

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

**Levaani ja fruktooligosahhariidide süntees *Pseudomonas syringae* pv. tomato  
levaansukraasiga Lsc3**

Magistritöö  
Molekulaar- ja rakubioloogia  
30 EAP  
Anneli Aasamets

Juhendajad  
dotsent Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat  
teadur Triinu Visnapuu, PhD



TARTU 2016

## INFOLEHT

### **Levaani ja fruktooligosahhariidide süntees *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasiga Lsc3**

Kuigi  $\beta$ -2,6 fruktaanidel, levaanil ja fruktooligosahhariididel (FOS), on mitmeid biotehnoloogilisi rakendusi, on neid veel suhteliselt vähe uuritud ja nende suures mahus tootmine on ebaefektiivne. Käesolevas töös optimeeriti levaani ja levaani-tüüpi FOS-ide kuluefektiivset sünteesi levaansukraasiga Lsc3 bakterist *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Iseloomustati sünteesitud produktide spektrit ja molekulmasse ning uuriti potentsiaalselt prebiootiliste fruktaanide vastupidavust maohappele ja autoklaavimisele.

Märksõnad: levaan, levaani-tüüpi fruktooligosahhariidid, levaansukraas, prebiootikumid

P310 Proteiinid, ensümolooogia; B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia; T360 Biokeemiatehnoloogia; T490 Biotehnoloogia

### **Synthesis of levan and fructooligosaccharides using levansucrase Lsc3 of *Pseudomonas syringae* pv. tomato**

Despite several reports demonstrating the potential applications of levan and levan-type fructooligosaccharides (FOS) in bio- and food technology, they are still poorly studied and the production of levan and levan-type FOS has not reached industrial levels. In the present work we have elaborated and optimised the cost-efficient synthesis of levan and levan-type FOS using stable and catalytically active levansucrase Lsc3 of *Pseudomonas syringae* pv. tomato. The product profile was characterised by the spectrum of FOS and molecular weight of levan. Potentially prebiotic fructans were analysed for their resistance to heat-sterilization and acidic conditions similar to human stomach.

Keywords: levan, levan-type fructooligosaccharides, levansucrase, prebiotics

P310 Proteins, enzymology; B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology; T360 Biochemical technology; T490 Biotechnology

## SISUKORD

INFOLEHT .....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1 Bakterite levaansukraasid .....	7
1.2 Levaansukraasi aktiivsuse mõõtmise meetodid .....	12
1.3 Fruktaanid ja nende omadused. Levaani tootmine ja praktilised kasutusvõimalused .....	13
1.4 Fruktooligosahhariidid kui erinevate transfruktosüülivate ensüümide reaktsiooniproduktid. Fruktooligosahhariidide süntees ja puhastamine .....	16
1.5 Levaan ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidid kui potentsiaalsed prebiootikumid .....	18
1.6 Levaani ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidide sünteesi mõjutamine reaktsioonitingimustega .....	20
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	21
2.1 Töö eesmärgid .....	21
2.2 Materjal ja meetodika .....	21
2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid. Mutantide konstrueerimine, lsc3 geeni klonimine pURI3 vektorisse ja konstruktsioonide kontrollimine .....	21
2.2.2 Levaansukraaside ekspresseerimine ja puhastamine .....	22
2.2.3 Valgu kontsentratsiooni määramine .....	22
2.2.4 Levaansukraasi sahharoosi lõhustava aktiivsuse ja kineetiliste parameetrite määramine .....	23
2.2.5 Polümerisatsiooniproduktide analüüs .....	23
2.2.6 Levaani sünteesi kineetika mõõtmine mikroplaadil .....	24
2.2.7 Levaansukraaside sahharoosi lõhustamise kineetika <i>online</i> mõõtmine TMB meetodil .....	25
2.2.8 Levaani tootmine rafinoosist .....	26
2.2.9 Levaani, inuliini ja FOS-ide vastupidavuse uurimine happete ja autoklaavimisele .....	26
2.2.10 Redutseerivate suhkrute määramine .....	27
2.3 Tulemused ja arutelu .....	27
2.3.1 Levaani ja FOS-ide süntees Lsc3 valguga .....	28
2.3.1.1 Reaktsioonitingimuste optimeerimine kuluefektiivseks produktide tootmiseks .....	28
2.3.1.2 Levaansukraasi sahharoosi hüdrolyüsiva reaktsiooni <i>online</i> jälgimine mikroplaadil. Meetodika valideerimine metsiktüüpi ja mutantsete valkudega .....	35
2.3.1.3 Glükoos ja fruktoos kui levaansukraasi inhibiitorid .....	37

2.3.1.4 Levaani süntees rafinoosist Lsc3 ensüümiga.....	40
2.3.2 Lsc3 fruktaanide omadused.....	41
2.3.2.1 Lsc3 levaani molekulmass ja bimodaalne jaotus.....	41
2.3.2.2 Lsc3 levaani ja FOS-ide vastupidavus happele ja autoklaavimisele .....	44
KOKKUVÕTE.....	48
SUMMARY .....	50
KASUTATUD KIRJANDUS.....	52
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	59
LIHTLITSENTS .....	60

## KASUTATUD LÜHENDID

DNS – 3,5-dinitrosalitsüülhape

DP – polümerisatsiooniaste (*degree of polymerisation*)

FOS – fruktooligosahhariid

Fru – fruktoos

Fru-Lev – fruktosüül-ensüüm vaheühend

Gal – galaktoos

GL – *Glucose Liquicolor*

Glc – glükoos

GPC – geelkromatograafia (*gel permeation chromatography*)

HMW – kõrge molekulmass (*high molecular weight*)

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

$K_i$  – inhibitsioonikonstant (mM)

$K_m$  – Michaelis’*e* konstant ehk afiinsus substraadile (mM)

LMW – madal molekulmass (*low molecular weight*)

Lsc3 – *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraas

OD – optiline tihedus (*optical density*)

RFO – rafinoosi perekonna oligosahhariidid (*raffinose family oligosaccharides*)

RFOS – rafinoosist sünteesitud FOS-id (*raffinose-derived oligosaccharide*)

SacB – *Bacillus subtilis*’*e* levaansukraas

Suc – sahharoos

TA – transfruktosüüliv aktiivsus

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

TMB – 3,3’,5,5’ tetrametüülbensidiin

$V_{max}$  – maksimaalne reaktsioonikiirus (U/mg)

WT – metsiktüüpi (muteerimata) valk (*wild type*)

## SISSEJUHATUS

Soole mikroflooral on suur mõju inimese tervisele, mistõttu kasvab ühiskonnas huvi prebiootikumide vastu. Inimesele seedumatud fruktoosijääkidest koosnevad polü- ja oligofruktaanid on selektiivseks toiduks kasulikele soolebakteritele, mõjutades nende mitmekesisust, hulka ja elutegevust. Seni on prebiootilist toimet uuritud peamiselt  $\beta$ -2,1 sidemega inuliini-tüüpi taimsetel fruktaanidel. Hiljuti aga näidati, et levaani-tüüpi fruktaanid ( $\beta$ -2,6 sidemega) on neist prebiootilise toime poolest veelgi tõhusamad. Fruktaanidel on mitmeid võimalikke rakendusi farmaatsia-, toiduainetetööstuses ja meditsiinis. Kuna levaani ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidide suures mahus tootmine on veel suhteliselt ebaefektiivne, siis on nende kasulikke toimeid siiani vähe uuritud.

Meie töögrupp on isoleeritud katalüütiliselt väga aktiivne ja stabiilne levaansukraas Lsc3 bakterist *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Levaansukraasid katalüüsivad nii substraadi (nt sahharoosi) hüdrolyüüsi kui ka fruktoosijäägi ülekannet erinevatele aktseptoritele. Reaktsiooni käigus moodustuvad  $\beta$ -2,6 sidemega fruktaanid: polümeerne levaan ja lühikese ahelaga fruktooligosahhariidid (FOS-id). Oleme näidanud, et levaansukraasiga Lsc3 saab sünteesida levaani ja vastavaid FOS-e mahus, mis võimaldab nende bioloogiliste toimete (sh prebiootilisuse) uuringuid. Minu magistritöö eesmärgiks oli uurida ja optimeerida levaani ja levaani-tüüpi FOS-ide sünteesi Lsc3 valguga ning iseloomustada vastavaidprodukte – uurida nende spektrit, molekulmassi ning vastupidavust happele ja autoklaavimisele.

Töö valmis TÜMRI Geneetika õppetoolis, grantiprojekti '*Pseudomonas syringae* levaansukraasi struktuur ja funktsioon: alusuuringud ja biotehnoloogilised aspektid' (2012-2015), EL Regionaalarengu Fondist rahastatud projekti '*Functional Food Ingredients; FFI* (2012-2015) ja hiljuti alanud projekti 'Uudsete prebiootikumide ensümaatilise süntees: ensüümide iseloomustamine ja produktide prebiootilise efektiivsuse hindamine' PUT1050 (2016-2019) raames. Magistritöö andmeid on esitatud publikatsioonides 'Production of levan and fructooligosaccharides using levansucrase of *Pseudomonas syringae* pv. tomato' ajakirjas Proceedings of the 10th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience (2014) ja „High-throughput assay of levansucrase variants in search of feasible catalysts for the synthesis of fructooligosaccharides and levan“ ajakirjas Molecules (2014).

Täna oma juhendajaid Tiina Alamäed ja Triinu Visnapuud, kes aitasid praktilist tööd planeerida ja käesolevat tööd koostada. Täna ka kõiki abivalmeid TÜMRI töötajaid ja kaastudengeid ning Heiki Vijat KBFI-st, kes töö valmimisele kaasa aitasid. Lisaks täna Prof Augustin Lopez Munguiat (Mehhiko), kes mind lahkelt välisõpingute käigus juhendas. Samuti täna kõiki sealseid laborikaaslasi, kes mind soojalt vastu võtsid ja töövõtete omandamisel abistasid.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Bakterite levaansukraasid

Levaansukraasid (EC 2.4.1.10) on bakteriaalsed ekstratsellulaarsed ensüümid, mis kuuluvad glükosiidi hüdrolaaside perekonda 68 (GH68). GH68 perekond koondab bakteriaalseid fruktosüültransferaase (FTF) (levaansukraase ja  $\beta$ -fruktofuranosidaase), mis sünteesivad  $\beta$ -sidemega fruktaane – fruktoosijääkidest koosnevaid oligo- ja polüsahhariide. Lisaks levaansukraasidele kuuluvad GH68 perekonda ka inulosukraasid (EC 2.4.1.9). Erinevalt levaansukraasidest, mis sünteesivad  $\beta$ -2,6 sidemega fruktaane (Lammens *et al.*, 2009), on inulosukraaside poolt sünteesitud fruktaaniahelas fruktoosijääkide vahel  $\beta$ -2,1 side (Banguela ja Hernandez, 2006).

### Grampositiivsete ja -negatiivsete bakterite levaansukraasid

Levaansukraase on nii grampositiivsetel kui ka -negatiivsetel bakteritel. Gramnegatiivsetest bakteritest on üks või mitu levaansukraasi näiteks taimedega seotud bakteritel *Pseudomonas syringae* (Hettwer *et al.*, 1995; Visnapuu *et al.*, 2008), *Zymomonas mobilis* (Yanase *et al.*, 2002), *Erwinia amylovora* (Geier ja Greider, 1993) ning *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Martínez-Fleites *et al.*, 2005). Suhteliselt hiljuti kirjeldati levaansukraas halofiilsel gramnegatiivsetel bakteril perekonnast *Halomonas* (Poli *et al.*, 2009). Grampositiivsetest bakteritest on levaansukraasid näiteks liikidel *Bacillus subtilis* (Euzenat *et al.*, 1997; Meng ja Fütterer, 2003), *B. megaterium* (Homann *et al.*, 2007), *Lactobacillus sanfranciscensis* (Korakli *et al.*, 2003), *L. reuteri* (Van Geel-Schutten *et al.*, 1999) ja *Leuconostoc mesenteroides* (Kang *et al.*, 2005). Ka mõnede halofiilsete arhede (näiteks *Halorubrum lacusprofundi*, *Haloalkalicoccus jeotgali* ja *Haloarcula marismortui*) genoomis kodeeritakse levaansukraase (www.cazy.org; www.brenda-enzymes.org).

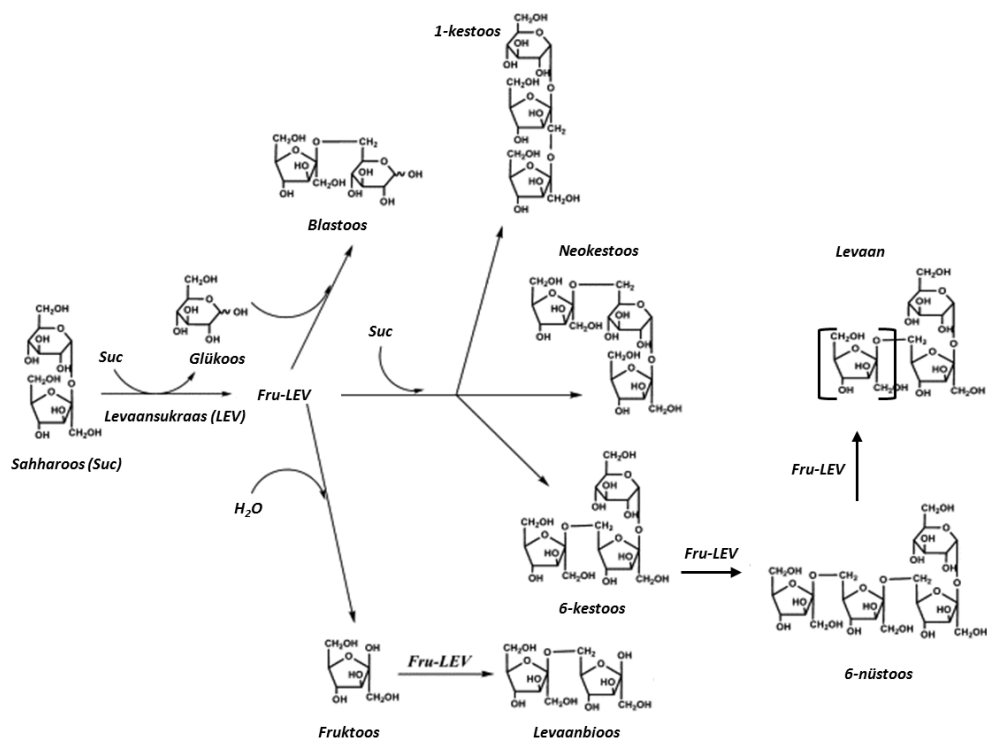
Levaansukraasid on kõige enam uuritud bakteriaalsed fruktosüüli transferaasid. Praeguseks on kristalliseeritud ja 3D struktuur kindlaks tehtud *B. subtilis*'e, *G. diazotrophicus*'e, *B. megaterium*'i, ja *E. amylovora* levaansukraasidel (Meng ja Fütterer, 2003; Martínez-Fleites *et al.*, 2005; Strube *et al.*, 2011; Wuerges *et al.*, 2015). Levaansukraasidel on viielabalise  $\beta$ -propelleri kuju ja valgu tsentraalse õõnsuse põhjas asub aktiivtsenter, mille moodustavad kolm kõrgelt konserveerunud happelist aminohapet, nn katalüütiline kolmik (Meng ja Fütterer, 2003). Kuigi erinevate bakterite levaansukraasidel on katalüüsis ja substraadi sidumises osalevad aminohapped konserveerunud, on järjestustes ka varieeruvaid piirkondi ja valkude suurused on bakteriliigiti väga erinevad. Grampositiivsete bakterite levaansukraasid on enamasti suuremad, näiteks *L. sanfranciscensis*'e ja *L. reuteri* levaansukraasid on vastavalt 879 ja 804 aminohapet pikad (Van Hijum *et al.*, 2004; Tieking *et al.*, 2005) ja gramnegatiivsete bakterite *Z. mobilis*'e ja *P. syringae* levaansukraasid vastavalt 423 ja

431 aminohapet pikad (Kyono *et al.*, 1995; Visnapuu *et al.*, 2008). Erinev on ka levaansukraasi rakust välja suunamise mehhanism. Grampositiivsete bakterite levaansukraasidel on N-terminaalne signaalpeptiid, mis membraani läbimisel ensüümilt eemaldatakse (Hernandez *et al.*, 1999; Van Hijum *et al.*, 2006). Gramnegatiivsete bakterite levaansukraasidel on taoline signaalpeptiidist sõltuv sekretsioonimehhanism tuvastatud ainult *G. diazotrophicus*'e levaansukraasil (Hernandez *et al.*, 1999). Grampositiivsete bakterite levaansukraasi tööks on vajalikud Ca<sup>2+</sup> ioonid, mis stabiliseerivad ensüümi struktuuri. Selline kaltsiumi siduv piirkond gramnegatiivsete bakterite levaansukraasidel puudub (Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Van Hijum *et al.*, 2006).

### **Levaansukraasi reaktsioonimehhanism ja aktiivtsenter**

Levaansukraaside reaktsioonimehhanism on järgmine (Meng ja Fütterer, 2003; Ozimek *et al.*, 2006; Joonis 1): levaansukraas lõhub substraadimolekulis fruktoosi- ja glükoosijäägi vahelise glükosiidsideme ja jääb kovalentselt seotuks fruktoosijäägiga (moodustub fruktosüül-ensüüm vaheühend) ja glükoos vabaneb keskkonda. Seejärel seondub aktseptormolekul, millele fruktoosijääk liidetakse. Kui aktseptoriks on vesi, toimub substraadi hüdrolyüs; kui aktseptoriks on sahharoos või fruktaanahel, toimub tranfruktosüülimine ja võimalikeks sünteesiproduktideks on erineva ahelapikkusega oligofruktaanid ning polümeerne levaan. Kui aktseptoriks on glükoos, võib vahetusreaktsioonis moodustuda sahharoos või blastoos. On näidatud, et aktseptorina võib seonduda ka fruktoos, misjärel moodustub levaanbioos (Tanaka *et al.*, 1981). Levaansukraasi substraaditasku saab jagada alapiirkondadeks. Alapiirkond -1 on kõrge spetsiifilisusega ja sinna seostub vaid fruktoosijääk (näiteks fruktosüüli doonormolekul sahharoosist). Alapiirkond +1 on väiksema spetsiifilisusega ja sinna võivad seostuda nii glükoosijääk kui ka fruktoosijääk (näiteks doonormolekuli glükoosijääk või aktseptormolekuli fruktoosijääk) (Meng ja Fütterer, 2003; Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Ozimek *et al.*, 2006; Meng ja Fütterer, 2008).





**Joonis 1.** Levaansukraasi reaktsiooni erinevad võimalused. Ensüümi reageerimisel sahharoosiga tekib fruktosüül-ensüüm vaheühend (Fru-Lev) ja vabaneb glükoos. Vaheühendiga võivad reageerida erinevad aktseptorid (vesi, glükoos, sahharoos või fruktaanahel) ja tulemuseks on 1) sahharoosi hüdrolüüs, 2) erinevate produktide teke. Joonis on pärit modifitseeritud kujul artiklist Santos-Moriano *et al.* (2015), lisatud on eestikeelsed nimetused.

Afiinsus erinevatele aktseptoritele on ensüümiti erinev, millest tulenevalt on ka levaansukraaside reaktsioonikulg erinev ja tulemuseks igale levaansukraasile iseloomulik reaktsiooniproductide spekter. Paljud levaansukraasid (seal hulgas näiteks *B. subtilis*'e, *Z. mobilis*'e, *L. reuteri* ja *P. syringae* levaansukraasid) sünteesivad nii lühikese ahelaga FOS-e kui ka polümeerset levaani, ja seda erinevates vahekordades sõltuvalt ensüümi päritolust ja reaktsioonitingimustest (Hernandez *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998; Tambara *et al.*, 1999; Bekers *et al.*, 2002; Ozimek *et al.*, 2006; Visnapuu *et al.*, 2011). Mõned levaansukraasid sünteesivad rohkem levaani, näiteks ensüümid bakteritest *B. subtilis* ja *B. megaterium* (Chambert *et al.*, 1974; Song ja Jacques, 1999; Homann *et al.*, 2007), teised aga (näiteks *G. diazotrophicus* ja *E. amylovora* ensüümid) peaaesjalikult FOS-e (Hernandez *et al.*, 1995; Caputi *et al.*, 2013). Fruktosüüli aktseptorite ring on levaansukraasidel lai: lisaks erinevatele mono- ja disahhariididele sobivad ka aromaatsed ja alifaatsed alkoholid ja produktidena moodustuvad nii tavalised fruktaanid kui ka heterooligofruktaanid (Mena-Arizmendi *et al.*, 2011; Visnapuu *et al.*, 2011).

### **Glükoos kui levaasukraasi inhibiitor**

Reaktsiooni kulgu ja produktide sünteesi mõjutavad oluliselt ka reaktsioonitingimused (pt 1.6) ning reaktsiooni kõrvalproduktina tekivad glükoos. Igast reageerinud sahharoosi molekulist vabaneb üks glükoosi molekul, mis hakkab reaktsiooni pidurdama (Lyness ja Doelle, 1983; Hettwer *et al.*, 1995; Ananthalakshmy ja Gunasekaran, 1999). Sahharoosist võib samuti ensüümi hüdrolyütilise aktiivsuse tulemusena vabaneda fruktoos, kuid võrreldes glükoosiga on selle kontsentratsioon reaktsioonisegus oluliselt madalam (Meng ja Fütterer, 2003). Lisaks on kirjanduse andmetel fruktoosi inhibeeriv toime levaani sünteesile võrreldes glükoosiga palju nõrgem. Näiteks *Z. mobilis*'e rakkudega sünteesitud levaani kogus vähenes 150 g/L glükoosi lisamisel 4.5 korda ja sama suures koguses fruktoosi lisamisel palju vähem – 1.8 korda (Ananthalakshmy ja Gunasekaran, 1999). Levaasukraasi produktiivsuse suurendamiseks on reaktsioonisegusse lisatud glükoosi oksüdaasi, mis oksüdeerib reaktsioonis tekkinud glükoosi glükoonhappeks (Han *et al.*, 2009).

### **Levaansukraaside substraadispetsiifika**

Kuigi levaansukraasi peamiseks ja eelistatuks substraadiks on sahharoos ( $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-Fruf; GF), siis on näidatud, et paljud levaansukraasid on võimelised kasutama ka rafinoosi ( $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-Fruf; GalGF) ja stahhüoosi ( $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Fruf; Gal2GF) (vt Joonis 4) (Yanase *et al.*, 2002; Van Hijum *et al.*, 2004; Seibel *et al.*, 2006; Visnapuu *et al.*, 2011). Enamasti varieeruvad  $K_m$  väärtused (afiinsus) sahharoosile erinevatel levaansukraasidel vahemikus 6.6-50 mM, ja tüüpiliselt on need väiksemad kui  $K_m$  väärtused rafinoosile. See tähendab, et levaansukraaside afiinsus sahharoosile on reeglina kõrgem kui rafinoosile (Ben Ammar *et al.*, 2002; Homann *et al.*, 2007; Olvera *et al.*, 2007; Waldherr *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2011; Caputi *et al.*, 2013). *P. syringae* pv. *phaseolicola* levaansukraasi afiinsus sahharoosile on aga erakordselt väike ( $K_m$  160 mM) ja rafinoosi ei kasutata ta üldse (Hettwer *et al.*, 1995). Seevastu *Z. mobilis*'e levaansukraas lõhustab rafinoosi suurema aktiivsusega kui sahharoosi (Yanase *et al.*, 2002).

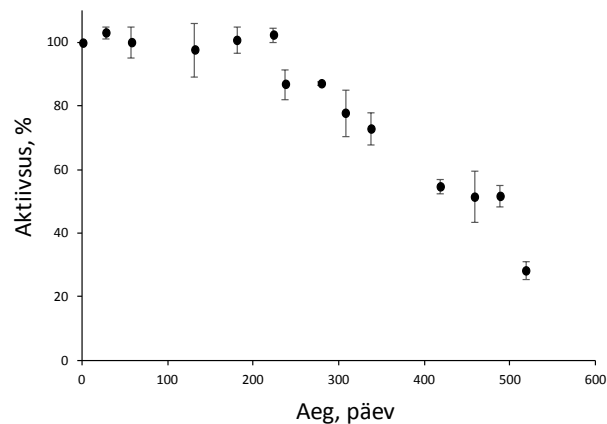
### **Levaansukraasi eksolevanaasne aktiivsus**

Levaansukraasil on ka levanaasne aktiivsus, mis samuti kujundab lõpp-produktide spektrit. Kui substraat (sahharoos) on reaktsiooni käigus ära tarvitatud, siis hakatakse kasutama sünteesitud polümeeri. Levaansukraas hüdrolyüsib  $\beta$ -2,6 sidet lineaarse levaaniahela otstest, vabastades fruktoosijääke. On näidatud, et hüdrolyüs peatub  $\beta$ -2,1 sidemega hargnemise kohal, mille tulemuseks on levaani osaline hüdrolyüs (Chambert *et al.*, 1974; Méndez-Lorenzo *et al.*, 2015). Näiteks *B. subtilis*'e levaansukraas suudab hüdrolyüsida tänu levaaniahela hargnemisele ainult kuni 30% levaanis

olevatest sidemetest (Méndez-Lorenzo *et al.*, 2015). Levaansukraasi levanaasne aktiivsus on sahharoosi lõhustavast aktiivsusest väga palju madalam, moodustades sellest vähem kui 1% (Yanase *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2007; Visnapuu *et al.*, 2011).

