 levaani tekke kineetika. Levaani tekke kiirusi mõõdeti ensüümi kogusega 7.2 µg/ml temperatuuril 30°C McIlvaine'i puhvris (pH 6.0), mis sisaldas erinevaid sahharoosi kontsentratsioone (40-400 mM). Algkiirusi analüüsiti programmiga SigmaPlot Michaelis-Menten'i võrrandi alusel, kasutades ensüümikineetika moodulit. Kõik määramised tehti kahes korduses. K_m levaani tekkeks oli 24.7 ± 5.1 mM ja V_{max} oli 32.2 ± 1.2 mg levaani mg valgu kohta minutis.

2.3.5. Glükoosi inhibeeriva toime uurimine levaani sünteesile

Levaani tekke jälgimine näitas Lsc3 reaktsioonis sahharoosiga näitas, et levaani teke oli ajas lineaarne ainult lühikest aega. See võib tuleneda sellest, et reaktsioonikeskkonda vabaneb glükoosi, mis kirjanduse andmetel inhibeerib levaansukraasi (Lyness ja Doelle, 1983; Hettwer *et al.*, 1995; Ananthalakshmy ja Gunasekaran, 1999). Sellega saaks seletada levaani tekke kiiruse vähenemist. Reaktsioonisegude HPLC analüüs näitas, et glükoosi sisaldus neis tõusis kiiresti. Näiteks kui 10.9 µg/ml Lsc3 valku reageeris 300 mM sahharoosiga temperatuuril 37°C, siis juba esimeseks reaktsioonitunniks oli keskkonda vabanenud 217 mM glükoosi. Kuna varem ei ole Lsc3 valgul glükoosiga inhibeeritavust uuritud, soovisime seda teha. Jälgisime levaani tekke kineetikat mikrotiiterplaadil temperatuuril 30°C 100 minuti jooksul, varieerides sahharoosi kontsentratsiooni (40-400 mM) ning lisades reaktsioonisegusse kas 100 mM või 300 mM glükoosi. Reaktsioon viidi läbi ensüümi kontsentratsiooniga 7.2 µg/ml. Tulemused on esitatud tabelis 3.

Tabel 3. Glükoosi inhibeeriv toime levaani sünteesile.

Sahharoos, mM	Levaani sünteesi algkiirus, mg/mg x min		
	Kontrollkatse	100 mM glükoos	300 mM glükoos
40	18.1 ± 1.8	7.1	1.3
50	21.0 ± 1.4	9.5	2.1
100	28.4 ± 0.8	10.4	4.5
150	29.5 ± 1.5	11.1	6.3
200	29.8 ± 1.7	12.0	7.3
300	28.7 ± 0.5	11.8	6.8
400	28.0 ± 0.1	11.3	6.5

*Tabelis märgitud kontrollkatse (glükoosi ei lisatud) standardhälve on leitud kahe korduse andmetest.

Tabelist 3 on näha, et 100 mM glükoosi lisamisel reaktsioonisegusse vähenes levaani sünteesi algkiirus ~3 korda, 300 mM glükoosi lisamisel aga veelgi enam – kuni 14 korda. Seega inhibeerib glükoos levaani sünteesi väga tugevasti. Arvame, et selle põhjustab glükoosi seostumine levaansukraasi aktiivtsentri +1 piirkonda, häirides fruktaanide sünteesi (Meng ja Fütterer, 2003; Lammens *et al.*, 2009) (joonis 1).

Kuna igast levaansukraasiga reageerinud sahharoosi molekulist vabaneb üks molekul glükoosi, siis suureneb reaktsiooni kulgedes pidevalt glükoosi kogus reaktsioonisegus ja see peaks hakkama tugevasti pidurdama reaktsiooni kiirust. Seega võiks glükoosi eemaldamine reaktsioonisegust olla soodne levaansukraasi maksimaalse aktiivuse säilitamiseks. Edaspidi on plaanis levaansukraasi inhibitsiooni glükoosiga detailsemalt uurida. Huvitav oleks ka fruktoosi mõju uurimine levaani sünteesile ja sahharoosi lõhustamisele.

