



*Physics is an ever young science, Varna, October, 27 – 29, 2017*  
*Физиката – вечно млада наука, Варна, 27 – 29 октомври 2017 г.*

## ИМОБИЛИЗИРАНЕ НА ФРУКТОЗИЛТРАНСФЕРАЗА ВЪРХУ КОМПОЗИТНИ ФИЛМИ ОТ ПОЛИМЛЕЧНА КИСЕЛИНА, КСАНТАН И ХИТОЗАН

Илия Илиев, Тонка Василева, Веселин Биволарски, Ася Виранева,  
Иван Бодуров, Мария Марудова, Теменужка Йовчева  
*Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“*

**Резюме.** Фруктозилтрансферазите катализират синтезата на полифруктозани от леванов тип в присъствие на захароза в реакционната среда. В присъствие на акцептори (малтоза, изомалтоза, лактоза, фруктоза) и донор на фруктозни единици – захароза, те синтезират олигозахариди със степен на полимеризация от 3 до 5 монозахаридни остатъка, които притежават пребиотичен потенциал. В настоящото изследване ензимът фруктозилтрансфераза от щам *Leuconostoc mesenteroides* Lm17 се имобилизира върху многослойна полизахаридна структура, съставена от хитозан и ксантан. Слоеве се нанасяха върху предварително заредени в коронен разряд подложки от полимлечна киселина (ПМК). Получените композитни филми се изследваха за степента на имобилизиране на ензима и възможността за синтез на фруктан върху повърхността на филма. В получените филми се установи активност на ензима от 0,73 U/mg филм. При провеждане на ензимна реакция в присъствие над 10% захароза се установи провеждането на хидролизна и трансфе-

разна реакция, чрез която се синтезира полизахарид както в разтвора, така и върху мембраната. Повърхностната морфология на многослойните филми се изследва с помощта на атомно силов микроскоп Nanosurf Flex AFM. Получени са стойностите на средноквадратичната грапавост. Установи се, че тя нараства с нарастване на броя на слоевете независимо от последователността им.

*Keywords:* polylactic acid; corona discharge; fructosyltransferase; levansucrase; immobilized enzymes

## Увод

Леванзахарата е фруктозилтрансфераза, която катализира три различни реакции в зависимост от молекулата на фруктозил акцепторната молекула – включително в случая полимеризация, хидролизиране и трансфруктозилиране. Като ключов биокатализатор при синтеза на леван и леванов тип фрукто-олигозахариди, леванзахарата е широко и интензивно проучвана. Поради обещаващия физиологичен ефект на леван и леванов тип фрукто-олигозахариди те предоставят голям потенциал за приложение в хранително-вкусовата и фармацевтичната промишленост (Sessler et al., 1999; Daudé et al., 2012; Divya & Sugumaran, 2015; Silbir et al., 2014).

Имобилизацията на ензими най-общо може да се определи като включване на ензимната молекула в някаква изолирана фаза, която отделя каталитично активния ензим от фазата на свободния разтвор, но му позволява да контактува с разтворените в него субстрат, инхибитор или ефектор. Тази изолирана фаза, наречена матрица, най-често е неразтворима и представлява високомолекулен, хидрофилен, природен или синтетичен полимер (Nisha et al., 2012; Shintani, 2014).

Целта на настоящата статия е да се изследва хидролазната и трансферазната реакция на имобилизирана фруктозилтрансфераза леванзахараза Lm 17-120 в многослойни филми.

## Експеримент

### *Образуване на подложки от полимлечна киселина*

Получаването на филми от полимлечна киселина беше осъществено чрез разтваряне на 2 грама полимлечна киселина (купена от „Лактел“, Америка) в 100 милилитра хлороформ. Разтворът се разбъркваше в продължение на 60 минути върху магнитна бъркалка, след което се изливаше в стъклените петрита и съхнеше до изпаряване на разтворителя. Получените филми бяха изваждани от петритата и бяха изсушавани при 35°C за 48 часа. След това те бяха поставени в ексикатор при стайна температура и относителна влажност 54 % в продължение на 1 денонощие.

*Зареждане на подложките в коронен разряд и измерване на техния повърхностен потенциал*

От получените филми от полимлечна киселина бяха изрязвани подложки с размери 2,5 x 2,5 cm. Подложките бяха зареждани в коронен разряд с помощта на триелектродна система, състояща се от корониращ електрод във вид на игла,

плосък заземен електрод и решетка, поставена между тях. На корониращия електрод беше подавано положително или отрицателно напрежение 5 kV, а на решетката – напрежение 1 kV със същата полярност както на корониращия електрод. Повърхностният потенциал на получените електрети беше измерен по метода на вибриращия електрод с компенсация с грешка, ненадвишаваща 5 %.