### Levaansukraaside stabiilsus ja reaktsioonitingimuste mõju ensümaatilisele aktiivsusele

Levaansukraasid on rakuväliste ensüümidenä vastupidavad keskkonnatingimustele. Enamasti on levaansukraasid stabiilsed temperatuurivahemikus 4-50°C (Song *et al.*, 1998; Ben Ammar *et al.*, 2002; Esawy *et al.*, 2008; Waldherr *et al.*, 2008). Nad säilitavad oma struktuuri ja aktiivsuse ka pikemaajalisel säilitamisel. Näiteks *P. syringae* pv. phaseolicola levaansukraas püsis temperatuuril 4°C aktiivsena vähemalt 6 kuud (Hettwer *et al.*, 1995). Meie töögrupis uuritav *P. syringae* pv. tomato levaansukraas Lsc3 säilitas maksimaalse aktiivsuse temperatuuril 37°C 223 päeva jooksul. Edaspidi hakkas ensüümi aktiivsus tasapisi langema, olles 337. säilituspäevaks langenud 73%-ni ja 488. päevaks 52%-ni algsest aktiivsusest (Joonis 2).



**Joonis 2.** *P. syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 katalüütilise aktiivsuse pika-ajaline säilimine temperatuuril 37°C. Lsc3 valku (0.09 mg/mL) inkubeeriti 518 päeva McIlvaine'i puhvris (pH 6.0) ja igal kuu mõõdeti proovist sahharoosi lõhustamise aktiivsust nagu on näidatud pt 1.2 (K. Mardo, avaldamata andmed).

Optimaalsed temperatuurid substraadi hüdrolyüsiks ja polümeriseerimiseks on erinevad. Üldiselt on madalatel temperatuuridel ülekaalus polümeriseeriv ja kõrgematel sahharoosi hüdrolyüsiv aktiivsus (Hettwer *et al.*, 1995; Rairakhwada *et al.*, 2010; Visnapuu *et al.*, 2011). pH vahemik, milles levaansukraasid suudavad katalüüsida, on samuti üsna lai, 3.0-8.0 (Esawy *et al.*, 2008; Rairakhwada *et al.*, 2010). Levaansukraasid taluvad suhteliselt hästi ka raskemetalliioone ja detergente ilma, et katalüütiline aktiivsus oluliselt väheneks (Hernandez *et al.*, 1995; Hettwer *et al.*, 1995; Sangiliyandi *et al.*, 1999; Esawy *et al.*, 2008; Visnapuu, 2012).

## 1.2 Levaansukraasi aktiivsuse mõõtmise meetodid

Levaansukraasi reaktsioonis vabaneb igast sahharoosi molekulist üks glükoosi molekul. Seetõttu saab levaansukraasi koguaktiivsust määrata sahharoosist vabanenud glükoosi hulkana, mis näitab ensüümiga reageerinud sahharoosi molekulide hulka. See lõhustamise etapp on vajalik nii hüdrolyüütiliseks kui ka transfruktosüülivaks aktiivsuseks. Vabanenud glükoosi kogust saab määrata erinevate meetoditega. Meie oleme oma töögrupis määranud glükoosi vabanemise kiirust levaansukraasi reaktsioonis Glucose Liquicolor'i reaktiiviga (Human GmbH, Wiesbaden, Germany), mis mõõdab glükoosi kontsentratsiooni ensümaatilisel – kasutades glükoosi oksüdaasi ja mõõtes moodustuva värvilise produkti hulka.

Kasutame tootjafirma protokollid ning kaliiberkõverat glükoosile (Visnapuu *et al.*, 2008). Levaansukraasi koguaktiivsus väljendatakse enamasti glükoosi hulkana mikromoolides, mis moodustub sahharoosi hüdrolyüüsil ühe minuti jooksul ühe mg valgu kohta ( $\mu\text{mol}/\text{mg} \times \text{min}$ ; U/mg) (Van Hijum *et al.*, 2001). Levaansukraaside afiinsus sahharoosile ( $K_m$ ; mM) ja maksimaalne reaktsioonikiirus ( $V_{\max}$ ; U/mg) arvutatakse erinevatel sahharoosi kontsentratsioonidel määratud reaktsioonide algkiiruste kaudu Michaelis-Menten'i võrrandi alusel (Van Hijum *et al.*, 2001; Visnapuu *et al.*, 2008). Glükoosi vabanemist saab mõõta ka tekkinud redutseeriva suhkru kontsentratsiooni kaudu, sest sahharoos ei ole redutseeriv suhkur, glükoos ja fruktoos/FOS-id aga on.

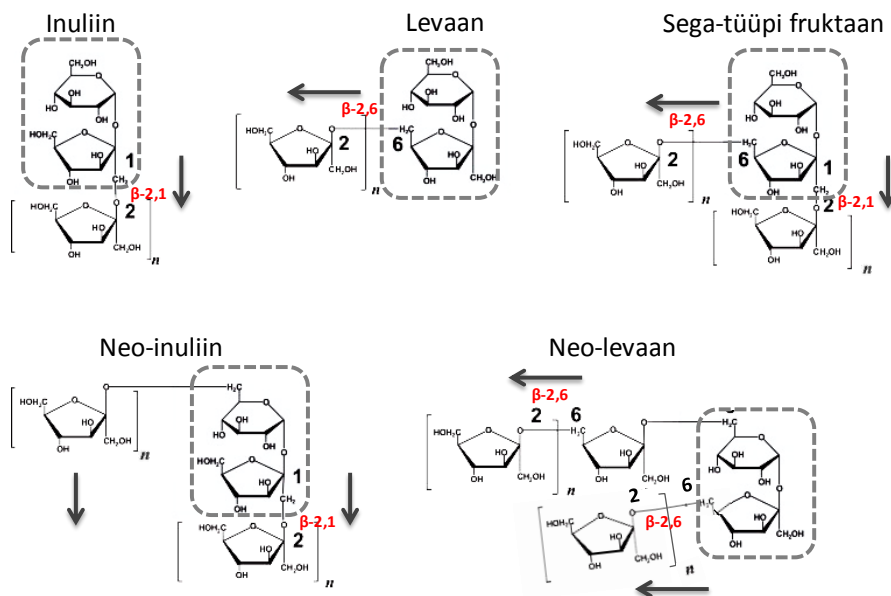
Enamasti kasutatakse redutseerivate suhkrute mõõtmist siiski levaansukraaside substraadispetsiifika uurimisel, näiteks võrdlemaks sahharoosi, rafinoosi ja stahhüoosi lõhustamise algkiirusi levaansukraasi reaktsioonis (Yanase *et al.*, 2002; Visnapuu *et al.*, 2008; Visnapuu, 2012). Sahharoosist moodustub redutseerivate suhkrutena glükoos ja fruktoos, rafinoosist melibioos ja fruktoos ning stahhüoosist redutseeriv trisahhariid ja fruktoos (Joonis 4). Sahharoos, rafinoos ja stahhüoos ise on mitteredutseerivad suhkrud. Redutseerivate suhkrute kontsentratsiooni määramiseks kasutatakse 3,5-dinitrosalitsüülhappe (DNS) (Miller, 1959) või Somogyi-Nelsoni meetodit (Yanase *et al.*, 2002) ja vastavaid kaliiberkõveraid.

Levaansukraasi transfruktosüüliv aktiivsus näitab sahharoosist pärineva fruktoosi hulka protsentides (TA%), mis on konkreetsetes reaktsioonis kasutatud levaani ja FOS-ide sünteesiks. TA% arvutatakse vaba glükoosi ja fruktoosi suhte kaudu valemiga:  $([\text{Glc}] - [\text{Fru}_v] / [\text{Glc}]) \times 100$ , milles [Glc] on glükoosi sisaldus ja [Fru<sub>v</sub>] on polümeriseerimata fruktoosi sisaldus reaktsiooniseigus (Yanase *et al.*, 2002; Visnapuu *et al.*, 2011). Vaba fruktoosi ja glükoosi sisaldust saab määrata näiteks kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga (*high-performance liquid chromatography*; HPLC) või siis ensümaatilisel (Visnapuu *et al.*, 2011; Mardo *et al.*, 2014b).

Levaani sünteesi kineetikat saab uurida spektrofotomeetriliselt, mõõtes hägu tekke kiirust (Visnapuu *et al.*, 2008; Goldman *et al.*, 2008). Meie töögrupis oleme uurinud levaani tekke kineetikat mikroplaadi kannukestes mahuga 200  $\mu\text{L}$ . Reaktsioonisegude optilise tiheduse tõusu (levaani teket) saab registreerida mikroplaadilugejaga lainepikkusel 400 nm. Levaani kogus reaktsioonisegudes arvutatakse puhastatud levaaniga tehtud kaliibergraafiku alusel. Levaani sünteesi algkiiruste põhjal saab arvutada maksimaalse levaani sünteesi kiiruse ( $V_{\text{max}}$ ; mg levaani mg valgu kohta minutis, mg/mg x min) ning levaasukraasi affiinsuse substraadile, nt sahharoosile, levaani sünteesil ( $K_m$ ; mM). (Visnapuu *et al.*, 2008; Aasamets *et al.*, 2014; Mardo *et al.*, 2014a).

### 1.3 Fruktaanid ja nende omadused. Levaani tootmine ja praktilised kasutusvõimalused Bakterite ja taimede fruktaanid

Fruktoosi monomeeridest koosnevad polümeerid – fruktaanid – moodustavad suure süsivesikute grupi, mille päritolu, polümerisatsiooniaste (*degree of polymerization*, DP), esinevad glükosiidsideme tüübid ja molekuli hargnemine võivad olla väga erinevad. Sõltuvalt sidemetüübist fruktoosi monomeeride vahel ja glükoosijäägi paiknemisest jagatakse fruktaani polümeerid viide suurde rühma – levaan, neo-levaan, inuliin, neo-inuliin ja segatüüpi fruktaanid (Joonis 3).



**Joonis 3.** Inuliini, levaani, neo-inuliini, neo-levaani ja segatüüpi fruktaani struktuur ja sideme tüüp fruktoosijääkide vahel. Kontuurjoonega on tähistatud fruktaani ahelas olev sahharoos, mis on fruktaani sünteesi esimene aktseptormolekul. Joonis on pärit modifitseeritud kujul artiklist Benkeblia (2013) ja lisatud on eestikeelsed nimetused.

Levaani polümeeri eellasmolekuliks on 6-kestoos, inuliinil 1-kestoos, neo-levaanil ja neo-inuliinil neokestoos (Ritsema ja Smeekens, 2003). Levaani põhiahelas on fruktoosi monomeerid ühendatud  $\beta$ -2,6 sidemega, seevastu inuliini põhiahelas on fruktoosi monomeeride vahel  $\beta$ -2,1 side. Molekuli hargnemine toimub vastavalt  $\beta$ -2,1 või  $\beta$ -2,6 glükosiidsidemete kaudu (Hettwer *et al.*, 1995; Banguela ja Hernandez, 2006). Neokestoosist, milles glükoosi monomeer asub kahe fruktoosi monomeeri vahel, võivad moodustuda neo-levaan või neo-inuliin (Van den Ende, 2013). Kui ühes fruktaanis on esindatud nii  $\beta$ -2,6 kui  $\beta$ -2,1 sidemega põhiahelad, siis kutsutakse neid sega-tüüpi fruktaanideks (Ritsema ja Smeekens, 2003). Sõltuvalt glükoosi monomeeri paiknemisest fruktaani ahelate suhtes jagatakse neid hargnenud ahelaga fruktaane graminaanideks ja agaviinideks (Mancilla-Margalli ja López, 2006).

Kui inuliini sünteesivad eelkõige taimed (üle 30 000 taimeliigi), nagu näiteks sigur (*Cichorium intybus*) ja mugul-päevalill ehk jeruusalemma artišok (*Helianthus tuberosus*) ning ka mõned bakterid, näiteks *L. reuteri* ja *Leuconostoc citreum* (Kaur ja Gupta, 2002; Van Hijum *et al.*, 2002; Olivares-Illana *et al.*, 2003; Wichienchot *et al.*, 2011), siis levaani sünteesivad paljud erinevad bakterid, aga ka mõned taimeliigid (Corrigan ja Robyt, 1979; Livingston *et al.*, 2009). Neo-tüüpi fruktaane leidub näiteks sparglis (*Asparagus*) (Pavis *et al.*, 2001), segatüüpi fruktaane (graminaane) sünteesivad näiteks agaavi perekonna esindajad (*Agave*) ja kõrrelised (*Gramineae*) (Van den Ende *et al.*, 2003; Mancilla-Margalli ja López, 2006). Ka inimtoiduks kasvatatavates kõrrelistes on fruktaane. Näiteks moodustavad graminaanid rukkil 6.5% ja nisul 2.9% tera kuivainest (Verspreet *et al.*, 2015 ja sealsed viited). Põldtimut (*Phleum pratense*) ja harilik kerahein (*Dactylis glomerata*) sünteesivad lineaarseid taimseid levaane, mida nimetatakse ka fleiinideks (*phleins*) (Suzuki ja Pollock, 1986).

### **Levaaniahela hargnemine, kõrge ja madala molekulmassiga levaanid**

Taimede lineaarsete levaanide DP on väike ja molekulmass on suhteliselt madal (2-33 kDa). Bakterite levaansukraasid sünteesivad enamasti hargnenud ja suure DP-ga (võib ulatuda  $10^6$  fruktoosijäägini) ning kõrge molekulmassiga (isegi enam kui 2 MDa) levaane (Vijn ja Smeekens, 1999; Banguela ja Hernandez, 2006). Bakteriaalses levaanis on kõrvalahelaid 2-30% (Simms *et al.*, 1990; Van Hijum *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2004), kuid keskmine hargnevusaste jääb 10% piiresse (Han *et al.*, 1990; Benigar *et al.*, 2014). Suure hargnevusega (30%) on näiteks *Streptococcus salivarius*'e levaan (Newbrun ja Baker, 1968), seevastu *Halomonas smyrnensis*'e levaansukraas sünteesib kirjanduse andmetel (Poli *et al.*, 2013) lineaarset levaani, mis on bakteriaalsete levaanide hulgas haruldane. Tanaka *et al.* (1980) on välja pakkunud, et levaanide hargnevus ja molekulmass on tihedalt seotud. Autorite arvamusel toimub levaanimolekuli suurenemine hargnemiste lisandumise arvelt,

kusjuures lineaarsete ahelate fruktoosijääkide arv püsib konstantsena (nt. *B. subtilis*'e levaanil 21-22 fruktoosijääki). Seega, mida kõrgem on levaani molekulmass, seda hargnum peaks levaan olema. Tanaka *et al.* (1980) poolt välja pakutud levaani struktuuri kinnitab ka levaanimolekuli sfääriline ehitus (Arvidson *et al.*, 2006). Levaan võib vesilahuses moodustada mitmetest levaanimolekulidest koosnevaid agregaatide ning seda protsessi võivad mõjutada nii levaani struktuur kui ka molekulmass (Benigar *et al.*, 2014).

On näidatud, et üks ja sama levaansukraas võib sünteesida mitut eri suurusega levaani. Näiteks *L. reuteri* levaansukraas sünteesib madala molekulmassiga (*low molecular weight*; LMW) levaani (150 kDa) ja suure molekulmassiga (*high molecular weight*; HMW) levaani (>2000 kDa) (Van Hijum *et al.*, 2001). *Z. mobilis*'e levaansukraas sünteesib näiteks 5 kDa ja 3000 kDa suurust levaani (Byun *et al.*, 2014) ja *B. subtilis*'e levaansukraas 8.3 kDa ja >3000 kDa suurust levaani (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Ozimek *et al.* (2006) arvavad, et need erineva molekulmassiga produktid on levaansukraasil protsessiivse (HMW levaan) ja mitteprotsessiivse (LMW levaan ja FOS-id) transfruktosüülimise tagajärg.

### **Levaanide rakendus**

Levaani viskoossus, lahustuvus nii vees kui õlis, vastupidavus sooladele, pindaktiivsetele ainetele, kõrgele temperatuurile, alustele ja nõrgematele hapetele võimaldab seda kasutada stabilisaatorina, paksendajana, emulgaatorina, kapslimaterjalina, osmoregulaatorina ja krüoprotektorina paljudes valdkondades (Bekers *et al.*, 2005; Banguela ja Hernandez, 2006). Levaanil on näidatud kasvavavastast toimet (Yoo *et al.*, 2004; Esawi *et al.*, 2013), allergilist reaktsiooni vähendavat toimet (Delgado *et al.*, 2010), ja ta on ka potentsiaalne prebiootikum (pt 1.5) (Adamberg *et al.*, 2014; Porrás-Dominguez *et al.*, 2014; Adamberg *et al.*, 2015). Meie äsjalõppenud uurimisprojekti '*Functional Food Ingredients (FFI)*' raames saadi häid tulemusi ka *P. syringae* Lsc3 levaani kasutamisel osakeste katematerjalina. Näidati, et levaan stabiliseerib mineraalseid nanoosakesi – levaaniga katmisel püsivad osakesed paremini lahuses ega agregeeru omavahel. Sellistel levaaniga kaetud mineraalsetel nanoosakestel (uuriti näiteks koobaltit) võiks olla rakendust toidulisandina. (Bondarenko *et al.*, 2016). Näidati ka positiivset efekti Lsc3 valguga sünteesitud levaani melanoomivastases toimes hiiremudelil (S. Kuuse, T. Visnapuu avaldamata andmed).

### **Levaani tootmine**

Kuna huvi levaani ja levaanitüüpi FOS-ide rakenduste vastu on suur, siis on oluline otsida võimalusi nende kuluefektiivseks tootmiseks, ja seda ka suuremates mahtudes. Levaani saab toota nii bakterirakkudega kui ka puhastatud ensüümiga, erinevatele kandjatele immobiliseeritud

rakkudega/ensüümiga, perioodilistes, poolpidevates ja pidevates süsteemides, sealjuures on igal meetodil omad eelised ja puudused (Han, 1990; Chambert ja Petit-Glatron, 1993; Abdel-Fattah *et al.*, 2005; Visnapuu *et al.*, 2009; Silbir *et al.*, 2014; Srikanth *et al.*, 2015; Visnapuu *et al.*, 2015). Levaani saagis võib olla väga erinev, sõltudes tootmise viisist, konkreetsest levaansukraasist, aga ka reaktsioonitingimustest (pt 1.6). Levaani sadestamine toimub etanooliga, millele järgneb selle kuivatamine ja puhastamine, näiteks kas korduva sadestamise või dialüüsiga (Han ja Clarke, 1990; Bekers *et al.*, 2002; Adamberg *et al.*, 2014). Kuigi väikeses mahus on levaansukraasiga levaani tootmist põhjalikult uuritud, siis tööstuses on selle tootmine veel ebaefektiivne. Levaani tööstusliku tootmise üheks põhiprobleemiks on see, kuidas saavutada tööstuslikus mahus efektiivne ja odav polümeeri sadestamine, kuivatamine ja puhastamine. Praeguse seisuga saab näiteks *Erwinia herbicola* (*Pantoeae agglomerans*) levaani osta firmast Sigma-Aldrich hinnaga 296.5 eurot/g mis on väga kallid võrreldes näiteks daalia juurest puhastatud inuliiniga, mis maksab 5.5 eurot/g ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

#### **1.4 Fruktooligosahhariidid kui erinevate transfruktosüülvate ensüümide reaktsiooniproduktid. Fruktooligosahhariidide süntees ja puhastamine**

Levaansukraaside poolt sünteesitud kõige lühemad FOS-id on 6-kestoos, neokestoos ja inuliini-tüüpi 1-kestoos. 6-kestoosi pikendamisel sünteesitakse levaani-tüüpi FOS-e kuni polümerisatsiooniastmeni 10 (Bekers *et al.*, 2002). Meie töögrupis uuritav *P. syringae* levaansukraas Lsc3 sünteesib lisaks levaanile suures koguses FOS-e kuni polümerisatsiooniastmeni 8 (DP 8) (Adamberg *et al.*, 2014; Visnapuu *et al.*, 2015). Mõned levaansukraasid on spetsialiseerunud just lühikeste FOS-ide sünteesile. Näiteks *G. diazotrophicus*'e levaansukraas sünteesib põhiliselt 1-kestoosi (Tambara *et al.*, 1999). Kuna *G. diazotrophicus*'e levaansukraas sünteesib ka veidi levaani, siis seletatakse 6-kestoosi puudumist reaktsioonisegus selle levaaniks polümeriseerimisega (Tambara *et al.*, 1999). 6-kestoosi ja ka neokestoosi leidub näiteks *Z. mobilis*'e produktide hulgas (Vigants *et al.*, 2013). Neokestoosi sünteesivad sahharoosist ka mitmed seened (nt. *Penicillium citrinum*) ja pärmid (nt. *Xanthophyllomyces dendrorhous*) (Hayashi *et al.*, 2000; Kritzinger *et al.*, 2003; Linde *et al.*, 2009; Sheu *et al.*, 2013). *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Fusarium* jt. sünteesivad inuliini-tüüpi FOS-e, mille DP on 3-10 (Banguela ja Hernandez, 2006). Mitmed filamentsed seened (nt. *Thermoascus aurantiacus*) ja pärmid (nt. *Schwanniomyces occidentalis*) suudavad sünteesida sahharoosist 6-kestoosi (Katapodis ja Christakopoulos, 2004; Alvaro-Benito *et al.*, 2007; Gutierrez-Alonso *et al.*, 2009). Seentel toimub FOS-ide süntees invertaasidega ( $\beta$ -fruktofuranosidaasidega), mis lisaks sahharoosi hüdrolüüsile ka transfruktosüülvad.



FOS-ide tootmiseks on kaks võimalust: nende süntees transfruktosüülivate ensüümidega või fruktaani polümeeri hüdrolyüs (Dominguez *et al.*, 2014). Inuliini-tüüpi FOS-e toodetakse põhiliselt siguri inuliini töötlemisel endoinulinaasiga (Roberfroid, 2007). Siguri juurest ekstraheeritud inuliini kuivkaalust moodustab erineva ahelapikkusega (DP 3-60) inuliin ~60% (Milala *et al.*, 2009). Tööstuslikult toodetakse inuliini-tüüpi FOS-e ka sahharoosist seente (nt *Aspergillus* ja *Penicillium*) fruktosüüli transferaasidega. Sel juhul on produktideks peamiselt lühikesed FOS-id (Sangeetha *et al.*, 2005; Roberfroid, 2007; Dominguez *et al.*, 2014).  $\beta$ -2,6 sidemega FOS-ide tootmiseks on kasutatud nii levaani ensümaatilist kui ka keemilist hüdrolyüsi. Happelise hüdrolyüsi teel prooviti levaani-tüüpi FOS-e valmistada juba 1980-ndate lõpus, kuid suurem osa produktist hüdrolyüsus fruktoosiks (Kennedy *et al.*, 1989). Hiljem on suudetud sama meetodi optimeerimisega FOS-ide saagist veidi tõsta (Marx *et al.*, 2000). Hiljuti kirjeldati levaani-tüüpi FOS-ide tootmist sahharoosist, milles kasutati kahte ensüümi – *Bacillus amyloliquefaciens*’i levaansukraasi ja endoinulinaasi. Selle meetodiga suudeti toota  $\beta$ -2,6 sidemega FOS-e 67% saagisega, enamuse moodustasid FOS-id DP vahemikus 2-4 (Tian *et al.*, 2014). Veelgi kõrgema saagisega (97% substraadist) suudeti levaani-tüüpi FOS-e toota levaanist selle hüdrolyüsil *B. licheniformise* endolevanaasiga (Porrás-Dominguez *et al.*, 2014). Levaani-tüüpi FOS-ide tootmise levinuim viis näib olevat praeguse seisuga siiski nende süntees sahharoosist bakterite levaansukraasidega (Belghith *et al.*, 2012; Visnapuu *et al.*, 2015). Leidub palju artikleid, kus on näidatud bakteriaalsete levaansukraaside potentsiaali levaani-tüüpi FOS-ide efektiivseks sünteesiks reaktsioonitingimuste optimeerimisel.