KOKKUVÕTE

Levaansukraas on bakteriaalne eksoensüüm, mille produktidel – fruktooligosahhariididel (FOS-idel) ja levaanil – on juba praegu mitmeid biotehnoloogilisi rakendusi. Erineva päritoluga levaansukraasidel on erinevad biokeemilised omadused ja reaktsiooniproductide spekter, mida saab mõjutada konkreetse levaansukraasi reaktsioonitingimuste varieerimisega. Et levaani ja FOS-ide tootmine oleks võimalikult tõhus ja odav, on vaja seda protsessi uurida ja optimeerida.

Eelnevalt on meie töögrupis kirjeldatud *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi Lsc3 valgu biokeemilisi omadusi ja on näidatud, et ta on katalüütiliselt väga aktiivne ning sünteesib suures koguses nii levaani kui ka FOS-e (Visnapuu *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2009; Visnapuu *et al.*, 2011; Mardo *et al.*, ilmumas). Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida Lsc3 valgu polümeriseerimisprotsessi ja optimeerida reaktsioonitingimusi levaani ja FOS-ide sünteesiks sahharoosist. Katsetes varieeriti valgu kogust, reaktsiooniaega ja temperatuuri ning sahharoosi kontsentratsiooni. Lisaks uuriti glükoosi kui levaansukraasi kõrvalprodukti mõju levaani sünteesile Lsc3 valguga.

Töö põhitulemused ja järeldused olid järgmised:

1. FOS-ide sünteesi Lsc3 valguga soodustab kõrgem sahharoosi kontsentratsioon (1200 mM) ning nendes tingimustes suureneb ka pika ahelaga (kuni DP 7) FOS-ide osakaal reaktsiooniproductide hulgas. Madalam (300 mM) sahharoosi kontsentratsioon soodustab levaani sünteesi. Järeldame, et Lsc3 reaktsiooniproductide hulka ja spektrit saab mõjutada, varieerides sahharoosi kontsentratsioone. Selle põhjuseks võiks olla Lsc3 madal afiinsus sahharoosile kui fruktosüüli aktseptorile. Kui sahharoosi on reaktsiooniseigus vähe, siis kasutatakse fruktosüüli aktseptorina peamiselt FOS-e, mis viib levaani sünteesile.
2. Madalamal temperatuuril (30 °C) sünteesib Lsc3 kuni 30 % rohkem levaani kui kõrgemal (37 °C), kuid FOS-e moodustub neil kahel temperatuuril samas koguses.
3. Optimaalne Lsc3 kogus reaktsiooniseigus maksimaalseks levaani sünteesiks sõltub reaktsiooniajast. Kui rakendada pikka reaktsiooniaega (20 h), siis piisab juba väga väikestest valgu kogustest. Lühema ajaga suure koguse levaani sünteesimiseks tuleb Lsc3 hulka reaktsiooniseigus suurendada.
4. Madal Lsc3 valgu sisaldus reaktsiooniseigus võimaldab suurendada sünteesitud FOS-ide kogust mg valgu kohta.

5. Lsc3 K_m sahharoosile levaani tekkeks on 25 mM, mis on veidi kõrgem kui sahharoosi lõhustamise reaktsioonil.
6. Glükoos inhibeerib tugevasti Lsc3 valgul levaani sünteesi. Arvame, et selle põhjustab glükoosi seostumine levaansukraasi aktiivtsentri aktseptorpiirkonda, mis häirib sahharoosi ja FOS-ide seostumist ja selle kaudu transfruktosüülimisreaktsiooni.
7. Selle töö andmetel võib soovitada efektiivseks levaani sünteesiks (3.7 g levaani mg Lsc3 valgu kohta) järgmist katseskeemi: inkubeerida 2.4 $\mu\text{g/ml}$ Lsc3 valku (preparaadi levaansukraasne koguaktiivsus 376.8 $\mu\text{mol/mg} \times \text{min}$) 20 tundi 300 mM sahharoosiga temperatuuril 30°C.
8. Efektiivseks FOS-ide sünteesiks (62.8 g FOS-e mg Lsc3 valgu kohta) soovitame järgmist katseskeemi: inkubeerida 1.3 $\mu\text{g/ml}$ Lsc3 valku (preparaadi levaansukraasne koguaktiivsus 376.8 $\mu\text{mol/mg} \times \text{min}$) 20 tundi 1200 mM sahharoosiga temperatuuril 37°C.