*Получаване на многослойни филми по метода на потапяне*

За получаване на многослойни филми беше използван 1 % разтвор на хитозан и 0,1 % разтвор на ксантан в буферен разтвор с рН 5 и йонна сила 100 mM (ацетатен буфер). Отлагането на слоевете винаги започваше със слой от полиелектролит, който е противоположно зареден на подложката. При положително заредена подложка се отлагаше ксантан като първи слой, а при отрицателно заредена – хитозан. За целта се използваше автоматизираната система Poly Stainer IUL, Spain, като се прилагаше следната последователност на потапяне: 30 минути потапяне в разтвор на ксантан с разтворен в него ензим – леванзахараза Lm17-120; 5 минути промиване в буферен разтвор; 15 минути потапяне в хитозан; 20 минути потапяне в 1,5 % разтвор на натриев триполифосфат в дестилирана вода; 20 минути потапяне в 0,1 % разтвор на глутаров алдехид в дестилирана вода; 5 минути промиване в буферен разтвор. Тази последователност се повтаряше до достигане на желания брой слоеве.

*Атомно силова микроскопия*

Повърхностната морфология на получените многослойни филми беше анализирана с помощта на атомно силов микроскоп AFM Nanosurf Flex AFM. Повърхностните изображения бяха получени със стандартна игла Tap190Al-G с радиус на острието 10 nm. Времето на сканиране беше 1 секунда. На основата на получените изображения беше пресметната средноквадратичната грапавост.

*Определяне на рН-стойностите*

Стойностите на рН се измерваха с рН-метър W.T.W Sen. Tix 97T. Всички експерименти за измерване на рН стойностите бяха проведени минимум с трикратна повтаряемост.

*Количествено определяне на белтък*

Количеството на белтък беше определяно по метода на Брадфорд (Bradford, 1976).

*Определяне на ензимната активност на леванзахараза*

Ензимната активност беше определена по метода на Dols и съавтори (Dols et al., 1998). Ензимната реакция беше проведена при условия: в 20 mM Na-ацетатен буфер, рН 5.3, съдържащ 100 g/l захароза (Merck чистота 99 %), 0.05 g/l CaCl<sub>2</sub>, 1 g/l натриев азид и подходящо разредена с буфер ФТФ при 30°C.

Една единица фруктозилтрансфераза се дефинира като количеството ензим, което катализира получаването на 1 μmol глюкоза за 1 минута при съответните условия за протичане на ензимната реакция. Съдържанието на глюкоза беше оп-

ределено по метода на Miller с използване на 3,5 – динитросалицилова киселина (ДНСК) (Miller, 1959).

Всички експерименти за определяне на ензимната активност са проведени минимум с трикратна повторяемост.

*Определяне на трансферазна и хидролазна активност на пречистена леванзахараза*

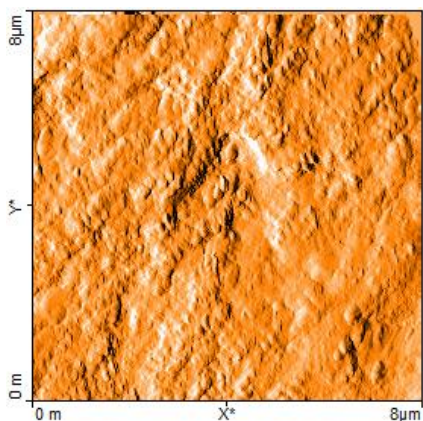
Определяне на съотношението между трансферазната и хидролазната активност на леванзахаразата се извършва при следните реакционни условия: 20 mM натриево ацетатен буфер с pH 5,3; 0,05 g/l CaCl<sub>2</sub> и 1 g/l натриев азид при 35°C. Количеството на освободената глюкоза и фруктоза беше определено с ензимен тест К – FRUGL 11/05 (Megazyme) съгласно инструкциите на производителя.

Всички експерименти за определяне на трансферазната и хидролазната активности са проведени минимум с трикратна повторяемост. Резултатите бяха обработени със софтуер SigmaPlot 12.0 (Systat Software. Inc).