FOS-id, mis on toodetud polümeeri hüdrolyüsil, erinevad sahharoosist sünteesitud FOS-idest: kui viimase puhul sisaldavad FOS-i ahelad ka glükoosijääki, siis levaani endohüdrolyüsil moodustuvad peamiselt ainult fruktoosijääkidest koosnevad FOS-id. Kui FOS-e sünteesitakse sahharoosist, siis moodustuvad kõrvalproduktidena glükoos ja fruktoos ning tavaliselt jääb osa sahharoosi ka kasutamata. Puhta FOS-i preparaadi saamiseks tuleb see kõrvalproduktidest puhastada (Carabin ja Flamm, 1999; Niness, 1999). Mono- ja disahhariidide eemaldamiseks FOS-ide lahusest on kasutatud erinevaid meetodeid: töötlust aktiivsöe ja/või tseoliidiga ning selektiivset fermentatsiooni pärmiaga. Pärimistötluseks on kasutatud näiteks *Saccharomyces cerevisiae*’t ja *Pichia heimii*’t (Pan ja Lee, 2005; Sheu *et al.*, 2013; Adamberg *et al.*, 2014; Jõgi *et al.*, 2015). Meie töögrupis on kasutatud *P. syringae* levaansukraasiga sünteesitud FOS-ide puhastamiseks invertaasnegatiivset *S. cerevisiae* pärmi, mis tarbib ära glükoosi ja fruktoosi, aga ei metaboliseeri sahharoosi ja FOS-e (Adamberg *et al.*, 2014; Jõgi *et al.*, 2015). Glükoosi eemaldamiseks produktide hulgast on kasutatud ka glükoosi oksüdaasi. Glükoosi oksüdaas konverteerib glükoosi glükoonhappeks, mis omakorda sadestatakse reaktsioonise gust välja kaltsiumisoolana (Sangeetha *et al.*, 2005).

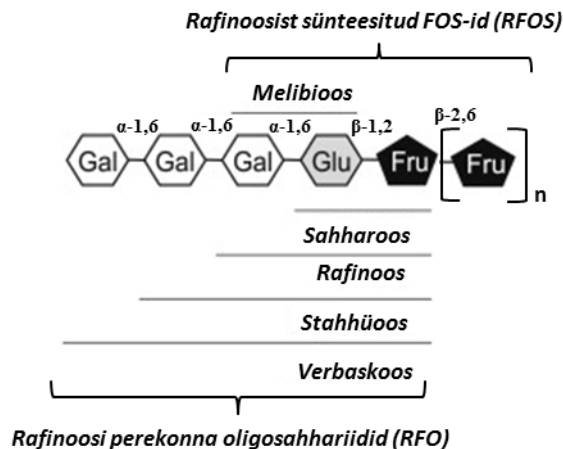
FOS-id pakuvad eelkõige huvi oma prebiootilise toime poolest (pt 1.5), aga neid saab kasutada ka madala kalorlusega magusainena, kuna lühikestele fruktaanidele on iseloomulik magus maitse (Vijn ja Smeekens, 1999). Näiteks inuliini osalisel hüdrolüüsil saadud lühikesi  $\beta$ -2,1 sidemega FOS-e kasutatakse suhkruasendajana

### **1.5 Levaan ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidid kui potentsiaalsed prebiootikumid**

Prebiootikum on defineeritud kui inimesele seedumatu ja soolemikroobide osalusel selektiivselt fermenteeritav toidukomponent, mis mõjutab soole mikrobiootat ja mõjub selle kaudu soodsalt peremeesorganismi tervisele (Roberfroid, 2007). Fruktaanid vastavad nendele kriteeriumitele: nad soodustavad jämesooles kasulike bakterite, näiteks laktobatsillide ja bifidobakterite paljunemist (Marx *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 2010; Roberfroid *et al.*, 2010). Kuna prebiootikumid peaksid lagunemata jõudma jämesoolde, siis peavad nad olema vastupidavad maohappele ja seedeensüümidele (Gibson *et al.*, 2004). Inimese seedeensüümid ei suuda fruktaanide  $\beta$ -sidemeid lagundada ja üldiselt on need polümeerid vastupidavad ka maohappele (Voragen, 1998; Cummings *et al.*, 2001). Selle vaatamata on näidatud fruktaanide mõningast hüdrolüüsi maohappega (Di Bartolomeo *et al.*, 2013). Yamamoto *et al.* (1999) näitasid, et kõrge molekulmassiga levaan lagundati maohappe toimel madalmolekulaarseks levaaniks ja autorid väitsid, et jämesoolde jõuab vaid madala molekulmassiga levaan.

Siiani on enim uuritud inuliini-tüüpi fruktaanide prebiootilist toimet, mistõttu on need ka laialdaselt kasutusel toidulisandina (Kolida ja Gibson, 2007). Kuigi levaani-tüüpi fruktaanide prebiootilist toimet on vähem uuritud, on näidatud, et  $\beta$ -2,6 sidemega fruktaanidel võib olla isegi suurem prebiootiline efekt kui inuliini-tüüpi fruktaanidel (Marx *et al.*, 2000). Porrás-Dominguez *et al.* (2014) näitasid hiljuti, et levaanist saadud FOS-idel kasvasid mitmed probiootilised bakterid, nii laktobatsillid kui ka bifidobakterid. Arvatakse, et laktobatsillid ja bifidobakterid saavad polümeerseid fruktaane kasutada enamasti teiste soolebakteritega abiga, kes need molekulid oligomeerideks lõhustavad (Biedrzycka ja Bieleca, 2004; Adamberg *et al.*, 2015; Visnapuu *et al.*, 2015). Soolebakteritest suudab edukalt levaani hüdrolüüsida ja kasutada näiteks jämesoole kommensaal *Bacteroides thetaiotaomicron*, kellel on nii endo- kui eksolevanaas (Sonnenburg *et al.*, 2010). Meie *FFI* projekti raames näidati, et Lsc3 valguga sünteetisid levaani selle bakteriga fermenteerimisel moodustusid põhiproduktidena propionaat, suksinaat ja atsetaat ning produktide muster sõltus aminohapete sisaldusest keskkonnas (Adamberg *et al.*, 2014). Leidub ka probiootilisi baktereid, kes suudavad ise levaani lagundada: näiteks *Lactobacillus paracasei*'l on rakuseinaga seotud levaani ja inuliini hüdrolüüsiv  $\beta$ -fruktofuranosidaas (Martel *et al.*, 2010).

Viimase aastakümne jooksul on suurenenud huvi ka rafinoosi perekonna oligosahhariidide vastu (*raffinose family oligosaccharides*; RFO) (Van den Ende, 2013), mille hulka kuuluvad levaansukraasi potsentsiaalsed substraadid rafinoos ja stahhüoos (pt 1.1).



**Joonis 4.** Rafinoosist sünteesitud FOS-id ja rafinoosi perekonna oligosahhariidid. Fru vastab fruktoosile, Glc glükoosile ja Gal galaktoosile. Märgitud on sidemetüüp suhkrujääkide vahel ja erineva koostise ja pikkusega suhkrute nimetused.

Suuremas koguses RFO-sid sisaldavad kaunviljalised (*Fabaceae*), nende hulgas eriti sojauba (Guillon ja Champ, 2002). Inimese seedeensüümid ei suuda RFO monomeeride vahel olevat  $\alpha$ -1,6 sidet lagundada (Gitzelmann ja Auricchio, 1965), mistõttu jõuavad need lagunemata kujul soolestikku ja on fermenteeritavad bakterite  $\alpha$ -galaktosidaasiga (Sakai *et al.*, 1987). Kuigi RFO-d on potsentsiaalsed prebiootikumid (Roberfroid, 2007), siis nende tõhususe kohta on erinevaid arvamusi ja vajalikud on edasised detailsemad uuringud (Gibson *et al.*, 2004).

Paljud levaansukraasid saavad rafinoosi ja stahhüoosi kasutada substraadina (pt 1.1). Kui sahharoosi lõhustamisel vabaneb kõrvalproduktina glükoos, siis rafinoosi lõhustamisel vabaneb melibioos ( $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp) (Joonis 4) (Yanase *et al.*, 2002; Andersone *et al.*, 2004). Fruktoosüüli aktseptorina võivad toimida rafinoos, melibioos ja reaktsioonis moodustunud FOS-id (Seibel *et al.*, 2006). Kui sahharoosist sünteesitud FOS-ide hulgast tuleb segavad (mitte-prebiootilised) komponendid (glükoos ja sahharoos) reaktsiooniproduktide hulgast eemaldada (pt 1.4), siis rafinoosist moodustunud melibioos ja jääkrafinoos võivad ise käituda prebiootikumina ja nende sisaldus reaktsiooniproduktide hulgas oleks pigem soodne. Samuti on rafinoosist sünteesitud FOS-id (*raffinose-derived oligosaccharide*, RFOS) ja levaan huvitavad fruktaanid, kuna lisaks  $\beta$ -2,6 sidemele fruktoosijääkide vahel on fruktaaniahela ühes otsas  $\alpha$ -1,6 sidemega galaktoos (Diez-Municio *et al.*, 2016). Seega võiks rafinoosist sünteesitud fruktaanid olla prebiootilisest aspektist eriti tõhusad.

## 1.6 Levaani ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidide sünteesi mõjutamine reaktsioonitingimustega

Lisaks levaansukraasi päritolule sõltub sünteesitud reaktsiooniproduktide hulk ja spekter oluliselt ka reaktsioonitingimustest, näiteks temperatuurist ja substraadi kontsentratsioonist (Hettwer *et al.*, 1995; Sangiliyandi *et al.*, 1999; Ben Ammar *et al.*, 2002; Van Hijum *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2009; Visnapuu *et al.*, 2011). Kuigi reaktsioonitingimused mõjutavad erinevaid levaansukraase erinevalt, on näidatud, et suurimat mõju avaldab produktide spektrile substraadi kontsentratsioon. Enamasti on madalatel sahharoosi kontsentratsioonidel eelistatud substraadi hüdrolüüs ja kõrgetel fruktaanide süntees (Chambert ja Petit-Glatron, 1991; Hernandez *et al.*, 1995). On näidatud, et mida kõrgem on sahharoosi kontsentratsioon, seda rohkem sünteesib *P. syringae* pv. tomato levaansukraas sahharoosist lisaks levaanile ka FOS-e (Visnapuu *et al.*, 2009). Ka *B. subtilis*'e ja *Z. mobilis*'e levaansukraasid sünteesivad enim FOS-e suurtel substraadi kontsentratsioonidel (Belghith *et al.*, 1996; Euzenat *et al.*, 1997). Ilmselt on kõrge sahharoosi molekulide kontsentratsiooni korral tõenäosus suurem, et aktseptorpiirkonda seondub mitte vesi, vaid sahharoos või lühike FOS ja produktideks on kestoos ja pikemad FOS-id. Kuigi temperatuuri mõju on varieeruv, siis mitmed autorid on näidanud, et madalamatel temperatuuridel on levaansukraaside protsessiivsus kõrgem ja soodustatud on pikkade polümeeride süntees (Vigants *et al.*, 2013; Santos-Moriano *et al.*, 2015). Näiteks *P. syringae* pv. phaseolicola levaansukraasil on 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). Aga näiteks *Bacillus* sp. TH4-2 levaansukraas polümeriseerib kõige efektiivsemalt kõrgel temperatuuril (50°C) (Ben Ammar *et al.*, 2002).

Levaanide molekulmasside erinevust on peamiselt seostatud levaansukraasi päritoluga (Van Hijum *et al.*, 2001; Ortiz-Soto *et al.*, 2008; Ozimek *et al.*, 2006). Porras-Dominguez *et al.* (2015) näitasid, et elongatsioonimehhanismi võib mõjutada ka ensüümi kontsentratsioon: kõrge ensüümi kontsentratsiooni juures sünteesis *B. subtilis*'e levaansukraas LMW levaani, seevastu madala ensüümi kontsentratsiooniga reaktsioonis moodustus HMW levaan ja fruktooligosahhariidid (DP < 20).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

*P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgul on biotehnoloogilist potentsiaali uudsete ja veel ebapiisavalt uuritud prebiootikumide ( $\beta$ -2,6 sidemega fruktaanide) sünteesiks. Magistritöö põhieesmärkideks oli uurida ja optimeerida levaani ja levaani-tüüpi FOS-ide sünteesi levaansukraasiga Lsc3 ja iseloomustada vastavaidprodukte.

Töös püstitati järgmised ülesanded:

1. Ekspresseerida *Escherichia coli*'s ja puhastada piisav kogus *P. syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3;
2. Optimeerida valgu ja substraadi (sahharoosi) kontsentratsiooni kuluefektiivseks produktide (levaani ja FOS-ide) sünteesiks levaansukraasiga;
3. Iseloomustada erinevatel reaktsioonitingimustel levaansukraasiga sünteesitud polümerisatsiooniproduktide kogust ja spektrit;
4. Iseloomustada Lsc3 valguga ning selle mutandiga Asp300Asn sünteesitud levaane molekulmassi alusel;
5. Töötada välja kiire ja suure läbilaskevõimega meetodika levaansukraaside reaktsioonikineetika mõõtmiseks;
6. Uurida glükoosi ja fruktoosi inhibitsiooni Lsc3 hüdrolüütilisele ja polümeriseerivale aktiivsusele;
7. Töötada välja meetod levaani sünteesiks rafinoosist levaansukraasiga Lsc3;
8. Uurida erinevat päritolu levaanide, inuliini ja FOS-ide happetaluvust ja vastupidavust autoklaavimisele.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid. Mutantide konstrueerimine, lsc3 geeni klonimine pURI3 vektorisse ja konstruktsioonide kontrollimine

Mutantsete ja metsiktüüpi levaansukraaside ekspressiooniks kasutati *E. coli* tüve BL21(DE3) [hsdS gal ( $\lambda$ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1)] (Studier ja Moffatt, 1986), mille genoomis on IPTG-ga indutseeritav T7 polümeraasi promootor. Metsiktüüpi *lsc3* geeni ekspresseeriti plasmiidilt pURI3-lsc3 (Visnapuu *et al.*, 2011), mutantseid levaansukraase plasmiididelt pURI3-lsc3H113A (Mardo *et al.*, 2014a), pURI3-lsc3H113Q (Mardo *et al.*, 2014a) ja pURI3-lsc3D300N (Visnapuu *et al.*, 2011). Kõikide konstruktsioonide puhul sünteesiti levaansukraas bakteris N-terminaalse His<sub>6</sub>-järjestusega, mida hiljem kasutati valgu puhastamiseks. *E. coli* transformante kasvatati ampitsilliini (0.15 mg/mL) sisaldavas LB tard- või vedelsöötmes temperatuuril 37°C. Aktiivse levaansukraasi

olemasolu transformantides kontrolliti kolooniate fenotüübi alusel sahharoosi sisaldaval söötmel nagu näidatud minu bakalaureusetöös (Aasamets, 2013) ja *lsc3* geeni olemasolu transformatides kontrolliti PCR-iga (meetod esitatud M. Gromkova magistris; Gromkova, 2015).

### 2.2.2 Levaansukraaside ekspresseerimine ja puhastamine

Valkude ekspressioon ja puhastamine tehti analoogiliselt nagu on näidatud Visnapuu *et al.* (2011) ja Mardo *et al.* (2014a). *Lsc3* metsiktüüpi ja muteeritud valkude puhastamiseks kasvatati *E. coli* transformante LB + Amp vedelsöötmes temperatuuril 37°C ja ekspressioon indutseeriti IPTG-ga. Rakud sadestati söötmest tsentrifuugimisega, pesti fosfaatpuhvriga (pH 6.0), suspendeeriti sonikeerimispuhvris (pH 6.0) ja purustati sonikeerimise teel. Purustatud rakkude suspensioon tsentrifuugiti (2400 g, 20 min, 4°C) ja filtreeriti läbi 0.45 µm poorisuurusega filtri. Eraldatud rakulüsaati kasutati valgu puhastamiseks. Nende meetodite täpsed kirjeldused on esitatud minu bakalaureusetöös (Aasamets, 2013).

*Lsc3* valkude puhastamiseks rakulüsaatidest kasutati vedelikkromatograafia süsteemi ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi) ja tootjapoolset metoodikat (programm: *Affinity purification any His-Trap*). Valgud puhastati 1 mL Ni<sup>2+</sup>-afiinsuskromatograafia kolonnidega (HisTrap™ FF, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi) ja puhas valk elueeriti kolonnist imidasooli sisaldava puhvriga. Fraktsioonid koguti ning analüüsiti SDS-PAGE-il, et hinnata *Lsc3* valkude ekspressioonitaset *E. coli*'s ja kontrollida levaansukraasi olemasolu puhastatud valku sisaldavates fraktsioonides. SDS-geeli tulemuste alusel valiti välja *Lsc3* valku sisaldavad fraktsioonid ja need liideti. Et asendada imidasooli sisaldav puhver, dialüüsiti proove McIlvaine'i puhvris (0.04 M sidrunhape, 0.13 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% Na-asiid; pH 6.0) temperatuuril 4°C, kasutades 12-14 kDa poorisuurusega ServaPor® dialüüsimeembraani (SERVA Electrophoresis GmbH, Saksamaa). Puhvrit vahetati ~24 h jooksul kaks korda. Seejärel valgulahus kontsentreeriti Amicon Ultra (*Mw cutoff* 10 kDa, Millipore, Iirimaa) tsentrifuugifiltritega (2400 g; 20 min; 4°C). Saadud preparaate kasutati puhta valguna magistris. Meetodite detailsemad kirjeldused ja täpsustavad viited on esitatud artiklis Visnapuu *et al.* (2011) ja minu bakalaureusetöös (Aasamets, 2013).

### 2.2.3 Valgu kontsentratsiooni määramine

Puhastatud valkude kontsentratsioonid (mg/mL) määrati spektrofotomeetriliselt (OD280nm) ekstinktsioonikoefitsendi (ε) järgi mikroplaadil (NanoQuantPlate; Tecan Group Ltd., Šveits), kasutades Tecan infinite M200 PRO™ (Tecan Group Ltd., Šveits) mikroplaadilugejat. Sama mikroplaadilugejat on kasutatud kõikides metoodikates mikroplaadiga. Kontsentratsioonide arvutamisel kasutati valemit  $C=A/\epsilon L$ , kus C on kontsentratsioon (mg/mL), A on optilise tiheduse

väärtus,  $\epsilon$  on ekstinktsioonikoefitsient ( $\epsilon=1.665 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ja L on lahuse kihi paksus (0.05 cm). Ekstinktsioonikoefitsendi väärtus arvatati valgujärjestuse alusel ExPasy serveris (www.expasy.org).

## **2.2.4 Levaansukraasi sahharoosi lõhustava aktiivsuse ja kineetiliste parameetrite määramine**

### Koguaktiivsuse määramine glükoosi eraldumise järgi GL (Glucose Liquicolor'i) meetodil

Levaansukraasi sahharoosi lõhustavat aktiivsust ehk koguaktiivsust mõõdeti glükoosi eraldumise algkiiruse järgi sahharoosist temperatuuril 37°C. Selleks kasutati Glucose Liquicolor'i reaktiivi (Human GmbH, Saksamaa) ja meie poolt eelnevalt väljatöötatud metoodikat (Visnapuu *et al.*, 2008) (pt 1.2).

Levaansukraaside afiinsus sahharoosile ( $K_m$ ; mM) ja maksimaalne reaktsioonikiirus ( $V_{max}$ ; U/mg) arvatati algkiiruste kaudu Michaelis-Menten'i võrrandi alusel (pt 1.2), kasutades programmi SigmaPlot 2001 (Systat Software Inc., USA) ensüümikineetika lisamoodulit (Enzyme Kinetics Module 1.1).

Fruktoosi inhibitsiooni uurimiseks mõõdeti glükoosi eraldumist 10-270 mM sahharoosist McIlvaine'i puhvris (pH 6.0) kui reaktsioonisegule oli lisatud inhibiitorina 100 mM või 300 mM fruktoosi. Inhibitsioonikonstant  $K_i$  (mM) arvatati glükoosi eraldumise algkiiruste järgi Michaelis-Menten'i võrrandi alusel (pt 1.2).

### Transfruktosüüliva aktiivsuse määramine

Transfruktosüüliv aktiivsus (TA%) ehk levaansukraasi polümeriseeriv võime (vt pt 1.2) määrati McIlvaine'i puhvris (pH 6.0) sahharoosi kahel kontsentratsioonil (300 mM ja 1200 mM), kasutades erinevaid Lsc3 kontsentratsioone (0.2-4.9 U/mL). Reaktsioonisegu maht oli 1 ml. Valku inkubeeriti temperatuuril 37°C erineva aja (1-24 h) jooksul ning reaktsioon peatati proovi kuumutamise temperatuuril 96°C 5 min. Suhkrute sisaldust analüüsiti kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga (HPLC) (pt 2.2.5). Glükoosi ja fruktoosi kontsentratsioonide vahe järgi proovides arvatati transfruktosüüliv aktiivsus nagu on kirjeldatud minu bakalaureusetöös (Aasamets, 2013).

## **2.2.5 Polümerisatsiooniproduktide analüüs**

### Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC)

Kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga (*high performance liquid chromatography*; HPLC) määrati glükoosi, fruktoosi, sahharoosi ja FOS-ide kogused eelpool nimetatud proovides (pt 2.2.4, Transfruktosüüliva aktiivsuse määramine).

Kasutati Acquity UPLC süsteemi (Waters, USA) koos Acquity ELS (*Evaporative Light-Scattering*) detektoriga. Standardsuhkrutena kasutati sahharoosi (Serva, Saksamaa), D-glükoosi, D-fruktoosi (Sigma-Aldrich, Saksamaa), rafinoosi (Naxo, Eesti), 1-kestoosi ja nüstoosi (Sigma-Aldrich,

Saksamaa). Metoodikat on põhjalikumalt kirjeldanud Mardo *et al.* (2014b). Vedelikkromatograafia ja esialgse andmeanalüüsi viis läbi meie töögrupi koostööpartner Heiki Vija (KBFI, Tallinn).

### Õhukese kihi kromatograafia (TLC)

Õhukese kihi kromatograafia (*thin layer chromatography*; TLC) jaoks kasutati silikageelplaate (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Saksamaa või TLC ALUGRAM® Xtra SILGUR/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel, Saksamaa). Plaadi kontsentreeriva osa stardijoonele kanti 0.5 µL või 1 µL lahjendamata või 4 korda mQ veega lahjendatud proovi ning seejärel plaat kuivatati. Suhkrumarkeritena kasutati 0.7% Lsc3-ga sünteesitud levaani, 8 mM 1-kestoosi ja nüstoosi ning 30 mM D-fruktoosi ja sahharoosi. TLC plaati voolutati segus kloroform:äädikhape:vesi (60:70:10) (Stiengele *et al.*, 1999). kaks korda plaadi ülemise servani, voolutuste vahel plaat kuivatati. Ilmutamiseks kasutati lahust, mis sisaldas 3% ureat ja 1 M fosforhapet veega küllastatud butanoolis. Plaati kuumutati ~10 min 120°C kuni suhkrulaikude värvumiseni (St. John *et al.*, 1996).

### Geelkromatograafia (GPC)

Levaani hulka ja molekulmassi määrati geelkromatograafiaga (*gel permeation chromatography*; GPC) nagu Porras-Dominguez *et al.* (2015). Selleks kasutati UltiMate 3000 RapidSeparation vedelikkromatograafia süsteemi (Dionex, Thermo Scientific, USA) koos HPLC seadmega ja Ultrahydrogel kolonne (UG Linear ja 500) (osakeste suurus 10 µm) (Waters, USA). Kromatograafia etapid viidi läbi temperatuuril 30°C ja vooluti (NaNO<sub>3</sub>, 0.1 M) voolukiirus oli 0.8 mL/min. Analüüsitava proovi kogus ühes tsüklis oli 10 µl. Madala molekulmassiga levaani detekteerimiseks kasutati standardsuhkrutena 5.2, 11.6, 23.8 ja 48.6 kDa suurusi dekstraane ja kõrge molekulmassiga levaani detekteerimiseks 5000 kDa suurust dekstraani (Waters, USA). Levaanide suurus uuritavates proovides määrati standardsuhkrute väljumisaegade alusel.

Levaani hulk ja molekulmass määrati järgnevates proovides:

1. 300 mM, 1200 mM ja 1754 mM sahharoosist 0.4 U/ml Lsc3 ensüümiga temperatuuril 37°C 24 h jooksul sünteesitud levaan. Reaktsiooniproovidest tehti lahjendused (1:1) destilleeritud vette.
2. Lsc3 metsiküve ja mutandi Asp300Asn 300 mM ja 1200 mM sahharoosist 20 h jooksul sünteesitud levaanid. Levaanid sünteesis ja sadestas T. Visnapuu. Puhtast ja kuivatatud levaanist tehti 1% levaanilahused destilleeritud vette.

### **2.2.6 Levaani sünteesi kineetika mõõtmine mikroplaadil**

Levaani sünteesi kineetika uurimiseks ja kineetiliste parameetrite ( $K_m$  ja  $V_{max}$ ) arvutamiseks registreeriti reaktsioonisegude optilise tiheduse tõusu (levaani teket) mikroplaadi kannukestes



lainepikkusel 400 nm nagu pt 1.2 ja minu bakalaureusetöös (Aasamets, 2013). Sünteesitud levaani kogus arvutati levaani kaliiberkõvera alusel.