Study of polymerizing activity of the levansucrase Lsc3 and optimization of reaction conditions for the production of desired fructans

Anneli Aasamets

SUMMARY

Levansucrases are bacterial exoenzymes that use mainly sucrose as a substrate to synthesize β -2,6-linked fructans: short-chain fructooligosaccharides (FOS) and polymeric levan. Fructans are of biotechnological value as there is a wide range of applications for them in food technology as well as in medicine and cosmetics. Although biological effects of levan-type fructans are understudied, it has been shown that they may act as a health-promoting prebiotics. In addition, levan-type fructans can be even more effective bifidogenic agents than currently used inulin-type FOS. Furthermore, levan may act as an immunostimulant and antitumor agent. Therefore, levansucrases are considered biotechnologically promising proteins.

Levansucrases catalyze two different reactions: hydrolysis of the substrate and polymerization of fructose residues. The optimal conditions for these two reactions may be different. Moreover, the proportion of synthesized products depends not only on reaction conditions, but also on specific properties of the levansucrase protein. Previously it has been shown that the levansucrase Lsc3 of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 holds high and stable catalytic activity and produces levan as well as fructooligosaccharides (Visnapuu *et al.*, 2009; Visnapuu *et al.*, 2011).

The aim of this study was to examine Lsc3 in respect of its polymerizing activity and to optimize reaction conditions for the protein with the intention of producing enhanced amounts of levan and FOS. The conditions to be varied were temperature, sucrose concentration and the amount of enzyme in reaction mixture. According to the literature, levansucrases can be inhibited by a reaction by-product, glucose. Therefore we intended to study the effect of glucose on levan-forming activity of the Lsc3 as well.

We measured levan and FOS production by purified His₆-tagged Lsc3 at two different sucrose concentrations and two different temperatures. Products were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a carbohydrate column and evaporative light scattering detector. The results indicate that at lower sucrose concentration (300 mM) and lower temperature (30°C) levan-forming activity was promoted, whereas the highest

amount of FOS was produced at a high sucrose concentration (1200 mM). At prolonged incubation and high concentration (1200 mM) of sucrose, enhanced production of long-chain FOS was observed.

According to this study, the optimal method for efficient levan production (3.7 g levan per one mg of Lsc3) is to incubate 2.4 µg/ml of Lsc3 protein for 20 hours with 300 mM sucrose at 30°C. As optimal method for effective FOS production (62.8 g FOS per one mg of Lsc3) we recommend to incubate 1.3 µg/ml of Lsc3 protein for 20 hours with 1200 mM sucrose at 37°C.

To assess the impact of glucose on Lsc3, we observed levan-forming kinetics at different sucrose concentrations with and without glucose added. The results showed that the initial rate of levan forming activity decreases threefold when 100 mM glucose was added to the reaction mixture and by more than order of magnitude when 300 mM glucose was added. We conclude that a by-product, glucose, has a very strong inhibiting effect on Lsc3.

This study was conducted within the project „Design and application of novel levansucrase catalysts for the production of functional food ingredients (Functional Food Ingredients, **FFI**)“ SLOMR12215T.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abdel-Fattah, A. M., Amira, M., Helmy, W. A., Esawy, M. A. (2012). Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydr. Pol.* 89: 314-322.
- Abreu, M., Alvaro-Benito, M., Sanz-Aparicio, J., Plou, F. J., Fernandez-Lobato, M., Alcalde, M. (2013). Synthesis of 6-Kestose using an Efficient β -Fructofuranosidase Engineered by Directed Evolution. *Adv. Synth. Catal.*. doi:10.1002/adsc.201200769.
- Alamäe, T., Visnapuu, T., Mardo, K., Mäe, A., Zamfir, A. D. (2012). Levansucrases of *Pseudomonas* bacteria: novel approaches for protein expression, assay of enzymes, fructooligosaccharides and heterooligofructans. *Carbohydr. Chem.* 38: 176-191.
- Ananthakshmy, V. K., Gunasekaran, P. (1999). Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 42: 291-298.
- Arvidson, S. A., Rinehart, B. T., Gadala-Maria, F. (2006). Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. *Carbohydr. Polymer.* 65: 144-149.
- Baciu, I. E., Jördening, H. J., Seibel, J., Buchholz, K. (2005). Investigations of the transfructosylation reaction by fructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogue galactosyl-fructoside. *J. Biotechnol.* 116: 347-357.
- Banguela, A., Hernández, L. (2006). Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotech. Appl.* 23: 202-210.
- Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, U., Pankova, L., Danilevics, A. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process. Biochem.* 38: 701-706.
- Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, A., Linde, R. (2005). Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochem.* 40: 1535-1539.
- Belghith, H., Song, K. B., Kim, C. H., Rhee, S. K. (1996). Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. *Biotech. Lett.* 18: 467-472.
- Ben Ammar, Y., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., Minamiura, N. (2002). Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *J. Biotechnol.* 99: 111-119.
- Calazans, G. M. T., Lima, R. C., de Franca, F. P., Lopes, C. E. (2000). Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. *Int. J. Biol. Macromol.* 27: 245-247.
- Chambert, R., Petit-Glatron, M. F. (1991). Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 279: 35-41.
- Chambert, R., Treboul, G., Dedonder, R. (1974). Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 41: 285-300.
- Curiel, J. A., de Las Rivas, B., Mancheño, J. M., Muñoz, R. (2011). The pURI family of expression vectors: a versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein Expr. Purif.* 76: 44-53.
- Dahech, I., Belghith, K. S., Belghith, H., Mejdoub, H. (2012). Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 51: 329-335.

- Downes K., Terry L. A. (2010). A new acetonitrile-free mobile phase method for LC-ELSD quantification of fructooligosaccharides in onion (*Allium cepa* L.). *Talanta* 8: 118-24.
- Esawy, M. A., Amer, H., Gamal-Eldeen, A. M., Enshasy, H. A. E., Helmy, W. A., Abo-Zeid, M. A., Awad, G. E. (2013). Scaling up, characterization of levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage. *Carbohydr. Pol.* 95: 578-587.
- Esawy, M. A., Mahmoud, D. A. R., Fattah, A. F. A. (2008). Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties. *Braz. J. Chem. Eng.* 25: 237-246.
- Euzenat, O., Guibert, A., Combes, D. (1997). Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process. Biochem.* 32: 237-243.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, p. 571-607. *In: Walker, J. M. (ed), The Proteomics Protocols Handbook.* Humana Press, USA.
- Geier, G., Geider, K. (1993). Characterization and influence on virulence of levansucrase gene from the fireblight pathogene *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42: 387-404.
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food. Sci. Technol.* 7: 1-19.
- Goldman, D., Lavid, N., Schwartz, A., Shoham, G., Danino, D., Shoham, Y. (2008). Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase: an ordered microfibril structure of the enzyme promotes levan polymerization. *J. Biol. Chem.* 283: 32209-32217.
- Han, W. C., Byun, S. H., Kim, M. H., Sohn, E. H., Lim, J. D., Um, B. H., Kim, C. H., Kang, S. A., Jang, K. H. (2009). Production of lactosucrose from sucrose and lactose by a levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 1153-1160.
- Hellwege, E. M., Czaplá, S., Jahnke, A., Willmitzer, L., Heyer, A. G. (2000). Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8699-8704.
- Hernández, L., Arrieta, J., Betancourt, L., Falcon, V., Madrazo, J., Coego, A., Menéndez, C. (1999). Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Curr. Microbiol.* 39: 146-152.
- Hernández, L., Arrieta, J., Menéndez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M. F., Chambert, R. (1995). Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* 309: 113-118.
- Hettwer, U., Gross, M., Rudolph, K. (1995). Purification and properties of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J. Bacteriol.* 177: 2834-2839.
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis - mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *J. Biochem.* 407: 189-198.
- van Hijum, S. A. F. T., Bonting, K., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2001). Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 323-328.