Ensüümi kontsentratsiooni mõju uurimiseks levaani sünteesile inkubeeriti erinevas koguses Lsc3 ensüümi (0.5-4.9 U/mL) mikroplaadi kannukestes (200 µL) McIlvaine'i puhvris (pH 6.0), mis sisaldas 300 mM sahharoosi. Inkubatsioon toimus temperatuuril 37°C ja hägu teket mõõdeti mikroplaadilugejaga (Tecan Group Ltd., Šveits) iga 15 min tagant 20 tunni jooksul. Seejärel arvutati erinevateks ajapunktideks (1 h, 3 h, 6 h ja 20 h) sünteesitud levaani kogus.

Glükoosi ja fruktoosi inhibitsiooni uurimiseks levaani sünteesile mõõdeti hägu teket sahharoosist McIlvaine'i puhvris (pH 6.0) sahharoosi kontsentratsioonidel 5-150 mM. Lsc3 valku lisati 1.6 U/mL. Glükoosi inhibitsiooni määramiseks lisati reaktsioonisegusse täiendavalt 50 mM ja 100 mM glükoosi ning fruktoosi inhibitsiooni määramiseks 100 mM ja 300 mM fruktoosi. Mikroplaati inkubeeriti temperatuuril 37°C ja hägu teket mõõdeti iga minuti tagant 1 tunni jooksul. Sünteesitud levaani kogus arvutati nagu on kirjeldatud eelpool ja levaani sünteesi algkiiruste kaudu arvutati Michaelis-Menten'i võrrandi alusel inhibitsioonikonstant ( $K_i$ ; mM) glükoosile ja fruktoosile levaani sünteesil sahharoosist (pt 1.2).

### **2.2.7 Levaansukraaside sahharoosi lõhustamise kineetika *online* mõõtmine TMB meetodil**

Glükoosi vabanemise kiirust levaansukraasi reageerimisel sahharoosiga registreeriti mikroplaadil (Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol; CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Saksamaa), mõõtes temperatuuril 37°C iga minuti tagant 1 h jooksul sinaka värvuse moodustumist TMB-st (3,3',5,5'-tetrametüülbensidiin). Reaktsioonisegusse lisatud glükoosi oksüdaas oksüdeerib glükoosi hapnikuga glükoonhappeks ja vesinikperoksiidiks. Peroksidaas oksüdeerib TMB vesinikperoksiidist pärineva hapnikuga sinaka värvusega produktiks, mille moodustumist mõõdeti mikroplaadilugejal lainepikkusel 650 nm.

Reaktsioonisegu (lõppmaht 200 µL) koostis oli järgmine: McIlvaine'i puhver (pH 6.0); 5-500 mM sahharoos; 1 U/mL *Aspergillus niger*'i glükoosi oksüdaasi (Sigma-Aldrich, Saksamaa); 1 U/mL rõika peroksidaasi (Reanal, Ungari); 0.02 mg/mL (0.08 mM) TMB-d (Roche Diagnostics GmbH, Saksamaa). Levaansukraasi valku lisati järgmiselt: Lsc3 WT – 0.125 µg/mL; His113Ala – 0.5 µg/mL; His113Gln – 1 µg/mL.

Reaktsioonis moodustunud glükoosi kontsentratsioon lahuses arvutati TMB ekstinktsioonikoefitsendi ( $\epsilon$ ) alusel, kasutades valemit  $C=A/\epsilon$ , milles C on glükoosi kontsentratsioon (mg/mL), A on lahuse optiline tihedus lainepikkusel 650 nm ja  $\epsilon$  on ekstinktsioonikoefitsient ( $\epsilon=0.35 \text{ 1/M}\times 0.5 \text{ cm}$ ).

Ekstinktsioonikoefitsendi määramiseks inkubeeriti mikroplaadi kannukeses (maht 200  $\mu\text{L}$ ; vedelikukihi paksus 0.5 cm) erinevates kontsentratsioonides (0.025, 0.05, 0.1, 0.2 ja 0.35 mM) TMB-d koos vesinikperoksiidi (Apotheka apteek, toodetud Poolas) (3 mM) ja röika peroksidaasiga (5 U/mL) ning moodustunud sinaka produkti kogust mõõdeti mikroplaadilugejaga neeldumise järgi lainepikkusel 650 nm. Glükoosi vabanemise algkiiruste järgi arvutati levaansukraaside afiinsus sahharoosile ( $K_m$ ; mM) ja sahharoosi lõhustamise maksimaalkiirus ( $V_{max}$ ; U/mg) (pt 2.2.4).

Et uurida fruktoosi inhibeerivat toimet sahharoosi lõhustamisele, registreeriti glükoosi eraldumist pidevalt 5-500 mM sahharoosist 1 h jooksul mikroplaadil nagu eelpool kirjeldatud, kuid reaktsioonisegule lisati täiendavalt fruktoosi (100 mM või 300 mM). Glükoosi tekke algkiiruste järgi arvutati Michaelis-Menten'i võrrandi alusel (pt 1.2) inhibitsioonikonstant  $K_i$  (mM).

### **2.2.8 Levaani tootmine rafinoosist**

Levaan valmistati rafinoosist sarnaselt levaani sünteesi metoodikale sahharoosist (Adamberg *et al.*, 2014; Bondarenko *et al.*, 2016). Levaani sünteesiks rafinoosist inkubeeriti Lsc3 valku (2.7 U/mL) 0.5 L 25 mM Na-fosfaatpuhvril (pH 6.0), millele oli lisatud 300 mM (151.3 g/L) rafinoosi. Reaktsioon viidi läbi loksutil (100 rpm) 20 h jooksul temperatuuril 30°C. Ensüüm inaktiveeriti reakstioonisegu kuumutamise keevas vees vesivannil 10 minuti jooksul. Reaktsioonisegust sadestati levaan kolmekordse mahu (3:1) jääkülma aluselise 96% etanooliga (lisati ~10 mL 4 M NaOH-d, pH ~11). Levaan jäeti ~24 h sadenema temperatuuril 4°C. Seejärel lisati 4 g NaCl ja jäeti edasi sadenema 6 päevaks. Siis dekanteeriti levaanisademelt FOS-ide lahus ja levaanisadet pesti kolm korda 70% külma etanooliga. Pestud levaanist tehti märgkaalu järgi (~30 g) 10% lahus steriilsesse MQ vette ja dialüüsiiti 12-14 kDa ServaPor® dialüüsimembraanis (SERVA Electrophoresis GmbH, Saksamaa) MQ vee vastu, mis sisaldas 0.02% asiidi, 24 h jooksul temperatuuril 4°C. Seejärel levaan lüofiliseeriti Heiki Vija poolt (KBFI, Tallinn).

### **2.2.9 Levaani, inuliini ja FOS-ide vastupidavuse uurimine happele ja autoklaavimisele**

Happetaluvuse uurimiseks inkubeeriti 1% levaani, 1% inuliini või 1.3% FOS-ide lahuseid 0.01 M (0.03%) soolhappes (pH 2) temperatuuril 37°C 24 h jooksul. Kindlatel ajapunktidel (1-7 h ja 24 h) võeti 50  $\mu\text{L}$  proovi, kuhu lisati 100  $\mu\text{L}$  0.01 M NaOH hüdrolüüsireaktsiooni peatamiseks. Samade preparaatide täielikuks hüdrolüüsiks inkubeeriti samas koguses proove 24 h jooksul 0.2 M soolhappes ja reakstioon peatati kahe mahu 0.2 M NaOH lisamisega.

Samade preparaatide vastupidavust autoklaavimisele uuriti 0.5 ja 1 atü-ga (atmosfääri ülerõhk) 1.5 h programmi jooksul. Lahuste maht oli 0.5 mL ja fruktaanide kontsentratsioon MQ vees 1% (levaani ja inuliini puhul) või 1.3% (FOS-ide puhul).

Vastupidavuskatsetes uuriti järgmisi fruktaane:

1. Timuti levaan, mis saadi kingitusena Prof A. Kasperowicz'ilt (Poola Teaduste Akadeemia, isoleeritud Zirolecki *et al.* (1992) järgi;
2. Levaansukraasiga Lsc3 300 mM rafinoosist sünteesitud levaan (käesolev töö);
3. *Halomonas smyrnensis*'e levaan, mis saadi kingitusena Prof E. Toksoy Öner'ilt (Istanbul, Türgi);
4. Daalia inuliin (Sigma-Aldrich, Saksamaa);
5. Levaansukraasiga Lsc3 1200 mM sahharoosist sünteesitud levaan (saadi T. Visnapuu'lt; Adamberg *et al.*, 2014; Bondarenko *et al.*, 2016);
6. *Zymomonas mobilis*'e levaan, mis saadi kingitusena A. Vigants'ilt (Läti Ülikool, Riia);
7. Levaansukraasiga Lsc3 1200 mM sahharoosist sünteesitud FOS-id (saadi T. Visnapuu'lt; Adamberg *et al.*, 2014);
8. Levaansukraasiga Lsc3 1200 mM sahharoosist sünteesitud levaanist endolevanaasi töötusega saadud FOS-id (saadud T. Visnapuu'lt, publitseerimata).

### 2.2.10 Redutseerivate suhkrute määramine

Selleks, et hinnata fruktaanide hüdrolyüsi määra happega (0.01 M HCl) töödeldud ja autoklaavitud (0.5 ja 1 atü) proovides (pt 2.2.9), mõõtsime neis redutseerivate suhkrute sisaldust 3,5-dinitrosalitsüülhappega (DNS) (Miller, 1959). Erinevatel ajapunktidel (1-7 h ja 24 h) võetud neutraliseeritud happehüdrolyüsi proovid (200 µL) ja 1.5 h autoklaavitud proovid lahjendati 2 korda mQ vees ja segati 400 µL DNS reaktiiviga. Proove kuumutati 5 min temperatuuril 100°C, jahutati jääl, proovile lisati 800 µL MQ vett ning mõõdeti neeldumist lainepikkusel 540 nm. Redutseerivate suhkrute kogus arvutati kindlate kontsentratsioonidega fruktoosi lahustega tehtud kaliibergraafiku alusel. Lisaks mõõdeti redutseerivate suhkrute sisaldus ka täielikult monomeerideks hüdrolyüsunud proovidest (0.2 M HCl; 24 h), mis võeti aluseks hüdrolyüsi määra (%) arvutamisel happetöötuse käigus.

### 2.3 Tulemused ja arutelu

Meie töögrupis on põhjalikult uuritud ja iseloomustatud *P. syringae* DC3000 pv. tomato levaansukraasi Lsc3 (Visnapuu *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2009; Visnapuu *et al.*, 2011; Alamäe *et al.*, 2012; Mardo *et al.*, 2014a; Mardo *et al.*, 2014b). Oleme näidanud, et Lsc3 on katalüütiliselt väga aktiivne ( $k_{cat} \sim 500$  1/s) ja sellega on võimalik sünteesida nii levaani kui ka FOS-e mahus, mis võimaldab nende fruktaanide kasulike toimete (nt prebiootilisuse) uuringuid (Adamberg *et al.*, 2014; 2015). Lsc3 ensüüm on biokatalüsaatorina väga stabiilne, säilitades maksimaalse aktiivsuse temperatuuril 37°C 223 päeva jooksul (Joonis 2). Lisaks põhisubstraat sahharoosile kasutab Lsc3 ka

rafinoosi (Visnapuu *et al.*, 2008) ja stahhüoosi (Visnapuu *et al.*, 2011; Visnapuu, 2012). Lsc3 ensüüm suudab transfruktosüülida ka nn mittetraditsioonilisi aktseptoreid, näiteks ksüloosi, ksülobioosi, sorbitooli, arabinoosi, sünteesides neist potentsiaalselt uute kasutusvõimalustega suhkruid (Visnapuu *et al.*, 2009; Visnapuu *et al.*, 2011). Võrreldes grampositiivsete bakterite levaansukraasidega on *P. syringae* DC3000 pv. tomato Lsc3 oluliselt väiksema molekulmassiga, mis on kasulik selle valgu efektiivseks heteroloogiliseks ekspresseerimiseks. 1 liitrist indutseeritud *E. coli* kultuurist oleme saanud ~30 mg puhast Lsc3 valku (Mardo *et al.*, 2014b).

Meie äsjalõppenud uurimisprojekti '*Functional Food Ingredients; FFI*' raames on uuritud Lsc3 ensüümiga sünteesitud levaani potentsiaali prebiootikumina ja on näidatud, et see on jämesoole kommensaalile *B. thetaiotaomicron*'ile heaks kääritamissubstraadiks (Adamberg *et al.*, 2014). Häid tulemusi saadi ka *P. syringae* Lsc3 levaani kasutamisel mineraalsete nanoosakeste katematerjalina (Bondarenko *et al.*, 2016) ja näidati ka levaani melanoomivastast toimet hiirtel (S. Kuuse ja T. Visnapuu avaldamata andmed).

Kuna Lsc3 sünteesitud levaani ja FOS-ide potentsiaal biotehnoloogias on suur, siis oleks neid vaja edasisteks uuringuteks suuremas koguses sünteesida ning põhjalikumalt iseloomustada. Käesoleva magistr töö eesmärk oli optimeerida *P. syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 reaktsioonitingimusi levaani ja FOS-ide kuluefektiivseks sünteesiks ning uurida levaansukraasi inhibitsiooni reaktsiooniproductide glükoosi ja fruktoosiga. Nendes katsetes kasutasin Lsc3 valku koguaktiivsusega ~377 või ~393 U/mg, mis mõõdeti 100 mM sahharoosist temperatuuril 37°C. Lisaks oli plaanis töötada välja *online* meetod levaansukraasi sahharoosi kasutamise kineetika mõõtmiseks. Kuna levaan ja FOS-id pakuvad suurt huvi prebiootikumidena, siis oli üheks eesmärgiks uurida ka nende vastupidavust happele ja autoklaavimisele. Töö detailsed eesmärgid on esitatud peatükis 2.1.

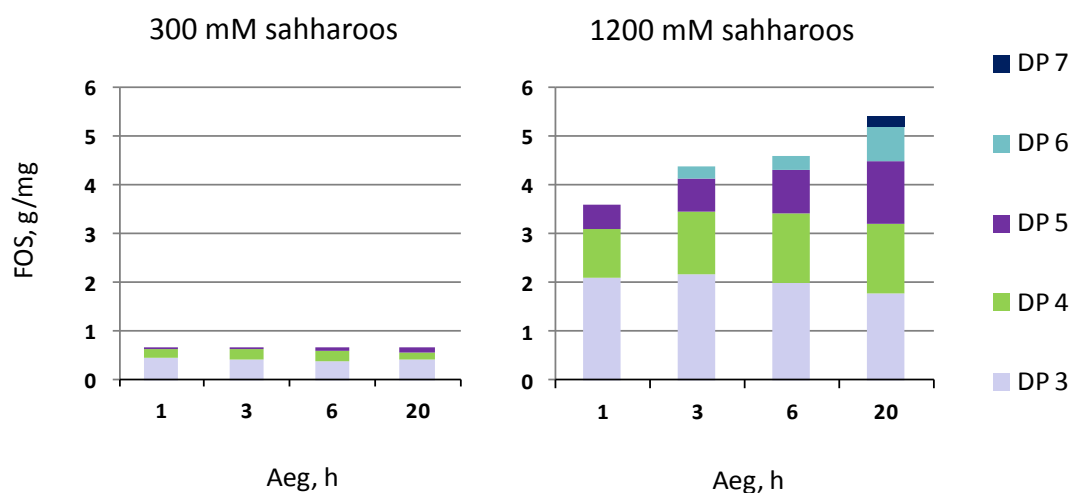
### **2.3.1 Levaani ja FOS-ide süntees Lsc3 valguga**

#### **2.3.1.1 Reaktsioonitingimuste optimeerimine kuluefektiivseks productide tootmiseks**

Selleks, et oleks võimalik levaansukraasi sünteesiproductide bioloogilisi toimeid uurida, tuleb nende tootmine optimeerida võimalikult kuluefektiivseks ning leida tingimused, kus toodetakse suurima saagisega soovitud producti. On teada, et levaansukraaside reaktsiooniproductide hulka ja spektrit saab mõjutada reaktsioonitingimuste varieerimisega (Hettwer *et al.*, 1995; Sangiliyandi *et al.*, 1999; Ben Ammar *et al.*, 2002; Van Hijum *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2009; 2011). Oleme varem näidanud, et sarnaselt teistele levaansukraasidele sõltub ka Lsc3 polümeriseerimisvõime ja productide spekter suurel määral substraadi kontsentratsioonist (Visnapuu *et al.*, 2009). Kõrgetel substraadi kontsentratsioonidel on valdav Lsc3 transfruktosüüliv aktiivsus, madalatel aga sahharoosi

hüdrolüütsiv aktiivsus. Kui sahharoosi on lahuses palju, näiteks 410.4 g/L (1200 mM), siis kasutatakse enam kui 70% sahharoosist pärinevatest fruktoosijääkidest transfruktosüülimiseks ja moodustuvad levaan ning FOS-id (Visnapuu *et al.*, 2011).

Antud töös soovisime täpsemalt uurida FOS-ide hulga ja nende spektri sõltuvust substraadi ja ensüümi kontsentratsioonist reaktsioonisegus. Joonisel 5 on toodud HPLC-ga määratud FOS-ide hulk ja spekter, mis sünteesiti Lsc3 valguga (lisati 4.1 U/mL ehk 10.9 µg/mL) 300 mM või 1200 mM sahharoosist. Reaktsioon peatati erinevatel aegadel (1 h, 3 h, 6 h ja 20 h; pt 2.2.5). Jooniselt on näha, et suure (1200 mM) sahharoosi kontsentratsiooni korral sünteesitakse oluliselt rohkem FOS-e ja nende DP on kõrgem. 300 mM sahharoosist moodustub FOS-e kuni DP-ni 5, kuid domineerivad lühikesed kahe fruktoosijäägiga FOS-id (DP 3). 1200 mM sahharoosist ja pikematel reaktsiooniaegadel (3 h, 6 h ja 20 h) moodustub FOS-e suuremas koguses ja kuni DP-ni 7 (Joonis 5).



**Joonis 5.** 300 mM (102.6 g/L) ja 1200 mM (410.4 g/L) sahharoosist 4.1 U/mL ensüümiga sünteesitud fruktooligosahhariidide kogus mg valgu kohta ja spekter erinevatel reaktsiooniaegadel (1, 3, 6 ja 20 h).

Tabelis 1 on esitatud Lsc3 valguga (3 U/mL) 1200 mM sahharoosist 20. reaktsioonitunniks sünteesitud fruktooligosahhariidide segu koostis. Tabelist on näha, et FOS-i segus domineerivad FOS-idest 1-kestoos, nüstoos ja fruktosüülnüstoos ja vähem on 6-kestoosi. FOS-e detekteeriti kuni DP-ni 7. Segu sisaldab ka reageerimata jäänud sahharoosi ning palju glükoosi. FOS-ide hulgas tuvastati ka disahhariidi blastoosi, aga mitte neokestoosi. Vähene 6-kestoosi hulk Lsc3 reaktsioonisegus võib olla seletatav selle edasise transfruktosüülimisega pikemateks fruktooligosahhariidideks ja polümeerseks levaaniks, sest 6-kestoos on levaani eellasmolekul (Ritsema ja Smeekens, 2003). *P. syringae* Lsc3 valguga sünteesitud FOS-ide spekter sarnaneb *G. diazotrophicus*'e, *Z. mobilis*'e ja *B. megaterium*'i levaansukraaside oligofruktaanide spektriga (Crittenden *et al.*, 1993; Tambara *et al.*, 1999; Homann *et al.*, 2007; Vigants *et al.*, 2013).

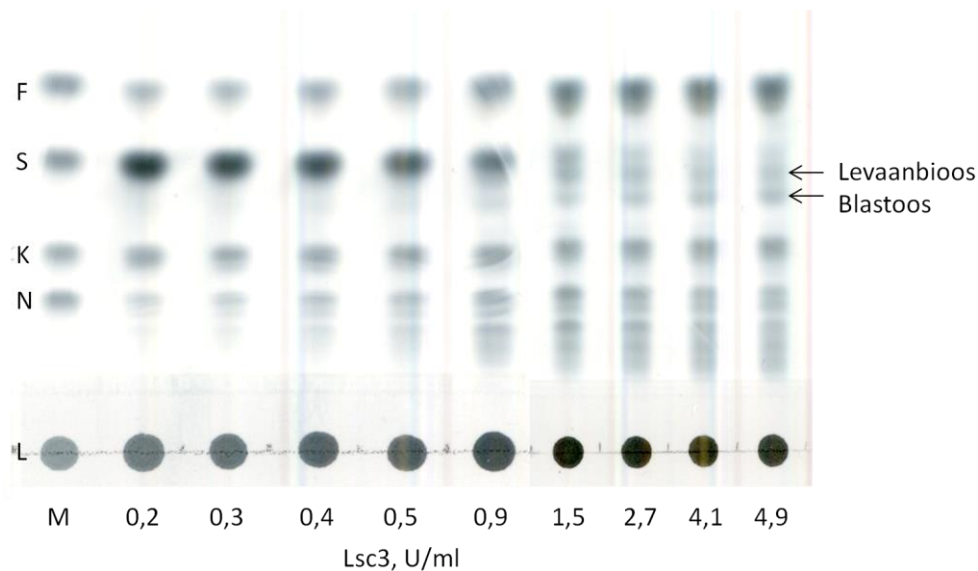
**Tabel 1.** Lsc3 ensüümiga 1200 mM sahharoosist sünteesitud fruktooligosahhariidid. Tabeli andmed pärinevad artiklist Adamberg *et al.*, 2014.

Suhkur	Kontsentratsioon, g/L	Suhkur	Kontsentratsioon, g/L
Fruktoos	75.4 ± 16.2	Nüstoos (DP 4)	28.4 ± 1.7
Glükoos	255.0 ± 19.9	Fruktosüülnüstoos (DP 5)	19.7 ± 1.0
Sahharoos (DP 2)	44.1 ± 5.9	DP 6	7.0 ± 0.5
Blastoos (DP 2)	9.8 ± 1.1	DP 7	3.6 ± 0.1
1-kestoos (DP 3)	37.0 ± 4.1	FOS-id kokku (DP 3–7)	100 ± 4.4
6-kestoos (DP 3)	9.2 ± 1.3		

Optimaalse ensüümi koguse leidmiseks FOS-ide sünteesiks mõõtsime nende teket 1200 mM sahharoosist erinevatel Lsc3 kontsentratsioonidel (0.2-4.9 U/mL ehk 0.5-13.0 µg/ml), reaktsiooniaeg oli 24 h ja temperatuur 37°C. Moodustunud produktide ja jääksubstraadi kogust analüüsiti HPLC-ga, tulemustest arvatati ka ensüümi transfruktosüüliv aktiivsus – TA% (pt 2.2.4 ja 2.2.5). Tulemused on esitatud Tabelis 2. Reaktsiooniprodukte analüüsisime ka TLC-l (pt 2.2.5), mis on esitatud Joonisel 6. Kui HPLC meetodiga ei saa levaani kvantiteerida, siis TLC analüüsil nägime ka levaani moodustumist (tume laik plaadi stardijoonel). TLC analüüs näitab, et alates Lsc3 kontsentratsioonist 0.9 U/mL ilmuvad reaktsiooniproduktide hulka ka 1-kestoosist lühemad suhkrud, mis võiks olla levaanbioos ja blastoos. Blastoosi teke sahharoosist levaansukraasi reaktsioonis on ka katseliselt tuvastatud (T. Visnapuu ja H. Vija andmed; Adamberg *et al.*, 2014; vt ka Tabel 1).

**Tabel 2.** Lsc3 transfruktosüüliv aktiivsus (TA, %), sünteesitud FOS-ide hulk ja spekter ning reageerimata jäänud sahharoosi kogus erinevatel ensüümi kontsentratsioonidel (0.2-4.9 U/mL ehk 0.5-13.0 µg/mL). Esitatud väärtused on 2 iseseisva mõõtmise keskmised.

Lsc3, U/mL	Lsc3, µg/mL	TA, %	FOS, g/mg	Jääksahharoos, %	FOS, DP
0.2	0.5	76.7 ± 0.4	39.4 ± 0.2	73.4 ± 0.2	3
0.3	0.8	77.1 ± 1.0	41.3 ± 2.4	69.5 ± 0.2	3-4
0.4	1.0	78.0 ± 0.3	41.1 ± 10.4	59.0 ± 0.2	3-4
0.5	1.3	77.1 ± 0.2	37.8 ± 2.4	48.4 ± 2.4	3-5
0.9	2.4	77.3 ± 1.6	25.2 ± 0.7	23.3 ± 4.3	3-6
1.5	4.0	76.0 ± 0.7	15.6 ± 0.2	8.1 ± 0.5	3-6
2.7	7.2	67.9 ± 0.2	9.4 ± 1.0	4.1 ± 0.4	3-6
4.1	10.9	63.0 ± 0.9	3.5 ± 0.7	2.9 ± 0.2	3-7
4.9	13.0	63.7 ± 0.4	3.5 ± 0.6	4.1 ± 0.4	3-7



**Joonis 6.** Erinevatel Lsc3 kontsentratsioonidel (0.2-4.9 U/mL) 24. reaktsioonitunniks moodustunud produktide analüüs õhukese kihi kromatograafiaga (TLC). 0.5  $\mu$ L 4 korda MQ vees lahjendatud reaktsioonisegu kanti TLC plaadi stradijonele. Esimesele rajale kanti markersuhkrud (M): levaan (L), nüstoos (N), 1-kestoos (K), sahharoos (S) ja fruktoos (F).