- van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L. and van Geel-Schutten, I. G. H. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Mol. Biol. Rev.* 70: 157-176.
- van Hijum, S. A. F. T., Szalowska, E., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2004). Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* 150: 621-630.
- Jang, K. H., Kang, S. A., Kim, C. H., Lee, J. C., Kim, M. H., Son, E. W., Rhee, S. K. (2007) Characterization of levan hydrolysis activity of levansucrase from *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 and *Rahnella aquatilis* ATCC 33071. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 482-484.
- Jang, K. H., Song, K. B., Kim, C. H., Chung, B. H., Kang, S. A., Chun, U. H., Choue, R. W., Rhee, S. K. (2001). Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 23: 339-344.
- Kim, K. H., Chung, C. B., Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S., Kim, C. H. (2005). Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J. Cosmet. Sci.* 56: 395-406.
- Koczan, J. M., McGrath, M. J., Zhao, Y., Sundin, G. W. (2009), Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. *Phytopathology* 99: 1237-1244.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lafraya, A., Sanz-Aparicio, J., Polaina, J., Marin-Navarro, J. (2011). Fructo-Oligosaccharide Synthesis by Mutant Versions of *Saccharomyces cerevisiae* Invertase. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 6148-6157.
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., van Laere, A., Rabijns, A., van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J. Exp. Bot.* 60: 727-740.
- Li, Y., Triccas, J. A., Ferenci, T. (1997). A novel levansucrase-levanase gene cluster in *Bacillus stearothermophilus* ATCC12980. *Biochim. Biophys. Acta* 1353: 203-208.
- Li, H., Ullrich, M. S. (2001). Characterization and mutational analysis of three allelic *lsc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 183: 3282-3292.
- Livingston, D. P. 3rd, Hinch, D. K., Heyer, A. G. (2009). Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 2007-2023.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Lyness, E. W., Doelle, H. W. (1983). Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotech. Lett.* 5: 345-350.
- Mardo, K., Mäe, A., Visnapuu, T., Alamäe, T. (2012). Different tagging modes of a levansucrase protein from *Pseudomonas syringae* pv. tomato for structure-function analysis. *In: Proceedings of the 8th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience : 8th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience. (Toim.) Rapkova, R.; Copikova, J., Šarka, E.. Prague, Czech Republic: Czech Chemical Society, 2012, 99-102.*
- Martinez-Fleites, C., Ortiz-Lombardia, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G., Hernández, L., Davies, G. J. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem. J.* 390: 19-27.

- Marx, S. P., Winkler, S., Hartmeier, W. (2000). Metabolization of β -(2,6)-linked fructoseoligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 163-169.
- Menéndez, C., Hernández, L., Selman, G., Mendoza, M. F., Hevia, P., Sotolongo, M., Arrieta, J. G. (2002). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an exo-levanase gene from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4. *Curr. Microbiol.* 45: 5-12.
- Meng, G., Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. Struct. Biol.* 10: 935-941.
- Ohtsuka, K., Hino, S., Fukushima, T., Ozawa, O., Kanematsu, T., Uchida, T. (1992). Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JMC-1683. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 1373-1377.
- Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, E., Olvera, C., López-Munguía, A. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Eng. Des. Sel.* 21: 589-595.
- Ozimek, L. K., Euverink, G. J. W., van der Maarel, M. E. C. and Dijkhuizen, L. (2005). Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Lett.* 579: 1124-1128.
- Ozimek, L. K., Kralj, S., van der Maarel, M. E. C. And Dijkhuizen, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology* 152: 1187-1196.
- Praznik, W., Beck, R. H. F. (1985). Application of gel permeation chromatographic systems to the determination of the molecular weight of inulin. *J. Chromatogr. A* 348: 187-197.
- Rairakhwada, D., Seo, J. W., Seo, M. Y., Kwon, O., Rhee, S. K., Kim, C. H. (2010). Gene cloning, characterization and heterologous expression of levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 195-204.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M. J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104: S1-63.
- Rozen, R., Bachrach, G., Bronshteyn, M., Gedalia, I., Steinberg, D. (2001). The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 195: 205-210.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning*, 3rd edition, by. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sangiliyandi, G., Ray, K. C., Gunasekaran, P. (1999). Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 21: 179-182.
- Song, D. D., Jacques, N. A. (1999). Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem. J.* 341: 285-291.
- Song, K. B., Seo, J. W., Kim, M. G., Rhee, S. K. (1998). Levansucrase of *Rahnella aquatilis* ATCC33071. Gene cloning, expression, and levan formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 864: 506-511.

- Sonnenburg, E. D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S. K., Firbank, S. J., Bolam, D. N., Sonnenburg, J. L. (2010). Specificity of polysaccharide use in intestinal *Bacteroides* species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell* 141: 1241-1252.
- Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.
- Tieking, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F., Gänzle, M. G., (2005). Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 655-663.
- Trujillo, L. E., Gomez, R., Banguela, A., Soto, M., Arrieta, J. G., Hernández, L. (2004). Catalytical properties of N-glycosylated *Gluconoacetobacter diazotrophicus* levansucrase produced in yeast. *Electron. J. Biotechnol.* 7: 116–123.
- Valluru, R., Van den Ende, W. (2008). Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *J. Exp. Bot.* 59: 2905-2916.
- Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M. P., Valdez-Alarcón, J. J. (2009). Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *J. App. Microbiol.* 106: 1763–1778.
- Vigants, A., Hicke, H. G., Marx, S. P. (2001). A simple and efficient method for the purification of membrane-bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Curr. Microbiol.* 42: 415-418.
- Vigants, A., Upite, D., Scherbaka, R., Lukjanenko, J., Ionina, R. (2013). An influence of ethanol and temperature on products formation by different preparations of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Folia Microbiol.* 58: 75-80.
- Vijn, I., Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.* 120: 351-360.
- Visnapuu, T. (2007). Levaansukraasi geenide ekspresseerimine *E. coli*'s ja valkude omaduste uurimine. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Visnapuu, T. (2012). Levansucrases encoded in the genome of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: heterologous expression, biochemical characterization, mutational analysis and spectrum of polymerization products. Doktoritöö, Tartu Ülikool.
- Visnapuu, T., Mardo, K., Mosoarca, C., Zamfir, A. D., Vigants, A., Alamäe, T. (2011). Levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: Substrate specificity, polymerizing properties and usage of different acceptors for fructosylation. *J. Biotechnol.* 155: 338-349.
- Visnapuu, T., Mäe, A. and Alamäe, T. (2008). *Hansenula polymorpha* maltase gene promoter with sigma 70-like elements is feasible for *Escherichia coli*-based biotechnological applications: Expression of three genomic levansucrase genes of *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Process. Biochem.* 43: 414-422.
- Visnapuu, T., Zamfir, A. D., Mosoarca, C., Stanescu, M. D. and Alamäe, T. (2009). Fully automated chip-based negative mode nanoelectrospray mass spectrometry of fructooligosaccharides produced by heterologously expressed levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 23: 1337-1346.
- Waldherr, F. W., Meissner, D., Vogel, R. F. (2008). Genetic and functional characterization of *Lactobacillus panis* levansucrase. *Archives of Microbiol.* 190: 497-505.

- Yanase, H., Iwata, M., Nakahigashi, R., Kita, K., Kato, N., Tonomura, K. (1992). Purification, crystallization, and properties of extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 1335-1337.
- Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K., Okamoto, K. (2002). Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J. Biochem.* 132: 565-572.
- Yoo, S. H., Yoon, E. J., Cha, J., Lee, H. G. (2004). Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.* 34: 37-41.
- Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides - occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microb. Technol.* 19: 107-117.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://www.cazy.org>

<http://www.brenda-enzymes.org>

<http://www.orafti.com>

<http://www.sigmaaldrich.com>

<http://web.expasy.org/protparam/>

LISA 1

Kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) meetodika suhkrute lahutamiseks

Heiki Vija, Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut, Tallinn

Glükoosi, fruktoosi, sahharoosi ja FOS-ide kogus määrati sarnaselt Downes ja Terry (2010) kirjeldatud meetodikale.