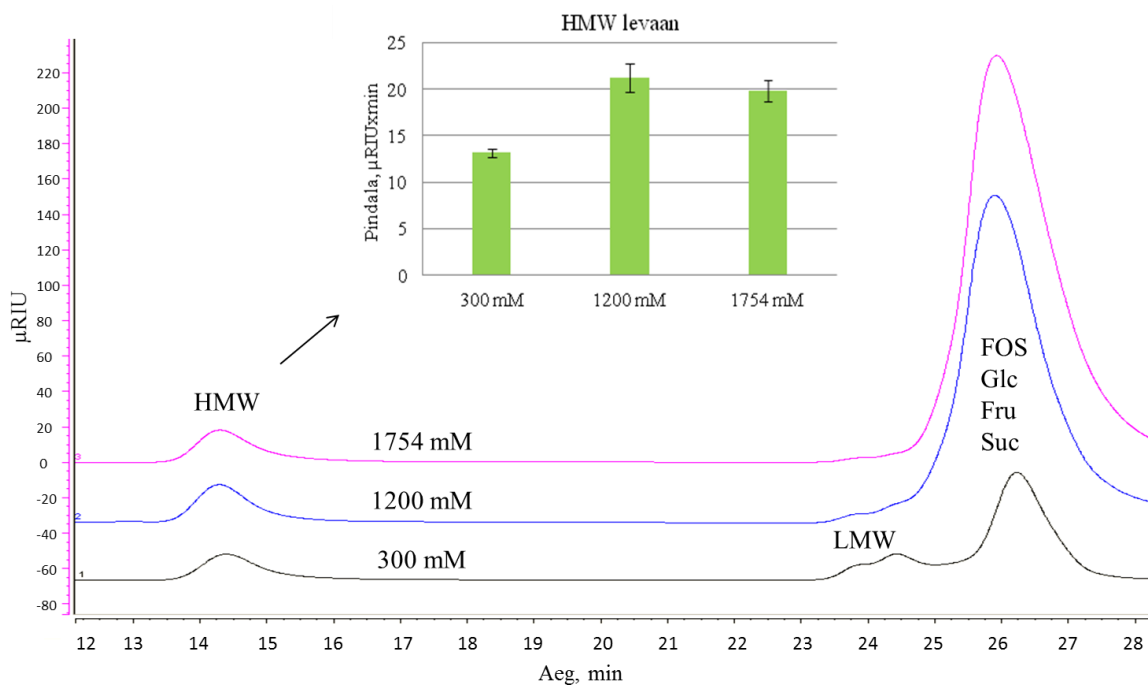
Tabelist 2 on näha, et mida vähem ensüümi reaktsioonisegus on, seda rohkem FOS-e 1 mg valgu kohta sünteesitakse. Kui 4.9 U/mL ensüümiga tekib 3.5 g FOS-e 1 mg ensüümi kohta, siis 0.5 U/mL ensüümiga moodustub 37.8 g FOS-e 1 mg ensüümi kohta. Kui ensüümi kogust veelgi vähendada, siis FOS-ide saagis 1 mg ensüümi kohta enam oluliselt ei muutu, küll aga alaneb sahharoosi kasutamise efektiivsus. Mida väiksem on ensüümi kogus reaktsioonisegus, seda suurem on jääksahharoosi kogus. Kõige väiksema katses kasutatud ensüümi kontsentratsiooni korral (0.2 U/mg) oli enam kui 70% sahharoosist 24 h möödudes reaktsioonisegus alles. Seevastu 4.1 U/mL ensüümi kontsentratsiooni korral oli jääksahharoosi protsent vaid 2.9 (Tabel 2). Substraadina reaktsioonisegusse lisatud sahharoosi kohta arvutades on sünteesitud FOS-ide saagis kõige suurem (~14 %) ensüümi kontsentratsioonivahemikus 0.9-1.5 U/mL. Sahharoosi kasutamise efektiivsust illustreerib ka TLC analüüs (Joonis 6). Ensüümi kontsentratsiooni vähendades, suureneb detekteeritud transfruktosüüliv aktiivsus, saavutades platoo ensüümi kontsentratsioonil umbes 1.5 U/mL. Kui 4.9 U/mL Lsc3 puhul on TA 63.7%, siis ensüümi kogust 10x vähendades (0.5 U/mL) tõuseb see 77%-ni (Tabel 2). Seega mida rohkem ensüümi lisame, seda suurem on sahharoosi hüdrolüüsiv aktiivsus. Kui ensüümi lisatakse suures koguses, siis saab kohe alata kiire sahharoosi lõhustamine, reaktsioonisegusse hakkab kogunema glükoos ja see võib inhibeerida transfruktosüülimisreaktsiooni (pt 1.1 ja 2.3.1.3; vt Joonis 11).

Reaktsioonisegude kromatograafiline analüüs näitas, et ensüümi kontsentratsioon reaktsioonisegus mõjutas ka FOS-ide spektrit. Madalate ensüümi kontsentratsioonidega reaktsioonisegudes tuvastasime

HPLC analüüsiga vaid lühikese ahelaga FOS-e (DP 3-4) ja ensüümi kontsentratsiooni kasvades suurenes pikema ahelaga (kuni DP 7) FOS-ide osakaal (Tabel 2).

Optimaalne ensüümi kogus FOS-ide sünteesiks peaks olema selline, mille korral sahharoosi kasutamine oleks piisavalt efektiivne ja sünteesitaks piisavalt FOS-e. Sellest tulenevalt võib antud katsete põhjal soovitada efektiivseks FOS-ide sünteesiks Lsc3 kontsentratsiooni vahemikus 0.9-1.5 U/mL (2.4-4.0 µg/mL).

Kui varem oleme levaani teket Lsc3 reaktsiooni käigus jälginud spektrofotomeetriliselt hägu tekke järgi (pt 2.2.6) ja moodustunud levaani kogust arvutanud puhastatud levaaniga tehtud kaliibri alusel, siis välisõpingute käigus Mehhiko Riikliku Autonoomse Ülikooli Biotehnoloogia Instituudis Prof Munguia uurimisgrupis avanes mul võimalus mõõta erinevatel substraadi kontsentratsioonidel sünteesitud kõrge ja madala molekulmassidega levaani kogust reaktsioonisegus geelkromatograafiaga (GPC) (pt 2.2.5). Mõõtsin 300 mM, 1200 mM ja 1754 mM (599.9 g/L) sahharoosist temperatuuril 37°C 24. reaktsioonitunniks 0.4 U/mL (1 µg/mL) Lsc3-ga sünteesitud levaani hulka. GPC analüüsiks tegin reaktsiooniproovidest lahjendused (1:1) destilleeritud vette (Joonis 7).



**Joonis 7.** Erinevatel sahharoosi kontsentratsioonidel (300 mM, 1200 mM ja 1754 mM) Lsc3 levaansukraasiga (0.4 U/mL) sünteesitud levaani molekulmasside kromatograafiline jaotus. HMW – kõrge molekulmassiga levaan; LMW – madala molekulmassiga levaan; Glc – glükoos; Fru – fruktoos; Suc – sahharoos.

Levaansukraasi produktide GPC analüüsil ilmnas, et 1200 mM sahharoosist sünteesib Lsc3 1.6 korda rohkem kõrge molekulmassiga ( $M_w \sim 4700$  kDa;  $DP \sim 2.9 \times 10^4$ ) levaani kui 300 mM sahharoosist. Kui sahharoosi kontsentratsiooni reaktsioonisegus suurendati 1754 mM-ni, siis sünteesitud HMW

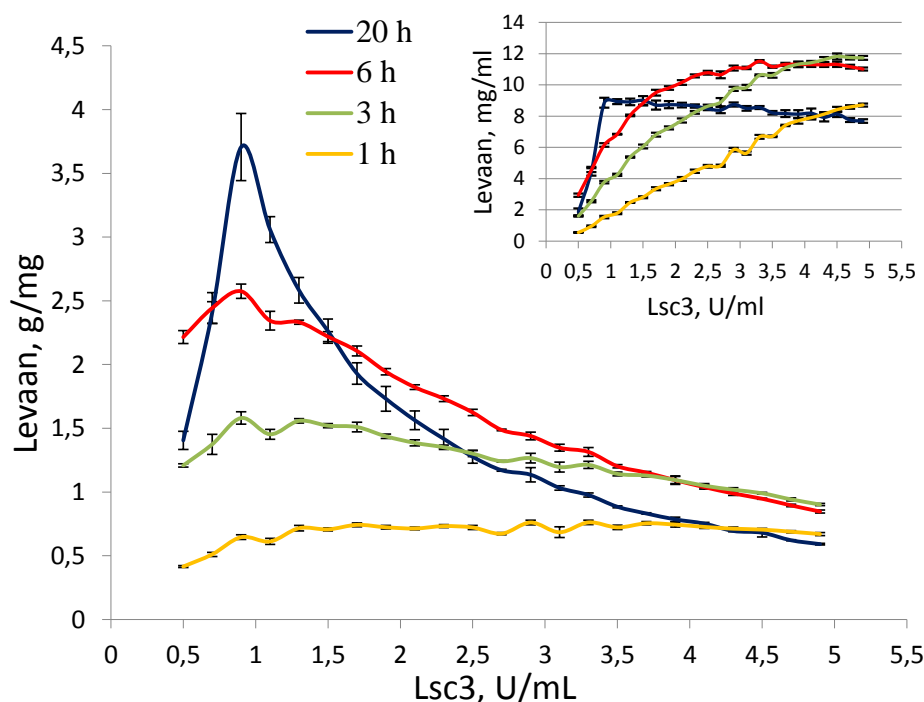


levaani hulk ei tõusnud kõrgemale kui 1200 mM sahharoosi puhul. GPC analüüs näitas ka, et 300 mM sahharoosist sünteesitakse ka madala molekulmassiga (LMW) ( $M_w \sim 11$  kDa; DP  $\sim 68$ ) levaani, mida 1200 mM sahharoosist moodustub väga vähe (Joonis 7). Seega, erinevalt Porras-Dominguez *et al.* (2015) uuritud *B. subtilis*'e levaansukraasist mõjutab substraadi (sahharoosi) kontsentratsioon Lsc3 valguga sünteesitava levaani molekulmassi. *B. subtilis*'e levaansukraasi elongatsioonimehhanismi mõjutab tugevasti hoopis ensüümi kontsentratsioon reaktsioonisegus (Porras-Dominguez *et al.*, 2015). Ensüümi kontsentratsiooni mõju sünteesitava levaani molekulmassile Lsc3 levaansukraasil veel uuritud ei ole. Lsc3 valguga sünteesitud ja etanooliga sadestatud, kuivatatud ja vees lahustatud levaani molekulmasside jaotust on analüüsitud peatükis 2.3.2.1 (Joonis 15 ja Tabel 3).

Kuna HMW ja LMW levaanidel võivad olla erinevad lahustuvusomadused, siis ei pruugi hägu mõõtmise näidata adekvaatselt levaani kogu hulka. Oleme varem näidanud, et reaktsioonisegu hägusus suureneb enim siis, kui Lsc3 reageerib suhteliselt väikese sahharoosi kogusega (300 mM) ning hägususe tõus on väiksem, kui substraadiks on 600 mM või 1200 mM sahharoos (Visnapuu *et al.*, 2009; Visnapuu, 2012; Aasamets *et al.*, 2014). Seda võib seletada mitmeti. Joonisel 7 on näha, et 300 mM sahharoosist toodetakse ka madala molekulmassiga levaani. On võimalik, et just see levaan moodustab hägusema lahuse. Veel oleme näidanud, et FOS-ide lisamisel levaani lahusele väheneb selle hägusus (K. Mardo, avaldamata andmed). Kuna kõrgel (1200 mM) sahharoosi kontsentratsioonil sünteesitakse palju FOS-e (Joonis 5), võib see vähendada levaanilahuse hägusust. Sellisel juhul võisime me eelnevates katsetes alahinnata levaani hulka, mida sünteesiti Lsc3 valguga sahharoosi kõrgematel kontsentratsioonidel.

Et määrata optimaalset ensüümi kogust levaani sünteesiks, mõõtsime levaani sünteesi 300 mM sahharoosist kasutades Lsc3 valku erinevates kogustes (0.5-4.9 U/mL) (pt 2.2.6). Valisime madala sahharoosi kontsentratsiooni sellepärast, et neis tingimustes sünteesitakse suhteliselt vähe FOS-e (Joonis 5) ning levaani ja FOS-ide vahekord on tugevalt levaani sünteesi kasuks. Joonisel 8 on näha, et optimaalne ensüümi kogus levaani sünteesiks sõltub suuresti reaktsiooniajast. Kui reaktsiooniaeg on 1 h, siis erinevatel Lsc3 kogustega sünteesitud levaani hulk 1 mg ensüümi kohta oluliselt ei erine. Reaktsiooniaja pikenedes (3, 6 ja 20 h) moodustus levaani 1 mg ensüümi kohta kõige enam siis, kui Lsc3 kontsentratsioon reaktsioonisegus oli 1 U/mL. Kui kasutada pikka reaktsiooniaega ja kõrget ensüümi kontsentratsiooni, siis langeb sünteesitud levaani hulk 1 mg ensüümi kohta märgatavalt. See näitab, et juba väga väike ensüümi kogus suudab piisavalt pika aja jooksul kasutada ära peaaegu kogu substraadi ja sünteesida maksimaalses koguses levaani. Siin on kindlasti oluline ka see, et Lsc3 valk on väga stabiilne (vt Joonis 2) ning aktiivsus ei ole mõjutatud reaktsiooniaja pikkusest. Kuna pika

reaktsioonaja ja kõrge ensüümi kontsentratsiooni korral on jääksahharoosi hulk väga väike, siis arvame, et Lsc3 võib hakata neis tingimustes parema substraadi puudumisel sünteesitud levaani eksoaktiivsusega hüdrolüüsima. Levaansukraaside eksolevanaasset aktiivsust on näidatud mitmete bakterite (*B. subtilis*, *Rahnella aquatilis*, *Z. mobilis*, *Lactobacillus reuteri*) levaansukraasidel (Mendez-Lorenzo *et al.*, 2015 ja sealsed viited) ja ka Lsc3 puhul (Visnapuu *et al.*, 2011). Oleme näidanud, et Lsc3 pikaajalisel inkubeerimisel levaaniga moodustub fruktoosi, kuid mitte FOS-e viidates selgelt eksoaktiivsusele (Visnapuu *et al.*, 2011). Lisaks võib levaani sünteesi vähenemist mõjutada glükoosi inhibeeriv toime polümeriseerimisele (Joonis 12), kuna just suurematel ensüümi kontsentratsioonidel moodustub oluliselt rohkem glükoosi (pt 2.3.1.3 ja Joonis 11).



**Joonis 8.** Levaani teke g/mg Lsc3 kohta (põhigraafik) ja mg/ml (sisegraafik) 1., 3., 6. ja 20. reaktsioonitunniks erinevatel Lsc3 kontsentratsioonidel (0.5-4.9 U/mL) 300 mM sahharoosist. Joonisel esitatud tulemused ja standardhälbed on arvatud 4 paralleeli põhjal.

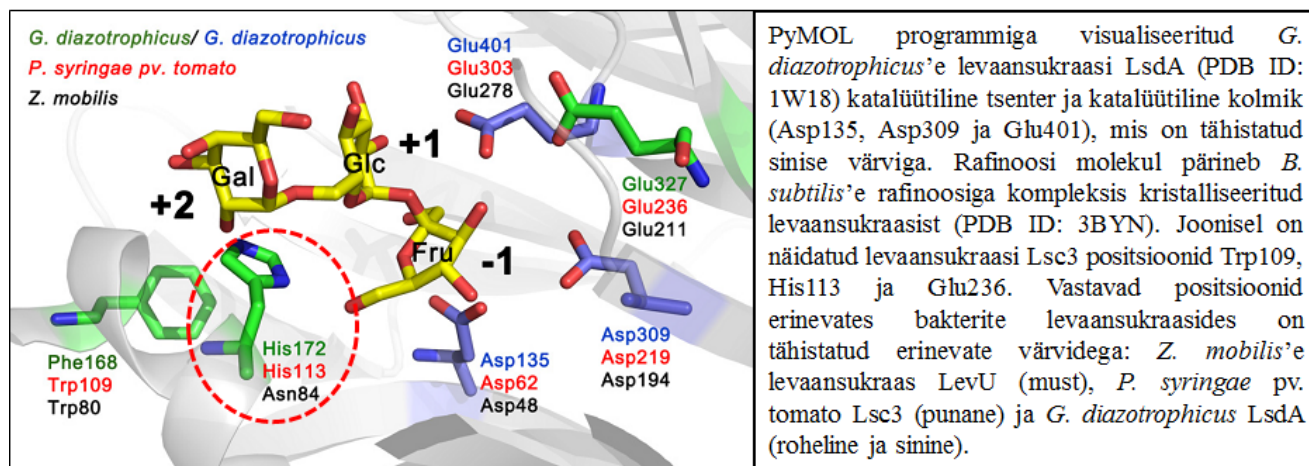
Kuna levaansukraasi süntees ja puhastamine on kallis, siis on oluline arvestada sünteesitud levaani kogust mg valgu kohta. Samas, kui eesmärk on lühikese aja jooksul võimalikult palju levaani sünteesida ja valku ei pea kokku hoidma, siis tuleks maksimaalse koguse levaani sünteesiks valgu kogust suurendada. Näiteks 1 h ja 3 h reaktsioonides kehtis positiivne korrelatsioon valgu koguse ja sünteesitava levaani hulga (mg/mL) vahel (Joonis 8, sisegraafik).

Selle töö tulemuste põhjal võib soovitada võimalikult väikese valgukuluga suure koguse HMW levaani ja FOS-ide sünteesiks kasutada 1200 mM sahharoosi, Lsc3 valku ~1 U/ml ja pikemat reaktsiooniaega (20-24 h).

### 2.3.1.2 Levaansukraasi sahharoosi hüdroliüüsiiva reaktsiooni *online* jälgimine mikroplaadil. Metoodika valideerimine metsiktüüpi ja mutantsete valkudega

Siiani oleme levaansukraasi aktiivsust ja kineetilisi parameetreid määranud meetodiga, mis põhineb sahharoosi hüdroliüüsil vabanenud glükoosi hulga mõõtmisel Glucose Liquicolor'i reaktiiviga (GL meetod, pt 2.2.4), kasutades tootjafirma protokollit ning glükoosi kaliiberkõverat (Visnapuu *et al.*, 2008). See meetod on suhteliselt ajamahukas ja nõuab suhteliselt suurtes kogustes ensüümi ja kemikaalide kasutamist (reaktsioon rutiinselt 0.5-1 mL mahus). Lsc3 ja selle mutantide uurimise lihtsustamiseks töötasime välja meetodika, milles registreeritakse mikroplaadil reaalajas glükoosi eraldumist sahharoosist, kasutades kromogeenina TMB-d ja abiensüümidenä *A. niger*'i glükoosi oksüdaasi ja rõika peroksidaasi (pt 2.2.7). Metoodika väljatöötamisel lähtuti artiklitest Liiv *et al.* (2001) ja Cao *et al.* (2012) ja meie töögrupi varasematest kogemustest. Reaktsioonis moodustuva glükoosi koguse arvutasime nagu näidatud pt 2.2.7.

TMB-l baseeruva metoodika valideerimiseks määrasime selle metoodiga Lsc3 metsiktüüpi valgule ja selle mutantidele His113Ala ja His113Gln kineetilised parameetrid ( $K_m$  ja  $V_{max}$ ) ning võrdlesime saadud tulemusi eelnevalt GL meetodil määratud väärtustega. Oleme varem näidanud, et His113 on Lsc3 valgu katalüüsis oluline. Mutantidel His113Ala ja His113Gln on afiinsus sahharoosile, maksimaalne sahharoosi lõhustamise kiirus ning FOS-ide ja levaani süntees võrreldes muteerimata valguga oluliselt langenud. Võrreldes sahharoosi lõhustamise kiirusega, on FOS-ide sünteesi langus oluliselt tugevam, mis tähendab, et see positsioon on eriti vajalik polümeriseerimisreaktsiooniks (Mardo *et al.*, 2014a).

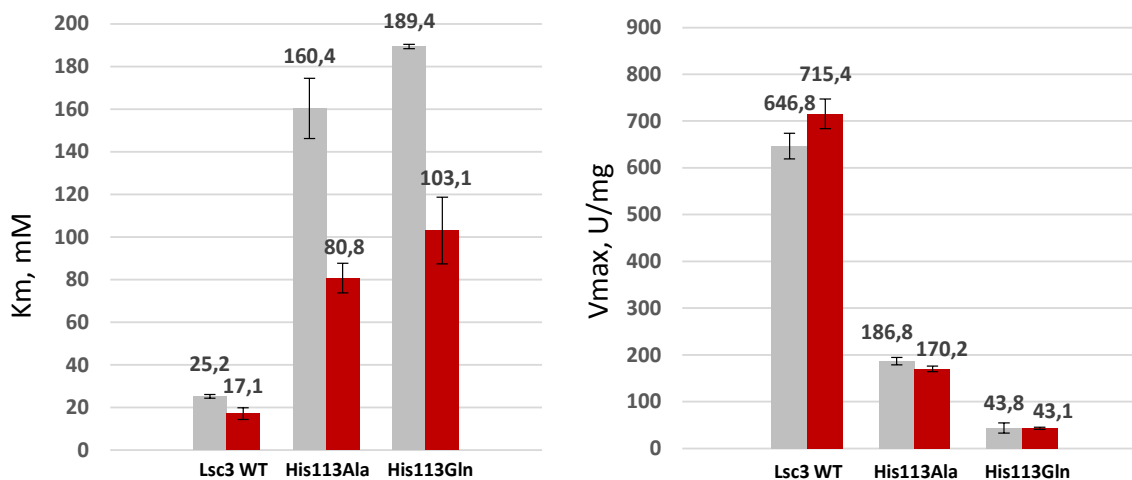


**Joonis 9.** His113 võimalik paiknemine Lsc3 valgus katalüütilise tseetri alapiirkondade suhtes. His113 on ümbritsetud punase katkendliku joonega. Joonis on pärit modifitseeritud kujul artiklist Mardo *et al.* (2014a).

Joonisel 9 on näidatud, et His113 võib paikenda Lsc3 valgus piirkonnas, mis võib mõjutada substraadide seostumist substraaditaskusse nii alapiirkonnas -1, kuhu seostub fruktosüüli doonori

fruktoosijääk kui ka alapiirkonnas +2, kuhu seostub fruktosüüli aktseptor ja rafinoosi puhul ka doonormolekuli galaktoosijääk (Joonis 9).

Kineetiliste parameetrite määramiseks inkubeerisime mikroplaadi kannukestes ensüümi 5-500 mM sahharoosiga McIlvaine'i puhvris kogumahuga 200  $\mu$ L. Glükoosi teket mõõtsime lainepikkusel 650 nm 1 tunni jooksul iga minuti tagant. Tulemuste analüüsil arvasime sahharoosi lõhustamise algkiirused, ensüümide afiinsused sahharoosile ( $K_m$ ; mM) ja maksimaalsed reaktsioonikiirused ( $V_{max}$ ; U/mg) (pt 2.2.7). Tulemused on esitatud Joonisel 10. Jooniselt on näha, et TMB meetodiga määratud  $K_m$  väärtused on kõikidel uuritud levaansukraasidel madalamad, kui eelnevalt GL meetodiga määrates. Vastavad väärtused vähenesid Lsc3 WT ensüümi korral 32% ja mutantidel 46-50%. Seega näitavad TMB meetodiga mõõdetud tulemused ensüümide suuremat afiinsust sahharoosile võrreldes GL meetodiga mõõdetud tulemutega. Kuna glükoos on tugev konkurentne inhibiitor Lsc3 ensüümile (vt. pt 2.3.1.3), siis võiks saadud tulemusi seletada sellega, et TMB meetodil ensüümi aktiivsust mõõtes eemaldatakse reaktsioonis moodustuva glükoosi põhjustatud inhibitsioon, mis parandab substraadi (sahharoosi) seondumist. Huvitav on see, et uuritud mutantidel on  $K_m$  väärtuse langus TMB meetodil mõõtes märgatavalt suurem võrreldes Lsc3 WT ensüümiga. Lsc3 His113 positsiooni mutantidel on afiinsus substraadile vähenenud, mida võiks põhjustada ka näiteks substraadide seondumise suurenenud inhibitsioon glükoosiga. See seletaks seda, et me nägime TMB meetodit kasutades mutantidel suuremat afiinsuse tõusu sahharoosile kui WT valgul. Maksimaalsed reaktsioonikiirused ( $V_{max}$ ) on kahe erineva meetodiga mõõtes suhteliselt sarnased (Joonis 10). Need tulemused sobivad hästi konkurentse inhibitsiooni teooriaga, mille puhul jääb  $V_{max}$  väärtus inhibiitori (meie näitel glükoosi) olemasolul ja puudumisel samaks.