Proovide valmistamine

Fruktoosist, glükoosist, sahharoosist ja rafinoosist valmistati 20% etanoolis lahused kontsentratsiooniga 20 mg/ml. Nende lahuste võrdses hulgas kokkusegamisel saadi standardlahus iga suhkru kontsentratsiooniga 5 mg/ml. Standardlahuse lahjendamisega valmistati lahused kontsentratsioonidega 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1 mg/ml. Levaansukraasi reaktsioonisegudest valmistati analüüsiks proovid järgnevalt: proov segati hoolikalt Vortex mikseril ja tehti sellest 20% etanoolilahuses lahjendus arvestusega, et ühegi suhkru kontsentratsioon ei ületaks 5 mg/ml. Sõltuvalt mutantse või metsiktüüpi levaansukraasi omadustest ja reaktiivsusest olid sobivad lahjendused vahemikus 20-100x. Lahused segati, tsentrifuugiti 15 min 10 000 g, et eraldada lahustumatud osakesed, ja pipeteeriti 1 ml lahust kromatograafi proovivialli.

Vedelikkromatograafiline lahutamine

Suhkrute analüüsiks kasutati kromatograafi Aquity UPLC (Waters, USA) koos binaarse pumba ja automaatse proovivõtjaga ning Aquity ELS (*evaporative light-scattering*) detektoriga (Waters, USA). Tingimused: võimendus (*gain*) 200, pihustus (*drift tube*) 50 °C, gaas (N₂) 20 psi (1.3 l/min). Suhkrud lahutati Alltech Prevail Carbohydrate ES kolonnil (250 x 4.6 mm; Grace, USA), mille osakeste suurus on 5 µm. Proovide pealekandmiseks kasutati eelkolonni Alltech Prevail Carbohydrate ES (7.5 x 4.6 mm; Grace, USA). Kromatograafia etapid viidi läbi toatemperatuuril ja vooluti voolukiirus oli 0.6 ml/min. Vooluti koosnes vedelikkromatograafia jaoks sobivast veest (*LC grade*) (A) ja atseetonitriilist (B). Lineaarne voolutusgradient atseetonitriili suhtes oli järgmine: 70-55% 15 min; 55% 10 min; 55-70% 2 min; 70% 13 min. Analüüsitava proovi kogus ühes tsükli oli 5 µl.

Tulemuste analüüs ja andmete töötlemine

Standardsuhkrute väljumisaegade alusel identifitseeriti uuritavates proovides vastavad ained. Kõrgema polümerisatsiooniastmega FOS-id identifitseeriti kirjanduses toodud analoogia alusel (Downes ja Terry, 2010). FOS-ide polümerisatsiooniastmega 3-10 kogused kalibreeriti rafinoosi abil. Proovide analüüsil saadud kromatogrammid integreeriti. Tehti kalibreerimisgraafik erinevate kontsentratsiooniga suhkrute standardlahuste kromatogrammide piikide pindala ja suhkru kontsentratsiooni logaritmidest. Saadud lineaarsele sõltuvusele arvutati funktsioonivõrrand kujul $y=ax+b$. Kuna glükoosi piigi pindala erines märgatavalt teiste suhkrute piigi pindalast, siis arvutati glükoosi ja teiste suhkrute jaoks erinevad funktsioonivõrrandid. Saadud võrrandite alusel arvutati uuritavates proovides registreeritud piikide pindalade alusel suhkrute kontsentratsioon võttes arvesse uuritavatele proovidele tehtud lahjendust. Paralleelproovide tulemuste alusel saadi määramisveaks kuni 10%. Kõikide reaktsioonisegu komponentide sisaldused leiti milligrammides ühe ml kohta. Vaba glükoosi ja fruktoosi sisalduse järgi arvutati transfruktosüüliv aktiivsus ehk reaktsiooniproduktidesse seotud fruktoosi protsentuaalne osakaal. Levaansukraaside võime toota FOS-e väljendati grammides mg valgu kohta.

Kasutatud kirjandus

Downes K., Terry L.A. (2010) A new acetonitrile-free mobile phase method for LC-ELSD quantification of fructooligosaccharides in onion (*Allium cepa* L.). *Talanta* 82: 118-2

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anneli Aasamets (03.02.1986)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Levaansukraas Lsc3 polümeriseerijana: reaktsioonitingimuste optimeerimine soovitud produktide sünteesiks,

mille juhendajad on Tiina Alamäe ja Triinu Visnapuu,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013