**Joonis 10.** Lsc3 metsiküve (WT) ja selle mutantide His113Ala ja His113Gln afiinsus ( $K_m$ ) sahharoosile ja maksimaalne reaktsioonikiirus ( $V_{max}$ ), määratuna GL meetodil (hallid tulbad) ja TMB meetodil (punased tulbad). Joonisel esitatud tulemused ja standardhälbed on arvutatud 2 iseseisva korduskatse põhjal.

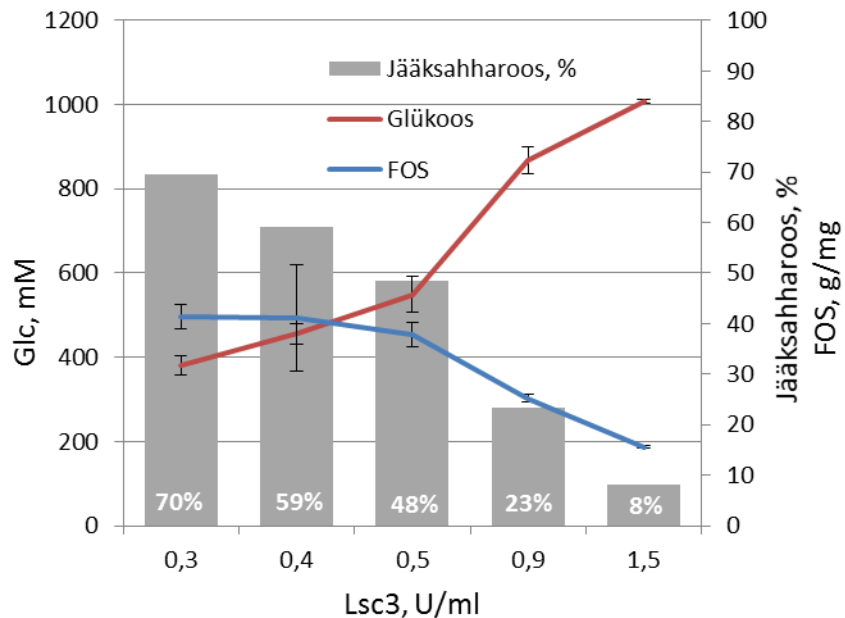
Kokkuvõtteks võib öelda, et levaansukraasi uurimise kontekstis uudse TMB meetodiga on võimalik lihtsalt ja kiiresti minimaalse valgu kuluga mõõta levaansukraasi ja selle mutantide aktiivsusi, määrata valgu kineetilisi parameetreid ning uurida ensüümi inhibeeritavust glükoosiga. Võrreldes GL meetodiga on vajaminev levaansukraasi kogus reaktsioonisegus umbes 40 korda väiksem Lsc3 WT puhul ja 4 korda väiksem mutantide His113Ala ja His113Gln puhul. Samuti on ajakulu oluliselt väiksem: kui GL meetodiga kulub kineetiliste parameetrite määramiseks ühele ensüümile enam kui 2 tundi, siis TMB meetodiga saab ühe mikroplaadi peal mõõta korraga ja automaatselt kuni viie ensüümi reaktsioonikiirusi vähem kui 1 tunniga, mis tähendab, et ühele ensüümile saame optimaalsetes tingimustes kineetilisi parameetreid määrata 10 korda kiiremini.

### **2.3.1.3 Glükoos ja fruktoos kui levaansukraasi inhibiitorid**

Levaansukraasi reaktsiooni käigus vabaneb reaktsioonikeskkonda kõrvalprodukt glükoos, mis inhibeerib levaansukraasi (Lyness ja Doelle, 1983; Hettwer *et al.*, 1995). Detailsemaid kineetika uuringuid ja inhibitsioonikonstanti glükoosile ei ole me siiski kirjandusest leidnud. Küll on aga näidatud, et FOS-ide sünteesil sahharoosist võib levaansukraasi inhibitsioon glükoosiga olla madala saagise põhjuseks (Dominguez *et al.*, 2014). Arvatakse, et glükoos võiks seostuda levaansukraasi aktiivtsentri +1 piirkonda, konkureerides seal substraadi seostumisega ja häirida sel moel reaktsiooni (Meng ja Fütterer, 2003; Lammens *et al.*, 2009; vt. ka Joonis 9). On pakutud, et maksimaalne FOS-ide saagis võib ulatuda kuni 60% algsest sahharoosi kontsentratsioonist, mida ei ole võimalik glükoosi inhibeeriva toime tõttu suurendada (Yun *et al.*, 1996; Sangeetha *et al.*, 2005). Enamasti on FOS-ide saagis veelgi madalam – näiteks *Z. mobilis*'e levaansukraasil on see kõigest 24-32% sahharoosist (Bekers *et al.*, 2002). Seega võiks glükoosi pidev eemaldamine reaktsiooni käigus olla kasulik ensüümi polümerisatsioonivõimele ja FOS-ide saagisele. Tõepoolest, on näidatud, et kui levaansukraasi reaktsioonisegusse lisada glükoosi oksüdaasi, mis oksüdeerib glükoosi glükoonhappeks, siis FOS-ide saagis võib ulatuda 90%ni algsest sahharoosi kontsentratsioonist (Sheu *et al.*, 2001; Lin ja Lee, 2008).

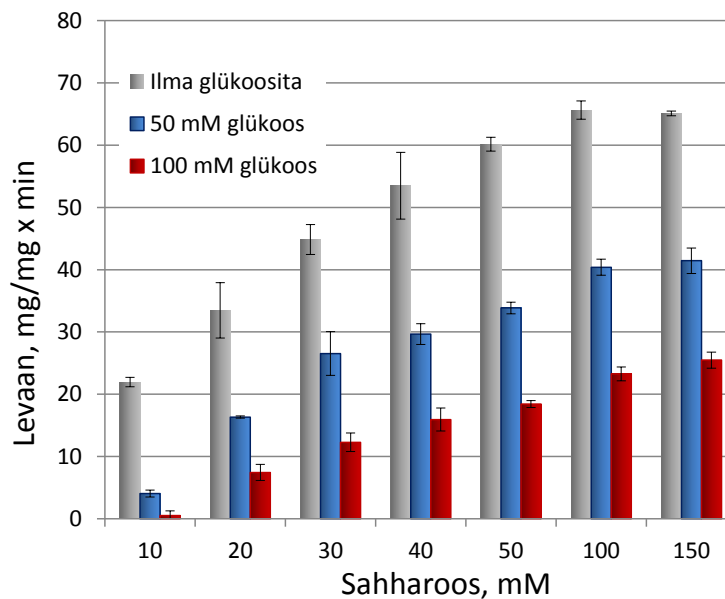
Jääksahharoosi hulka ja FOS-ide saagist arvesse võttes on optimaalne Lsc3 kontsentratsioon FOS-ide sünteesiks 0.5-1.5 U/mL (pt 2.3.1.1). Kui 0.5 U/mL ensüümi kontsentratsiooni korral kasutati ära ligi 50% sahharoosist, siis ensüümi kogust 1.5 U/mL-ni tõstes kasutati ära enam kui 90% (Tabel 2). Kuigi jääksahharoosi hulk vähenes oluliselt, siis vähenes sellega ka FOS-ide saagis 1 mg valgu kohta. Selle üheks põhjuseks võib olla glükoosi inhibeeriv toime, sest mida rohkem ensüümi reaktsioonisegus on, seda kiiremini ja rohkem glükoosi vabaneb (Joonis 11). Kirjanduses on näidatud, et juba 30 mM glükoos reaktsioonisegus hakkab inhibeerima ensüümi polümeriseerivat aktiivsust ning reaktsioon

aeglustub (Lyness ja Doelle, 1983; Hettwer *et al.*, 1995). Meie katses 0.5 U/mL ensüümi kontsentratsiooniga reaktsioonisegus vabaneb 24. tunniks 1200 mM sahharoosist enam kui 500 mM glükoos ja kui ensüümi kogust tõsta kuni 1.5 U/mL-ni, siis on moodustunud glükoosi kontsentratsioon kaks korda suurem (1000 mM).



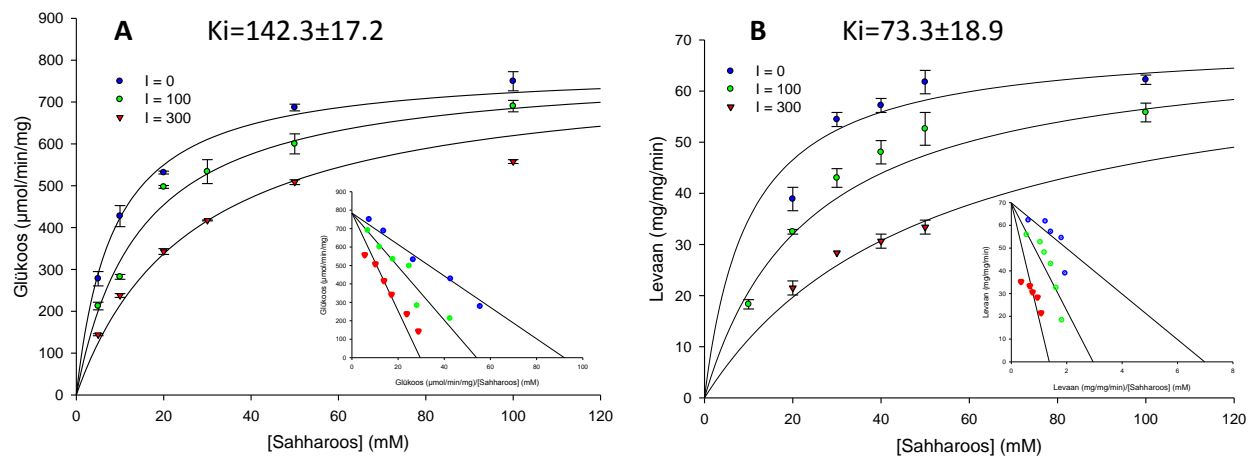
**Joonis 11.** Erinevatel Lsc3 kontsentratsioonidel (0.3-1.5 U/mL) 1200 mM sahharoosist 24. tunniks moodustunud FOS-ide ja glükoosi (Glc) hulk ning jääksahharoosi protsent reaktsioonisegus mõõdetuna HPLC-ga. Jääksahharoos on näidatud hallide tulpadena. Joonisel esitatud tulemused ja standardhälbed on arvatud 2 paralleeli põhjal.

Uurisime glükoosi inhibitsiooni mõju ka levaani sünteesile. Selleks jälgisime levaani tekket kineetikat mikroplaadil temperatuuril 37°C, varieerides sahharoosi kontsentratsioone (5-150 mM) ja lisades reaktsioonisegusse 50 mM ja 100 mM glükoosi (pt 2.2.6). Levaani sünteesi algkiirused 1 mg valgu kohta kahel erineval glükoosi kontsentratsioonil on toodud Joonisel 12. On näha, et glükoos inhibeerib levaani tekket tugevasti. Inhibitsioon on eriti tugev sahharoosi madalal (10 mM) kontsentratsioonil. Michaelis-Menten'i võrrandi alusel saime inhibitsioonikonstandiks ( $K_i$ ) glükoosile  $12.8 \pm 2.4$  mM ja glükoos toimus konkurentse inhibiitorina. Lsc3 valgu  $K_m$  sahharoosile levaani sünteesil on  $21.4 \pm 3.9$  mM. See tähendab seda, et glükoos inhibeerib levaani sünteesi väga tugevasti ja selle eemaldamine reaktsioonisegust reaktsiooni vältel võiks olla kasulik suurema levaani saagise saavutamisel.



**Joonis 12.** Levaani sünteesi algkiirused mg valgu kohta erinevatel sahharoosi kontsentratsioonidel (10-150 mM) ja kahel erineval glükoosi kontsentratsioonil (50 ja 100 mM). Hallid tulbad tähistavad reaktsiooni, kuhu glükoosi ei lisatud, sinised tähistavad 50 mM glükoosiga reaktsioone ja punased 100 mM glükoosiga reaktsioone. Joonisel esitatud tulemused ja standardhälbed on arvatud 2 korduskatse põhjal.

Levaansukraasi sahharoosi hüdrolüüsiva aktiivsuse tulemusena vabaneb sahharoosist lisaks glükoosile ka fruktoos. Vaba fruktoos võib seostuda substraaditasku -1 ja ka +1 piirkonda ja inhibeerida seeläbi substraadi lõhustamist ja transfruktosüülimisreaktsiooni (Meng ja Fütterer, 2003; Tonozuka *et al.*, 2012). 24. reaktsioonitunniks 1200 mM sahharoosist vabanenud fruktoosi sisaldus HPLC-ga mõõdetuna on ligikaudu 5 korda väiksem kui glükoosi sisaldus. Kui glükoosi inhibeerivat toimet uurisime levaani sünteesi kineetika alusel, siis inhibitsiooni fruktoosiga on võimalik mõõta ka sahharoosi lõhustumise kiiruse järgi. Registreerisime glükoosi eraldumist sahharoosist TMB ja GL meetodil temperatuuril 37°C, varieerides sahharoosi kontsentratsiooni vahemikus 5-100 mM ja lisades reaktsioonisegusse 100 mM ja 300 mM fruktoosi (pt 2.2.4 ja 2.2.7). Reaktsiooni algkiiruste järgi arvutasime Michaelis-Menten'i võrrandi alusel inhibitsioonikonstandi ( $K_i$ ) fruktoosile. Kuna TMB meetodi puhul oksüdeeritakse vabanenud glükoos glükoonhappeks, siis saame hinnata olukorda, mil glükoosi inhibeeriv toime levaansukraasile on elimineeritud. Oleme näidanud, et glükoonhape ise Lsc3 reaktsiooni ei inhibeerii (A. Aasamets, avaldamata andmed). Lisaks mõõtsime fruktoosi inhibitsiooni ka levaani tekke järgi nagu seda tegime glükoosi inhibitsiooni uurides (pt 2.2.6), et tulemusi võrrelda. Joonisel 13 on esitatud andmed kahe erineva meetodiga määratud fruktoosi inhibitsiooni kohta Michaelis-Menten'i ja Eadie-Hofstee graafikuna.



**Joonis 13.** Fruktoosi inhibitsiooni Michaelis-Menten'i (suurem) ja Eadie-Hofstee (väiksem) graafikud hinnatuna reaktsiooni algiirusi TMB meetodil (A) ja levaani tekke järgi (B) mõõtes. Sinisega on tähistatud inhibeerimata reaktsioon, rohelisega on tähistatud 100 mM fruktoosiga inhibeeritud reaktsioon ja punasega 300 mM fruktoosiga inhibeeritud reaktsioon. Joonisel esitatud tulemused ja standardhälbed on arvatud 2 korduse põhjal.

TMB meetodiga määrares saime fruktoosi inhibitsioonikonstandi ( $K_i$ ) sahharoosi hüdrolüüsile  $142.3 \pm 17.2$  mM, mis on umbes poole suurem, kui  $K_i$  levaani sünteesile ( $73.3 \pm 18.9$  mM) (Joonis 13). GL meetodiga määrares tuli vastav väärtus  $131.4 \pm 35.7$  mM, mis sarnaneb TMB meetodil määratud  $K_i$ -le. See võiks näidata, et fruktoos inhibeerib levaani sünteesi tugevamini, kui sahharoosi hüdrolüüsi. Sünteesitud levaani hinnanguline kogus mg valgu kohta vähenes 300 mM fruktoosi lisamisel keskmiselt 1.8 korda. Sama palju vähenes ka *Z. mobilis*'e rakkudega sünteesitud levaani kogus, kui kasvukeskkonda lisati 439 mM fruktoosi (Ananthalakshmy ja Gunasekaran, 1999). Võrreldes glükoosi inhibitsiooniga, on fruktoosi inhibeeriv toime levaani sünteesile umbes 6 korda nõrgem.

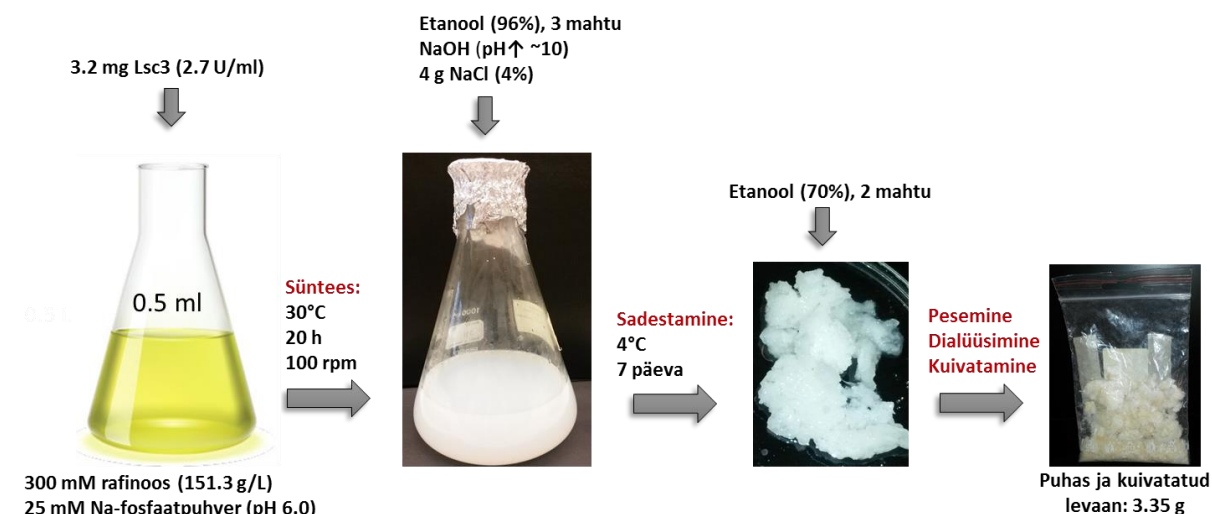
Kui substraadina kasutada sahharoosi asemel rafinoosi, siis glükoosi asemel vabaneb reaktsioonikeskkonda melibioos (pt 1.5 ja Joonis 4). Seega oleks huvitav uurida ka melibioosi inhibitsiooni Lsc3 reaktsioonile.

#### 2.3.1.4 Levaani süntees rafinoosist Lsc3 ensüümiga

*FFI* projekti tarbeks oleme suuremas mahus levaani tootnud sahharoosist, et uurida selle omadusi ja bioloogilisi toimeid (Adamberg *et al.*, 2014). Kuna levaansukraas Lsc3 kasutab substraadina ka rafinoosi ja sünteesib sellest nii levaani kui ka FOS-e (Visnapuu *et al.*, 2009; Visnapuu *et al.*, 2011), siis soovisime sünteesida levaani ka rafinoosist, et edaspidistes katsetes uurida selle omadusi ja sobivust endolevanaasi substraadina. Kuigi rafinoos ei ole Lsc3 valgule sama sobiv substraat kui sahharoos (Visnapuu *et al.*, 2011; Mardo *et al.*, 2014b; Visnapuu *et al.*, 2015), oleme näidanud, et Lsc3 sünteesib rafinoosist nii levaani kui ka FOS-e (Visnapuu *et al.*, 2009; pt 1.5). Rafinoosist



sünteesitud levaani ja selle omadusi ei ole seni uuritud. Selles töös uurisin lisaks ka rafinoosist sünteesitud levaani vastupidavust maohappele ja autoklaavimisele (pt 2.3.2.2).



**Joonis 14.** Levaani tootmise skeem rafinoosist Lsc3 valguga. 0.5 L reaktsioonisegust saadi 3.35 g puhastatud ja kuivatatud levaani.

Levaani tootmise skeem rafinoosist on esitatud Joonisel 14. Levaani sünteesiks kasutasime 3.2 mg Lsc3 valku (reaktsioonisegus 2.7 U/mL) ja 300 mM (151.3 g/L) rafinoosi. Kuna rafinoosil on halvem lahustuvus kui sahharoosil, siis ei olnud võimalik suuremat rafinoosi kontsentratsiooni kasutada. Levaani süntees toimus temperatuuril 30°C 20 h jooksul. Edasisel töötlemisel sadestasime reaktsioonisegust levaani, nagu oleme seda rutiinselt teinud sahharoosist levaani tootmisel (Adamberg *et al.*, 2014; Jõgi *et al.*, 2015). Selleks lisasime jääkülma etanooli (96%), leelistasime reaktsioonisegu väärtuseni pH ~10 ja hoidsime reaktsioonisegu temperatuuril 4°C. Kuna rafinoosist sünteesitud levaan sadenes kehvemini kui sahharoosist sünteesitud levaan, siis lisasime ka NaCl (4%), et sadenemist soodustada. Kui sahharoosist sünteesitud levaan sadeneb välja juba 24 tunniga, siis rafinoosist sünteesitud levaan sadenes alles 7-ndaks päevaks. Pärast levaani sadenemist, dekanteerisime sademelt FOS-ide fraktsiooni, pesime levaani 70%-lise etanooliga ja dialüüsisime MQ vees (pt 2.2.8). Seejärel levaan kuivatati nagu Adamberg *et al.* (2014). 500 mL reaktsioonisegust saime 3.35 g levaani ehk ~1 g levaani mg kasutatud valgu kohta. 1.2 M sahharoosist oleme eelnevalt saanud ~13 g levaani mg valgu kohta (Jõgi *et al.*, 2015).

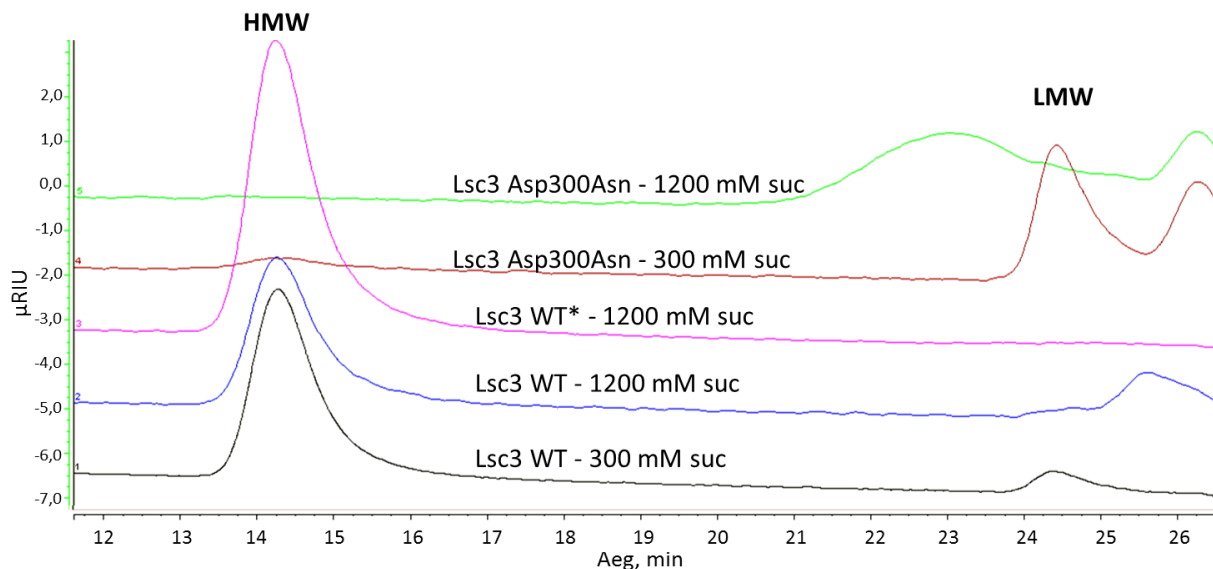
## 2.3.2 Lsc3 fruktaanide omadused

### 2.3.2.1 Lsc3 levaani molekulmass ja bimodaalne jaotus

Levaani ja FOS-ide kasulikud omadused on tihedalt seotud nende struktuuri ja suurusega. Näiteks pikematel ja hargnenud ahelaga fruktaanidel on eriti suur potsentsiaal jõuda soole distaalsesse ossa (Manning ja Gibson, 2004; Allsopp *et al.*, 2013; Di Bartolomeo *et al.*, 2013) ja seeläbi toimida

prebiootiliselt. Abdel-Fattah *et al.* (2012) näitasid, et *B. subtilis*'e levaani vabade radikaalide vastane toime oli seotud just selle kõrge molekulmassiga. Samas antibakteriaalset toimet avaldab aga *Z. mobilis* madala molekulmassiga levaan (Byun *et al.*, 2014).

Nagu peatükis 1.3 on kirjeldatud, võivad erinevate levaansukraaside sünteesitud levaanid olla väga erinevad oma molekulmassi ja hargnevuse astme poolest ja üks ja sama levaansukraas võib sünteesida ka mitut eri suurusega levaani fraktsiooni (Simms *et al.*, 1990; Van Hijum *et al.*, 2001; Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Kui Lsc3 valguga sünteesitud FOS-ide spektrit oleme saanud analüüsida HPLC meetodiga (pt 2.3.1.1), siis polümeerse levaani suurust ei olnud me siiani veel detailsemalt uurinud. Prof Munguia juhendamisel mõõtsin Lsc3 sünteesitud levaanide molekulmasse geelkromatograafiaga (GPC) (pt 2.2.5). Levaanid olid sünteesitud 300 mM ja 1200 mM sahharoosist 20 h jooksul 3 U/mL Lsc3 ensüümiga ning sadestatud ja puhastatud sarnaselt nagu artiklis Adamberg *et al.* (2014). GPC analüüsiks kasutasin puhtast ja kuivatatud levaanist destilleeritud vette tehtud 1% lahused. Lisaks mõõtsin ka Lsc3 mutandi Asp300Asn samadel tingimustel sünteesitud levaanide molekulmasse. Asp300Asn mutandil on afiinsus sahharoosile, TA% ja FOS-ide sünteesivõime langenud võrreldes algse valguga. Ka reaktsiooniproductide spekter on muutunud: see mutant sünteesib pika ahelaga FOS-e, mis muteerimata valgu productide hulgast puuduvad (Visnapuu *et al.*, 2011; Mardo *et al.*, 2014a; Mardo *et al.*, 2014b). Mutandi sünteesitud levaan on ka teistsugune – see on oluliselt kollakam kui Lsc3 valgu sünteesitu. Asp 300 paikneb levaansukraaside joonduse alusel konserveerunud piirkonnas, millesse kuulub ka üks katalüütilise kolmiku aminohapetest – Glu303 (Visnapuu *et al.*, 2011). Asp300Asn-le vastavat mutanti on kirjeldatud ka näiteks *Z. mobilis*'e levaansukraasil ja sarnaselt meie tulemustele on selle afiinsus sahharoosile langenud (Yanase *et al.*, 2002). Seega peaks Asp300 positsioon olema oluline nii substraadi kui ka aktseptori seostumises ja polümerisatsiooniproductide moodustumises. GPC kromatogrammil (Joonis 15) on näha uuritud levaanide erineva molekulmassiga fraktsioonid.



**Joonis 15.** Kahel erineval sahharoosi kontsentratsioonil (300 mM ja 1200 mM) Lsc3 algse valguga (Lsc3 WT) ja selle mutandiga (Lsc3 Asp300Asn) sünteesitud levaanide molekulmasside kromatograafiline jaotus. HMW – kõrge molekulmassiga levaan; LMW – madala molekulmassiga levaan; suc – sahharoos. Lsc3 WT\* levaani on dialüüsitud kasutades 12-14 kDa poorisuurusega membraani.

Jooniselt 15 on näha, et Lsc3 sünteesib sarnaselt *B. subtilis*'e levaansukraasile SacB (Ortiz-Soto *et al.*, 2008) kahte eri suurust levaani – kõrge molekulmassiga (HMW) ja madala molekulmassiga (LMW) levaani. Nii 300 mM kui 1200 mM sahharoosist sünteesitud HMW levaani keskmine molekulmass on ~ 4.7 MDa (Tabel 3), mis on suurem kui SacB ensüümiga sünteesitud HMW levaani keskmine molekulmass (3.5 MDa) (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Lsc3 ensüümiga sünteesitud LMW levaani keskmine molekulmass jääb 10 kDa ümbrusesse. LMW levaani molekulmassi suurust kinnitab ka fakt, et levaanilahuse dialüüsil 12 kDa poorisuurusega membraani kasutades, kaob levaanist ära LMW fraktsioon (Joonis 15 ja Tabel 3).

**Tabel 3.** Kahel erineval sahharoosi kontsentratsioonil (300 mM ja 1200 mM) Lsc3 WT ja selle mutandiga Asp300Asn sünteesitud levaanide keskmised molekulmassid.

Ensüüm	Sahharoos, mM	Levaani molekulmass, kDa	
		HMW	LMW
Lsc3 WT	300	4758 ± 55	11.1 ± 1.1
Lsc3 WT	1200	4733 ± 125	10.7 ± 1.0
Lsc3 WT*	1200	4760 ± 158	puudub
Lsc3 Asp300Asn	300	puudub	11.7 ± 0.2 ja 8.2 ± 1.4
Lsc3 Asp300Asn	1200	puudub	16.6 ± 0.5 ja 7.4 ± 0.0

Lsc3 WT\* levaani on dialüüsitud 12-14 kDa poorisuuruse membraaniga. Tabelis esitatud tulemused ja standardhälbed on saadud 3 korduse põhjal.

Huvitav on see, et 300 mM sahharoosist Lsc3 valguga sünteesitud LMW levaani molekulmass on mõnevõrra suurem kui 1200 mM sahharoosist sünteesitud levaani molekulmass (Joonis 15 ja Tabel 3). SacB sünteesib 8.3 kDa suurust LMW levaani (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Lsc3 mutandi Asp300Asn

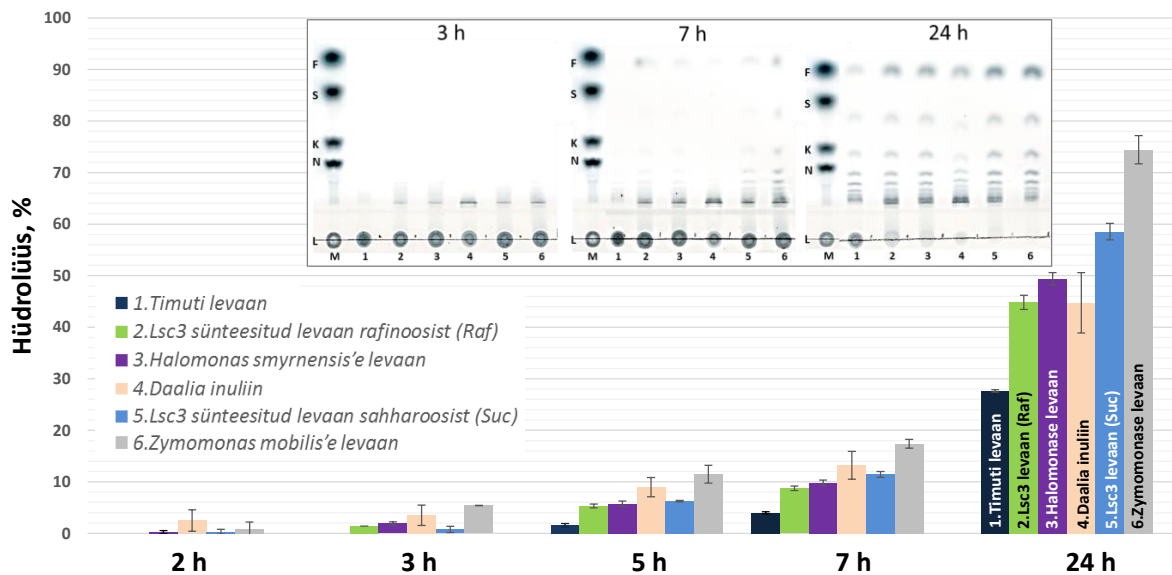
sünteesitud levaanide spekter on võrreldes Lsc3 WT levaanidega oluliselt muutunud – sünteesitakse kahte eri suurusega LMW levaani ja HMW levaani ei sünteesita üldse (Joonis 15 ja Tabel 3).

### **2.3.2.2 Lsc3 levaani ja FOS-ide vastupidavus happetele ja autoklaavimisele**

$\beta$ -sidemega fruktaane peetakse üldiselt maohappele ja seedeensüümidele vastupidavaks (Voragen, 1998; Cummings *et al.*, 2001), kuid leidub ka kirjandust, kus on näidatud nende mõningast hüdrolyüsi happete maokeskkonnas (Yamamoto *et al.*, 1999; Di Bartolomeo *et al.*, 2013). Terve inimese maohappe pH jääb vahemikku 1.5-3.5, kusjuures vanusega mao happelisus väheneb. Ka alla kahe aasta vanustel lastel on mao happelisus väiksem (Krasinski *et al.*, 1986; Young, 2001; Marieb ja Hoehn, 2010). Samas on pH tase maos väga muutlik ja sõltub meie söömise rütmist, aga ka tervislikust seisundist (Fordtran ja Walsh, 1973).

Kuna Lsc3 ensüümiga sünteesitud levaan ja FOS-id on potsentsiaalsed prebiootikumid, siis soovisime testida nende vastupidavust inimese maohappele, testimiseks valisime soolhappe lahuse pH-ga 2.0. Lisaks Lsc3 ensüümiga sünteesitud levaanile uurisime ka teiste bakterite levaansukraasidega sünteesitud levaanide, taimse levaani ja inuliini vastupidavust happetele. Katsetes kasutasime viite erinevat levaani ja ühte inuliini preparaati: 1) taimne timuti levaan, 2) Lsc3 levaansukraasiga 300 mM rafinoosist sünteesitud levaan, 3) *Halomonas smyrnensis*'e levaan, 4) daalia inuliin, 5) Lsc3 levaansukraasiga 1200 mM sahharoosist sünteesitud levaan, 6) *Zymomonas mobilis*'e levaan.

Fruktaanide happetaluvuse uurimiseks inkubeerisime neid 0.01 M soolhappes (pH 2) temperatuuril 37°C 24 tunni jooksul. Levaanide ja inuliini lõppkontsentratsioon lahuses oli 1%. Erinevatel ajapunktidel (1-7 h ja 24 h) võtsime proovi, millele hüdrolyüsireaktsiooni peatamiseks lisasime kaks mahtu 0.01 M NaOH. Viisime läbi ka fruktaanide täieliku hüdrolyüsi 24 h jooksul 0.2 M soolhappes, mille tulemust kasutasime happetaluvuse arvutustes võrdlusena (pt 2.2.9). Kõikidest levaani ja inuliini hüdrolyüsiproovidest määrasime redutseerivate suhkrute sisalduse (pt 2.2.10), mille järgi hindasime hüdrolyüsi ulatust. Lisaks analüüsisime hüdrolyüsitud proovide koostist ka TLC-l (pt 2.2.5). TLC piltidel on esimesel rajal markersuhkrud ja järgnevatel radadel levaanide ja inuliini proovid (1-6) samas järjekorras nagu tulpdiagrammil (Joonis 16).

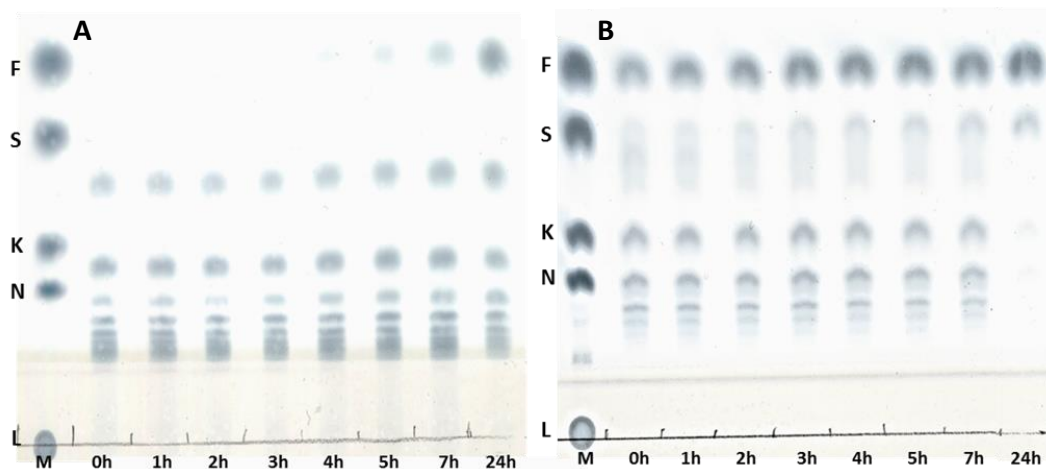


**Joonis 16.** Levaanide ja inuliini hüdrolüüs soolhappega (pH 2) 24 tunni jooksul. Tulpdiagrammil on esitatud polümeeride hüdrolüüsiprotsent arvutatuna hüdrolüüsil moodustunud redutseerivate suhkrute järgi. TLC pildil on toodud hüdrolüüsiproovid kolmel ajapunktil (3 h, 7 h ja 24 h). Radadel 1-6 on levaanide ja inuliini proovid samas järjekorras nagu tulpdiagrammil. 1  $\mu$ L NaOH-ga neutraliseeritud hüdrolüüsiproovi kanti TLC plaadi stardijoonele. Esimesele rajale kanti markersuhkrud (M): levaan (L), nüstoos (N), 1-kestoos (K), sahharoos (S) ja fruktoos (F).

Moodustunud redutseerivate suhkrute hulga analüüsist ilmneb, et uuritud levaanid ja inuliin on maokeskkonnas vastupidavad (pH 2). Pärast kahte tundi 0.01 M soolhappes inkubeerimist on polümeerid hüdrolüüsunud vähem kui 2%. TLC pildilt on näha, et kolmandaks tunniks on hüdrolüüsiproovidesse tekkinud pikemaid FOS-e, kuid enamik levaani on veel alles. Seevastu Yamamoto *et al.* (2010) ei tuvastanud FOS-e bakteriaalse levaani 3 tunni hüdrolüüsatsioonist. Meie katses on 7. reaktsioonitunniks TLC järgi tekkinud ka lühemaid FOS-e ning di- ja monosahhariide, kuid hüdrolüüsunud on siiski alla 20% materjalist. Nii TLC kui ka redutseerivate suhkrute analüüsi põhjal on happetele kõige vastupidavam timuti levaan. 7 tunni jooksul on hüdrolüüsunud ainult 4% timuti levaanist, mis on märgatavalt vähem võrreldes teiste uuritud levaanide ja inuliiniga. Kõige tundlikum happehüdrolüüsile on aga *Z. mobilis*'e levaan, mille hüdrolüüsi määr 7 tunni jooksul on 17%. Lsc3 levaanide (rafinoosist ja sahharoosist sünteesitud), *Halomonas smyrnensis*'e levaani ja daalia inuliini hüdrolüüsi protsent 7 tunni proovides oluliselt ei eristu. 24 tunni möödudes on näha kõikide uuritud levaanide (va timuti levaan) ja ka inuliini selget hüdrolüüsi erineva ahelapikkusega FOS-ideks ning juurde on tekkinud ka monosuhkruid. *Z. mobilis*'e levaani hüdrolüüsi ulatus 24 tunni jooksul on 74%, kuid timuti lineaarsel levaanil palju vähem: 28%. See on huvitav, sest need kaks levaani erinevad oluliselt ka oma molekulmasside poolest – *Z. mobilis*'e levaani Mw on 2000 kDa (A. Vigants) ja timuti levaanil on Mw ~60 kDa (Yamamoto *et al.*, 2010). Yamamoto *et al.* (1999) näitasid, et pH 1.2 keskkonnas hüdrolüüsus 2000 kDa suurune bakteriaalne levaan 1 tunni jooksul

madala molekulmassiga levaaniks (4 kDa), mille edasist lagunemist 3 tunni jooksul ei täheldatud. Need andmed viitavad lühikeste levaanide suuremale happetaluvusele. 24 tunni proovides on näha ka Lsc3 rafinoosist ja sahharoosist sünteesitud levaanide hüdrolüüsi erinevusi. Rafinoosist sünteesitud Lsc3 levaan on mõnevõrra vastupidavam kui sahharoosist sünteesitud levaan (hüdrolüüs vastavalt 45% ja 58%), mis võib olla põhjustatud nende levaanide võimalikust molekulmassi ja hargnevuse erinevustest. Kirjanduses on näidatud, et ühe ja sama ensüümiga (*Z. mobilis*'e levaansukraasiga) sünteesitud levaanid on erinevate omadustega, sõltuvalt sellest, kas need on sünteesitud rafinoosist või sahharoosist (Andersone *et al.*, 2004). Lsc3 ensüümiga sahharoosist sünteesitud HMW levaani keskmine molekulmass on ~ 4.7 MDa (pt 2.3.2.1), aga rafinoosist sünteesitud levaani molekulmassi veel uuritud ei ole.

Lisaks fruktaani polümeeridele uurisime ka levaansukraasiga Lsc3 1200 mM sahharoosist sünteesitud FOS-ide ja Lsc3 levaanist endolevanaasiga tehtud FOS-ide vastupidavust happelisele keskkonnale, mis imiteeris tingimusi maos. FOS-ide lõppkontsentratsioon 0.01 M soolhappes oli 1.3% (pt 2.2.9).



**Joonis 17.** FOS-ide happehüdrolüüs (pH 2) 24 tunni vältel. A) Lsc3 levaanist endolevanaasi töötlusega saadud FOS-id; B) Lsc3 levaansukraasiga sahharoosist (1.2 M) sünteesitud FOS-id. 1  $\mu$ L NaOH-ga neutraliseeritud hüdrolüüsiproovi kanti TLC plaadi stardijoonele. Esimesele rajale kanti markersuhkrud (M): levaan (L), nüstoos (N), 1-kestoos (K), sahharoos (S) ja fruktoos (F).

TLC näitab, et nii levaanist levanaasiga tehtud (A) kui ka sahharoosist levaansukraasiga sünteesitud FOS-id (B) peaksid olema maokeskkonnas (pH 2) vastupidavad. Isegi 7 tunni jooksul ei ole FOS-ide spektris muutusi näha (Joonis 17). Levaani FOS-ide TLC pildilt (Joonis 17, A) on näha, et alates 4-ndast hüdrolüüsitunnist hakkab tekkima monosahhariide, kuid FOS-ide vähest hüdrolüüsi on märgata alles 24 tunni proovides, kus on ka monosuhkruid tekkinud juba märgatavalt rohkem. Lsc3-ga sünteesitud FOS-ide preparaat sisaldas lisaks FOS-idele ka sahharoosi, fruktoosi ja glükoosi, mistõttu monosuhkrute lisandumist TLC pildil on keerulisem hinnata. 24. tunniks on aga enam FOS-idest mono- ja disahhariidiks hüdrolüüsunud (Joonis 17, B). Seega võib öelda, et levaanist endolevanaasiga

saadud FOS-id on happele (pH 2) vastupidavamad kui sahharoosist sünteesitud FOS-id. Sahharoosist sünteesitud FOS-id sisaldavad lisaks levaani-tüüpi FOS-idele ka inuliini-tüüpi FOS-e, nt. 1-kestoosi. Levaanist levanaasiga tehtud FOS-id on keskmiselt pikemad ja neis peaks olema ka rohkem  $\beta$ -2,1 sideme kaudu tekkinud hargnevusi. Sahharoosist sünteesitud FOS-id algavad sahharoosimolekuliga, levaanist levanaasiga tehtud FOS-ide hulgas peaks selliseid FOS-e olema väga vähe, kuna Lsc3 levaani molekulmass ja DP on väga kõrged. Need erinevused võivad mõjutada kahe FOS-i preparaadi erinevat happetaluvust.

Kuna levaani ja FOS-ide bioloogiliste toimete uurimiseks on vaja need eelnevalt steriliseerida, siis uurisime eelpool nimetatud levaanide, inuliini ja FOS-ide vastupidavust ka autoklaavimisele 0.5 ja 1 atü-ga (pt 2.2.9). Ainete võimalikku lagunemist autoklaavimise käigus uuriti TLC-ga ja redutseerivate suhkrute määramisega (pt 2.2.5 ja 2.2.10). Üheski uuritud lahuses ei tuvastatud fruktaanide lagunemist monosahhariidideks ega FOS-ideks, mis läheb kokku meie varasemate tulemustega samalaadsetes katsetes (T. Visnapuu, publitseerimata).

## KOKKUVÕTE

Fruktaanidel on mitmeid biotehnoloogilisi rakendusi toiduainete- ja farmaatsiatööstuses ning meditsiinis. Näiteks taimsete polüfruktaanide hulka kuuluv  $\beta$ -2,1 sidemega inuliin ja inuliini-tüüpi fruktooligosahhariidid (FOS) on enim kasutatud ja uuritud prebiootikumid, kuna neid toodetakse tööstuslikult. Bakteriaalsed levaansukraasid sünteesivad substraadist (nt sahharoos) erineva ahelapikkusega  $\beta$ -2,6 sidemega fruktaane, millel on näidatud veelgi tõhusam prebiootiline toime kui inuliini-tüüpi fruktaanidel. Kuna aga levaani-tüüpi fruktaanide tootmine on praegu veel ebaefektiivne ja kallis, siis on nende bioloogilisi toimeid vähe uuritud.

Meie töögrupis on põhjalikult uuritud ja iseloomustatud *P. syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 biotehnoloogilist potentsiaali levaani ja FOS-ide toomiseks. Selleks, et Lsc3 sünteesiproductide bioloogilisi toimeid uurida, oleks vaja neid suuremas koguses sünteesida. Magistritöö eesmärk oli optimeerida levaani ja levaani-tüüpi FOS-ide sünteesi levaansukraasiga Lsc3 ja iseloomustada vastavaid produkte. Lisaks oli plaanis töötada välja aja- ja materjalisäästlik meetod levaansukraasi kineetika mõõtmiseks ja uurida levaansukraasi inhibitsiooni reaktsiooniproductide glükoosi ja fruktoosiga. Kuna levaan ja FOS-id pakuvad suurt huvi prebiootikumidena, siis oli üheks eesmärgiks uurida ka nende vastupidavust happele ja autoklaavimisele.

Töö põhitulemused on järgmised:

1. Kuna Lsc3 valk on ülistabiilne, siis soovitame kasutada FOS-ide sünteesiks sahharoosist pikka reaktsiooniaega (20-24 h), kõrget sahharoosi kontsentratsiooni (1.2 M) ja väikest valgu kogust (0.9-1.5 U/mL). Sellistel tingimustel on jääksahharoosi hulk väike ja sünteesitud FOS-ide (DP 3-6) saagis sahharoosist suurim (~14 %).
2. Levaani sünteesiks sahharoosist soovitame samuti kasutada pikka reaktsiooniaega (20-24 h) ja väikest valgu kogust (~1 U/ml).
3. Lsc3 valk sünteesib kahte eri suurust levaani: kõrge molekulmassiga (~ 4700 kDa) ja madala molekulmassiga (Mw ~11 kDa) levaani. Sünteesitava levaani molekulmass sõltub sahharoosi kontsentratsioonist reaktsioonisegus. 1.2 M sahharoosist sünteesitakse peamiselt kõrge molekulmassiga levaani ja 0.3 M sahharoosist peamiselt madala molekulmassiga levaani. Seega saab sünteesitava levaani molekulmassi reguleerida sahharoosi kontsentratsiooniga. Lsc3 mutant Asp300Asn sünteesib sõltumata sahharoosi kontsentratsioonist reaktsioonisegus ainult väikese molekulmassiga levaani.
4. Magistritöö käigus sissestatud kiire ja materjalisäästlik meetodika sobib levaansukraaside reaktsioonikineetika mõõtmiseks. Meetodis registreeritakse mikroplaadil *online* glükoosi teket



sahharoosist. Selleks kasutatakse abiensüümidena glükoosi oksüdaasi ja peroksidaasi ning kromogeenina 3,3',5,5' tetrametüülbensidiini (TMB). Metoodikat valideeriti, määrates sahharoosi lõhustamise kineetilisi parameetreid Lsc3 valgul ja selle mutantidel His113Ala ja His113Gln.

5. Glükoos toimib Lsc3 reaktsioonis sahharoosi konkurentse inhibiitorina ja pidurdab levaani sünteesi sahharoosist väga tugevasti: inhibitsioonikonstant ( $K_i$ ) glükoosile on  $12.8 \pm 2.4$  mM. Fruktoosi inhibeeriv toime levaani sünteesile ( $K_i$  73.3  $\pm$  18.9 mM) on ~6 korda nõrgem. Fruktoosi inhibitsioonikonstant ( $K_i$ ) sahharoosi hüdrolüüsile on  $142.3 \pm 17.2$  mM, mis näitab et fruktoos inhibeerib levaani sünteesi tugevamini, kui sahharoosi hüdrolüüsi.
6. Seati sisse meetod levaani sünteesiks rafinoosist ja sünteesiti üle 3 g levaani, et seda kasutada stabiilsuse katsetes ja edaspidi levanaasi substraadina.
7. Erinevat päritolu levaanid ja daalia inuliin on piisavalt vastupidavad maohapet imiteerivas keskkonnas (pH 2.0) vähemalt 7 tunni vältel. 24 tunni jooksul hüdrolüüsuvad uuritud fruktaanid erineva ahelapikkusega FOS-ideks ning monosahhariidideks.
8. Nii Lsc3 valguga sahharoosist sünteesitud FOS-id kui ka endolevanaasiga levaanist tehtud FOS-id on vastupidavad happelises keskkonnas (pH 2.0) vähemalt 7 tunni vältel. Pikemaajaline inkubeerimine näitab, et levaanist endolevanaasiga tehtud FOS-id on happele vastupidavamad kui levaansukraasiga sahharoosist sünteesitud FOS-id.
9. Töös kasutatud levaanid, inuliin ja FOS-id on vesilahustena vastupidavad autoklaavimisele 1.5 tunni jooksul temperatuuridel 112 °C (0.5 atü) ja 121 °C (1 atü).

## SUMMARY

Fructans (oligo- and polymers of fructose residues) comprise an interesting group of carbohydrates of biotechnological value - they have numerous applications in food technology, pharmaceutical industry and medicine. Plant-derived  $\beta$ -2,1 linked fructans, inulin and inulin-type fructooligosaccharides (FOS), are among most widely studied prebiotics. However, recent studies suggest that  $\beta$ -2,6 linked levan and levan-type FOS have even higher prebiotic effect. Nevertheless, the properties and prebiotic effects of levan-type fructans have only scarcely been studied, due to their high production cost and their limited availability in the market. Therefore, high-level levan and levan-type FOS producing microbial systems gain escalating industrial importance.

We have previously studied and thoroughly characterised a stable and catalytically active levansucrase Lsc3 from a plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato and demonstrated its high biotechnological potential for the production of levan and levan-type FOS. In order to investigate potential applications and prebiotic properties of respective fructans, they should be synthesised in amounts to provide enough substrate for comprehensive studies. Therefore, one of the objectives of this study was to optimise the synthesis of levan and levan-type FOS using levansucrase Lsc3, and to characterise the product profile by the spectrum of FOS and molecular weight of levan. Literature data show that maximum theoretical yields of levan and FOS are impaired due to accumulation of a reaction product - glucose. Therefore, we aimed to study inhibition of Lsc3 reaction by glucose and fructose. For cost- and time-saving assay of levansucrase reaction kinetics, a high-throughput microplate-based assay was developed. Finally, the potentially prebiotic fructans were analysed for their resistance to heat-sterilisation and acidic conditions imitating those in stomach.

### The main results of this study are as follows:

1. For cost-efficient synthesis of FOS,  $\sim$ 0.9-1.5 U/mL of the Lsc3 protein and 1.2 M of sucrose should be reacted for a long time (24 h). Under these conditions, the yield of FOS (DP 3-6) from initial sucrose concentration is highest ( $\sim$ 14 %).
2.  $\sim$ 1 U/ml of the Lsc3 protein is sufficient for the production of a maximum amount of levan, in case of long reaction time. Only during the first hour of reaction, the amount of synthesised levan positively correlates with the amount of added Lsc3 protein.
3. Substrate (sucrose) concentration in the reaction medium is a key factor defining the molecular weight of synthesised levans. At high (1.2 M) sucrose concentration, high molecular weight (HMW) levan was synthesised more than at low (0.3 M) sucrose concentration. LMW levan was more abundant among Lsc3 reaction products produced at low sucrose concentration.

4. A high-throughput microplate-based method (TMB) was developed and proved as feasible for the study of levansucrase reaction kinetics. To validate the method, the  $K_m$  and  $V_{max}$  values for sucrose were determined for the Lsc3 wild-type (WT) protein and its two mutants.
5. Glucose was revealed as a strong inhibitor of levan synthesis by Lsc3 with an inhibition constant ( $K_i$ ) of  $12.8 \pm 2.4$  mM. The inhibition of levan synthesis by fructose was shown ~6 times weaker. Fructose inhibited levan synthesis more strongly than sucrose splitting.
6. According to the GPC analysis, the Lsc3 WT protein synthesises levan polymers with a bimodal distribution of molecular weight: ~ 4700 kDa and ~11 kDa. The Lsc3 mutant Asp300Asn was shown to synthesise LMW levan of two sizes, and no HMW levan.
7. The procedure for enzymatic synthesis of levan from raffinose was optimised and applied.
8. Levans of different origins demonstrated high resistance to gastric acid-mimicking conditions (pH 2.0) up to 7 h of incubation. By 24 h of incubation, fructan polymers hydrolysed into FOS and monosaccharides.
9. The FOS produced enzymatically either from sucrose or levan were shown to be highly resistant to acidic conditions (pH 2.0) up to 7 h of incubation. 24 h incubation revealed slightly enhanced acid-persistence of levan-derived FOS, compared to FOS synthesised from sucrose.
10. All the above-mentioned fructan preparations were resistant to heat-sterilisation.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Aasamets, A. (2013). Levaansukraas Lsc3 polümeeriseerijana: reaktsioonitingimuste optimeerimine soovitud produktide sünteesiks. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Aasamets, A., Visnapuu, T., Vija, H., Jõgi, E., Alamäe, T. (2014). Production of levan and fructooligosaccharides using levansucrase of *Pseudomonas syringae* pv. tomato. In: Proceedings of the 10th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience: 10th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, Praha, Tšehhi Vabariik. (Toim.) Copikova, J., Šarka, E. Czech Chemical Society, 12–16.
- Abdel-Fattah, A. F., Mahmoud, D. A., Esawy, M. A. (2005). Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Curr Microbiol* 51: 402-407.
- 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.
- Adamberg, K., Tomson, K., Talve, T., Pudova, K., Puurand, M., Visnapuu, T., Alamäe, T., Adamberg, S. (2015). Levan Enhances Associated Growth of *Bacteroides*, *Escherichia*, *Streptococcus* and *Faecalibacterium* in Fecal Microbiota. *PLoS One* 10: e0144042.
- Adamberg, S., Tomson, K., Vija, H., Puurand, M., Kabanova, N., Visnapuu, T., Jõgi, E., Alamäe, T., Adamberg, K. (2014). Degradation of fructans and production of propionic acid by *Bacteroides thetaiotaomicron* are enhanced by the shortage of amino acids. *Front Nutr* 1
- Allsopp, P., Possemiers, S., Campbell, D., Oyarzábal, I. S., Gill, C., Rowland, I. (2013). An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe* 22: 38–44.
- Alvaro-Benito, M., de Abreu, M., Fernández-Arrojo, L., Plou, F. J., Jiménez-Barbero, J., Ballesteros, A., Polaina, J., Fernández-Lobato, M. (2007). Characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. *J Biotechnol* 132: 75-81.
- Ananthakshmy, V. K., Gunasekaran, P. (1999). Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Braz Arch Biol Technol* 42: 291-298.
- Andersone, I., Auzina, L., Vigants, A., Mutere, O., Zikmanis, P. (2004). Formation of levan from raffinose by levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Eng Life Sci* 4: 56-59.
- 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.
- Banguela, A., Hernandez, 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.
- Belghith, K. S., Dahech, I., Belghith, H., Mejdoub, H. (2012). Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *Int J Biol Macromol* 50(2): 451-458.
- 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.
- Benigar, E., Dogsa, I., Stopar, D., Jamnik, A., Cigić, I.K., Tomšič, M. (2014). Structure and dynamics of a polysaccharide matrix: aqueous solutions of bacterial levan. *Langmuir* 30: 4172-4182.
- Benkeblia, N. (2013). Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. *J Chromatogr A* 1313: 54-61.

- Biedrzycka, E., Bielecka, M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci Tech* 15:170-175.
- Bondarenko, O.M., Ivask, A., Kahru, A., Vija, H., Titma, T., Visnapuu, M., Joost, U., Pudova, K., Adamberg, S., Visnapuu, T., Alamäe, T. (2016). Bacterial polysaccharide levan as stabilizing, non-toxic and functional coating material for microelement-nanoparticles. *Carbohydr Polym* 136: 710-720.
- Byun, B.Y., Lee, S.J., Mah, J.H. (2014). Antipathogenic activity and preservative effect of levan ( $\beta$  2,6 fructan), a multifunctional polysaccharide. *Int J Food Sci Technol* 49: 238-245.
- Cao, X., Li, Y., Zhang, Z., Yu, J., Qian, J., Liu, S. (2012). Catalytic activity and stability of glucose oxidase/horseradish peroxidase co-confined in macroporous silica foam. *Analyst* 137: 5785-5791.
- Caputi, L., Cianci, M., Benini, S. (2013). Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of EaLsc, a levansucrase from *Erwinia amylovora*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 69: 570-573.
- Carabin, I. G., Flamm, W. G. (1999). Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regul Toxicol Pharmacol* 30: 268-282.
- 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., Petit-Glatron, M. F. (1993). Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. *Carbohydr Res* 244: 129-136.
- Chambert, R., Treboul, G., Dedonder, R. (1974). Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* 41: 285-300.
- Corrigan, A. J., Robyt, J. F. (1979). Nature of the fructan of *Streptococcus mutans* OMZ 176. *Infect Immun* 26: 387-389.
- Crittenden, R.G., Doelle, H.W. (1993). Structural identification of oligosaccharides produced by *Zymomonas mobilis* levansucrase. *Biotechnol Lett* 15: 1055-1060.
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., Englyst, H. N. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* 73: 415-420.
- Delgado, G. T. C., Tamashiro, W. M., Pastore, G. M. (2010). Immunomodulatory effects of fructans. *Food Res Int* 43: 1231-1236.
- Di Bartolomeo, F., Startek, J.B., Van den Ende, W. (2013). Prebiotics to fight diseases: reality or fiction? *Phytother Res* 27: 1457-1473.
- Díez-Municio, M., Herrero, M., de las Rivas, B., Muñoz, R., Jimeno, M.L., Moreno, F.J. (2016). Synthesis and structural characterization of raffinose-oligosaccharides upon transfructosylation by *Lactobacillus gasseri* DSM 20604 inulosucrase. *Appl Microbiol Biotechnol* 1-13.
- Dominguez, A. L., Rodrigues, L. R., Lima, N. M., Teixeira, J. A. (2014). An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. *Food Bioprocess Technol* 7: 324-337.
- 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.
- Fordtran, J. S., Walsh, J. H. (1973). Gastric acid secretion rate and buffer content of the stomach after eating. Results in normal subjects and in patients with duodenal ulcer. *J Clin Invest* 52: 645.
- 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., Probert, H. M., Van Loo, J. A., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 17: 259-275.

- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J. A., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 17: 259-275.
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy E. F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Koziarowski, G., Dickmann R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C., Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bulletin: functional foods* 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.
- Gromkova, M. (2015). *Pseudomonas syringae* pv. tomato levansukraasi Lsc3 struktuuri ja funktsiooni seoste uurimine mutatsioonanalüüsiga. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Guillon, F., Champ, M. J. (2002). Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br J Nutr* 88: 293-306.
- Gutiérrez-Alonso, P., Fernández-Arrojo, L., Plou, F. J., Fernández-Lobato, M. (2009). Biochemical characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis* with transfructosylating activity. *FEMS yeast research* 9: 768-773.
- 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.
- Han, Y. W. (1990). Production and characterization of microbial levan. *J Agricult Food Chem* 38: 393-396.
- Han, Y. W., Clarke, M. A. (1990). Production and characterization of microbial levan. *J Agric Food Chem* 38: 393-396.
- Hayashi, S., Yoshiyama, T., Fujii, N., Shinohara, S. (2000). Production of a novel syrup containing neofructo-oligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol Lett* 22: 1465-1469.
- Hernandez, 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.
- Hernandez, 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 characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J Bacteriol* 177: 2834-2839.
- Homann, A., Biedendieck, R., Gotze, S., Jahn, D., Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J* 407: 189-198.
- 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.
- Jõgi, E., Metsla, K., Visnapuu, T., Aasamets, A., Vija, H., Alamäe, T. (2015). Synthesis and purification of functional fructans. In: Proceedings of the 11th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience: 11th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, Prague, Czech Republic. (Toim.) Copikova, J., Šarka, E. Czech Chemical Society, 5-9.
- Kang, H. K., Seo, M. Y., Seo, E. S., Kim, D., Chung, S. Y., Kimura, A., Day, D. F., Robyt, J. F. (2005). Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Acta* 1727: 5-15.
- Katapodis, P., Christakopoulos, P. (2004). Induction and partial characterization of intracellular  $\beta$  from *Thermoascus aurantiacus* and its application in the synthesis of 6-kestose. *World J Microbiol Biotechnol* 20: 667-672.

- Kaur, N., Gupta, A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci* 27: 703-714.
- Kennedy, J. F., Stevenson, D. L., White, C. A., Viikari, L. (1989). The chromatographic behavior of a series of fructooligosaccharides derived from levan produced by the fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Carbohydr Polym* 10: 103-114.
- Kim, M. G., Seo, J. W., Song, K.-B., Kim, C.-H., Chung, B. H., Rhee, S.-K. (1998). Levan and fructosyl derivatives formation by a recombinant levansucrase from *Rahnella aquatilis*. *Biotechnol Lett* 20: 333-336.
- Kolida, S., Gibson, G.R. (2007). Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *J Nutr* 137: 2503S-2506S.
- Korakli, M., Pavlovic, M., Gänzle, M. G., Vogel, R.F. (2003). Exopolysaccharide and Kestose Production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl Environ Microbiol* 69: 2073-2079.
- Krasinski, S. D., Russell, R. M., Samloff, I. M., Jacob, R. A., Dallal, G. E., McGandy, R. B., Hartz, S. C. (1986). Fundic atrophic gastritis in an elderly population: effect on hemoglobin and several serum nutritional indicators. *J Am Geriatr Soc* 34: 800-806.
- Kritzinger, S. M., Kilian, S. G., Potgieter, M. A., Du Preez, J. C. (2003). The effect of production parameters on the synthesis of the prebiotic trisaccharide, neokestose, by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Enzyme Microb Technol* 32: 728-737.
- Kyono K, Yanase H, Tonomura K, Kawasaki H, Sakai T. (1995). Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracellular levansucrase and invertase. *Biosci Biotechnol Biochem* 59: 289-93.
- 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.
- Liiv, L., Pärn, P., Alamäe, T. (2001). Cloning of maltase gene from a methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Gene* 265: 77-85.
- Lin, T. J., Lee, Y. C. (2008). High-content fructooligosaccharides production using two immobilized microorganisms in an internal-loop airlift bioreactor. *J Chin Inst Chem Eng* 39: 211-217.
- Linde, D., Macias, I., Fernández-Arrojo, L., Plou, F. J., Jiménez, A., Fernández-Lobato, M. (2009). Molecular and biochemical characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol* 75: 1065-1073.
- 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.
- Lyness, E. W., Doelle, H. W. (1983). Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotech Lett* 5: 345-350.
- Mancilla-Margalli, N.A., López, M.G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *J Agric Food Chem* 54: 7832-7839.
- Manning, T. S., Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18: 287-298.
- Mardo, K. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 struktuuri modelleerimine ja mutantide iseloomustamine. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Mardo, K., Visnapuu, T., Gromkova, M., Aasamets, A., Viigand, K., Vija, H., Alamäe, T. (2014a). High-throughput assay of levansucrase variants in search of feasible catalysts for the synthesis of fructooligosaccharides and levan. *Molecules* 19: 8434-8455.
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Elmi, T., Alamäe, T. (2014b). Mutational analysis of conserved regions harbouring catalytic triad residues of the levansucrase protein encoded by *lsc-3* (*lsc3*) gene of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Biotechnol Appl Biochem* 61: 11-22.
- Marieb, E., Hoehn, K. (2010). Human anatomy and physiology (8th), San Francisco.
- Martel, C. M., Warrilow, A. G. S., Jackson, C. J., Mullins, J. G. L., Togawa, R. C., Parker, J. E., Morris, M. S., Donnison, I. S., Kelly, D. E., Kelly, S. L. (2010). Expression, purification and use of the soluble domain of *Lactobacillus paracasei*  $\beta$ -fructosidase to optimise production of bioethanol from grass fructans. *Bioresour Technol* 101: 4395-4402.

- Martínez-Fleites, C., Ortiz-Lombardia, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G., Hernandez, L., Davies, G. J. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gramnegative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J* 390: 19-27.
- Marx, S. P., Winkler, S., Hartmeier, W. (2000). Metabolization of b-(2,6)-linked fructoseoligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 182: 163–169.
- Mena-Arizmendi, A., Alderete, J., Aguila, S., Marty, A., Miranda-Molina, A., Lopez-Munguia, A. Castillo, E. (2011). Enzymatic fructosylation of aromatic and aliphatic alcohols by *Bacillus subtilis* levansucrase: Reactivity of acceptors. *J Mol Catal B: Enzym* 70: 41-48.
- Mendez-Lorenzo, L., Porras-Domínguez, J. R., Raga-Carbajal, E., Olvera, C., Rodríguez-Alegría, M. E., Carrillo-Nava, E., Costas, M. Munguía, A. L. (2015). Intrinsic Levansucrase Activity of *Bacillus subtilis* 168 Levansucrase (SacB). *PloS one*, 10: e0143394.
- Meng, G., Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Struct Biol* 10: 935-941.
- Meng, G., Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Struct Biol* 10: 935-941.
- Meng, G., Fütterer, K. (2008). Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct Biol* 8: 16-28.
- Milala, J., Grzelak, K., Król, B., Juskiewicz, J., Zdunczyk, Z. (2009). Composition and properties of chicory extracts rich in fructans and polyphenols. *PJFNS* 59.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Newbrun, E., Baker, S. (1968) Physico-chemical characteristics of the levan produced by *Streptococcus salivarius*. *Carbohydr Res* 6: 165–70.
- Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they? *J Nutr* 129: 1402S-1406S.
- Olivares-Illana, V., López-Munguía, A., Olvera, C. (2003). Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *J Bacteriol* 185: 3606-3612.
- Olvera, C., Centeno-Leija, S. López-Munguía, A., 2007. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie van Leeuwenhoek* 92: 11-20.
- 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., Kralj, S., Van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze processive and nonprocessive transglycosylation reactions. *Microbiol* 152: 1187-1196.
- Pan, Y. C., Lee, W. C. (2005). Production of high-purity isomalto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. *Biotechnol Bioeng* 89: 797-804.
- Pavis, N., Boucaud, J., Prud Homme, M. P. (2001). Fructans and fructan-metabolizing enzymes in leaves of *Lolium perenne*. *New Phytol* 150: 97-109.
- Poli, A., Kazak, H., Gürleyendağ, B., Tommonaro, G., Pieretti, G., Öner, E. T., Nicolaus, B. (2009). High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydr Polym* 78: 651-657.
- Poli, A., Nicolaus, B., Denizci, A.A., Yavuzturk, B., Kazan, D. (2013). *Halomonas smyrnensis* sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Micr* 63: 10-18.
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., Olvera, C., Munguía, A. L. (2014). Levan-type FOS production using *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochem* 49: 783-790.
- Porras-Domínguez, J.R., Ávila-Fernández, Á., Miranda-Molina, A., Rodríguez-Alegría, M.E., Munguía, A.L. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydr Polym* 132: 338-344.



- 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.
- Ritsema, T., Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr Opin Plant Biol* 6: 223-230.
- Roberfroid, M. B. (2007). Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr* 137: 2493S2502S.
- 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.
- Sakai, K., Tachiki, T., Kumagai, H., Tochura, T. (1987). Hydrolysis of  $\alpha$ -d-galactosyl oligosaccharides in soymilk by  $\alpha$ -d-galactosidase of *Bifidobacterium breve* 203. *Agric Biol Chem* 51: 315-322.
- Sangeetha P. T., Ramesh M. N., Prapulla S. G. (2005). Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci Technol* 16: 442-457.
- 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.
- Santos-Moriano, P., Fernandez-Arrojo, L., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A. O., Plou, F. J. (2015). Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: effect of reaction conditions. *J Mol Catal B: Enzym* 119: 18-25.
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., Hecht, H. J. (2006). Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr Res* 341: 2335-2349.
- Sheu D. C., Chang J. Y., Wang C. Y., Wu C. T., Huang C. J. (2013). Continuous production of high-purity fructooligosaccharides and ethanol by immobilized *Aspergillus japonicus* and *Pichia heimii*. *Bioprocess Biosyst Eng* 36: 1745-1751.
- Sheu, D. C., Lio, P. J., Chen, S. T., Lin, C. T., Duan, K. J. (2001). Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzyme system of  $\beta$ -fructofuranosidase and glucose oxidase. *Biotech Lett* 23: 1499-1503.
- Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T., Goksungur, Y. (2014). Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydr Polym* 99: 454-461.
- Simms, P. J., Boyko, W. J., Edwards, J. R. (1990). The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. *Carbohydr Res* 208: 193-198.
- 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.
- Srikanth, R., Reddy, C. H. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., Uppuluri, K. B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr Polym* 120: 102-114.
- St. John, J. A., Bonnett, G. D., Simpson, R. J. (1996). A method for rapid quantification of sucrose and fructan oligosaccharides suitable for enzyme and physiological studies. *New Phytol* 134: 197-203.
- Strube, C. P., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J., Heinz D. W. (2011). Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *J Biol Chem* 286: 17593-17600.
- 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.
- Suzuki, M., Pollock, C. J. (1986). Extraction and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in timothy (*Phleum pratense*). *Can J Bot* 64: 1884-1887.

- Tambara, Y., Hormaza, J. V., Pérez, C., León, A., Arrieta, J., Hernandez, L. (1999). Structural analysis and optimised production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Biotechnol Lett* 21: 117-121.
- Tanaka, T., Susumu, O.I., Yamamoto, T. (1980). The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase. *J Biochem* 87: 297-303
- Tanaka, T., Yamamoto, S., Susumu, O. I., Yamamoto, T. (1981). Structures of heterooligosaccharides synthesized by levansucrase. *Biochem J* 90: 521-526.
- Tian, F., Karboune, S., Hill, A. (2014). Synthesis of fructooligosaccharides and oligolevans by the combined use of levansucrase and endo-inulinase in one-step bi-enzymatic system. *Inno Food Sci Emerg Technol* 22: 230–238.
- 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.
- Tonozuka, T., Tamaki, A., Yokoi, G., Miyazaki, T., Ichikawa, M., Nishikawa, A., Ohta, Y., Hidaka, Y., Katayama, K., Hatada, Y., Ito, T. (2012). Crystal structure of a lactosucrose-producing enzyme, *Arthrobacter* sp. K-1  $\beta$ -fructofuranosidase. *Enzyme Microb Technol* 51: 359-365.
- Waldherr, F. W., Meissner, D., Vogel, R. F. (2008). Genetic and functional characterization of *Lactobacillus panis* levansucrase. *Archives of Microbiol* 190: 497-505.
- Van den Ende, W. (2013). Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Frontiers in plant science* 4.
- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Van Riet, L., Van Laere, A., Yoshida, M., Kawakami, A. (2003). Fructan 1-exohydrolases.  $\beta$ -(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiol* 131: 621-631.
- Van den Ende, W., Peshev, D., De Gara, L. (2011). Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends Food Sci Tech* 22: 689-697.
- Van Geel-Schutten, G. H., Faber, E. J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M. R., Ten Brink, B., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., Dijkhuizen, L. (1999). Biochemical and structural characterisation of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl Environ Microbiol* 65: 3008-3014.
- 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., 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*. *Microbiol* 150:621-630.
- Verspreet, J., Hansen, A. H., Dornez, E., Delcour, J. A., Van den Ende, W., Harrison, S. J., Courtin, C. M. (2015). LC-MS analysis reveals the presence of graminan-and neo-type fructans in wheat grains. *J Cereal Sci* 61: 133-138.
- Wichienchot, S., Thammarutwasik, P., Jongjareonrak, A., Chansuwan, W., Hmadhlu, P., Hongpattarakere, T., Itharat, A., Oraikul, B. (2011). Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand. *Songklanakarin J Sci Technol* 33: 517.
- 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., Smeeckens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol* 120: 351-360.

- Visnapuu, T. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasid: ekspressioon, biokeemiline iseloomustamine, mutatsioonanalüüs ja polümerisatsiooniproduktide spekter. Doktoritöö, Tartu Ülikool.
- Visnapuu, T., Mardo, K., Alamäe, T. (2015). Levansucrases of a *Pseudomonas syringae* pathovar as catalysts for the synthesis of potentially prebiotic oligo- and polysaccharides. *N Biotechnol* 32: 597-605.
- 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., 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., Alamäe, T. (2009). Fully automated chip-based negative mode nano-electrospray mass spectrometry of fructooligosaccharides produced by heterologously expressed levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23: 1337-1346.
- Voragen, A.G. (1998). Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends Food Sci Tech* 9: 328-335.
- Wuerges, J., Caputi, L., Cianci, M., Boivin, S., Meijers, R., Benini, S. (2015). The crystal structure of *Erwinia amylovora* levansucrase provides a snapshot of the products of sucrose hydrolysis trapped into the active site. *J Struct Biol* 191: 290-298.
- Yamamoto, S., Lüscher, M., Hochstrasse, U., Boller, T., Wiemken, A. (2010). Mode of synthesis of long chain fructan in timothy haplocorm. *Grassl Sci* 56: 194-197.
- Yamamoto, Y., Takahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matsumoto, T., Saeki, S., Yamaguchi, H. (1999). In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J Nutr Biochem* 10: 13-18.
- 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.
- Yoon, E.J., Yoo, S.H., Cha, J., Lee, H.G. (2004). Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *Int J Biol Macromol* 34: 191-194.
- Young, D. G. (2001). A stain for demonstrating *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *Biotech Histochem* 76: 31-34.
- Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides - occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microbial Technol* 19: 107-117.

#### **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

[www.cazy.org](http://www.cazy.org)

[www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org)

[www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

[www.beneo.com](http://www.beneo.com)

[www.expasy.org](http://www.expasy.org)

## LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anneli Aasamets (03.02.1986)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Levaani ja fruktooligosahhariidide süntees *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasiga Lsc3,

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, 27.05.2016