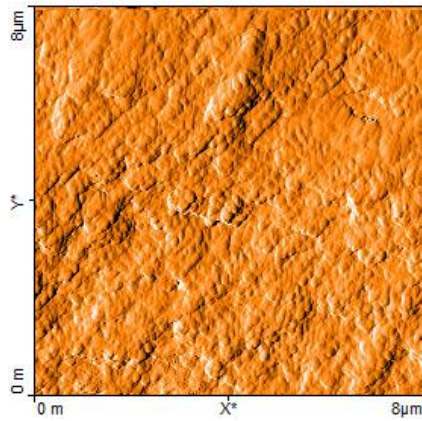
### Резултати и обсъждане

*Измерване на повърхностната морфология с атомно силов микроскоп*

Беше изследвана повърхностната морфология на многослойни филми с различен брой слоеве (6 и 12 слоя), получени върху положително и отрицателно заредени подложки от ПМК с атомно силов микроскоп. На фиг.1 са представени изображения за многослойни филми, получени върху положително заредени подложки от ПМК, а на фиг. 2 – за многослойни филми, получени върху отрицателно заредени.



Многослойни филми от ПМК  
с 6 слоя ксантан/хитозан

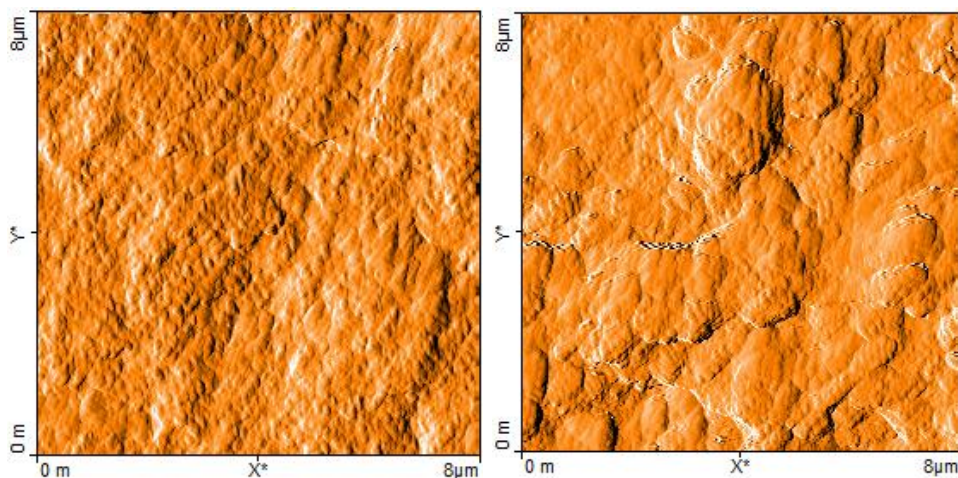


Многослойни филми от ПМК  
с 12 слоя ксантан/хитозан

**Фигура 1.** Изображения от атомно силова микроскопия за многослойни филми, получени върху положително заредени подложки от ПМК

В таблица 1 са представени стойностите на средноквадратичната грапавост за многослойни филми от ПМК.

Получените резултати, представени на фиг. 1 и фиг. 2 и в таблица 1, показват, че: (а) многослойните филми, получени върху отрицателно заредена подложка от ПМК имат по-висока средноквадратична грапавост в сравнение с тези, получени върху положително заредена подложка; (б) с увеличаване на броя на отложените слоеве се увеличава средноквадратичната грапавост независимо от полярността на подложката, което потвърждава захващането на по-голямо количество полиелектролити.



Многослойни филми от ПМК  
с 6 слоя хитозан/ксантан

Многослойни филми от ПМК  
с 12 слоя хитозан/ксантан

**Фигура 2.** Изображения от атомно силова микроскопия за многослойни филми, получени върху отрицателно заредени подложки от ПМК

**Таблица 1.** Средноквадратичната грапавост за многослойни филми от ПМК

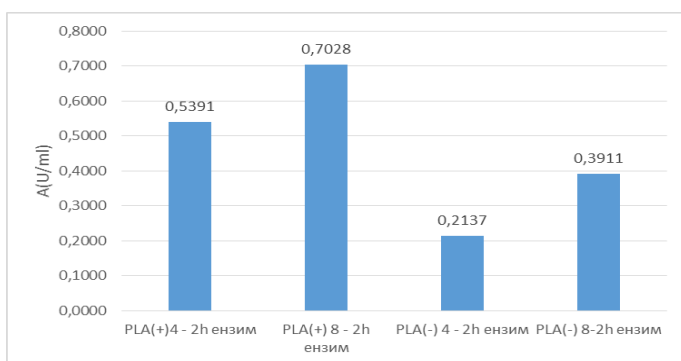
Образци	Средноквадратична грапавост $S_q$ , nm	
	Положителна корона	Отрицателна корона
ПМК 6 слоя	10,07	11,54
ПМК 12 слоя	16,57	21,15

*Изследване на хидролазната и трансферазната активност на имобилизираната леванзахараза*

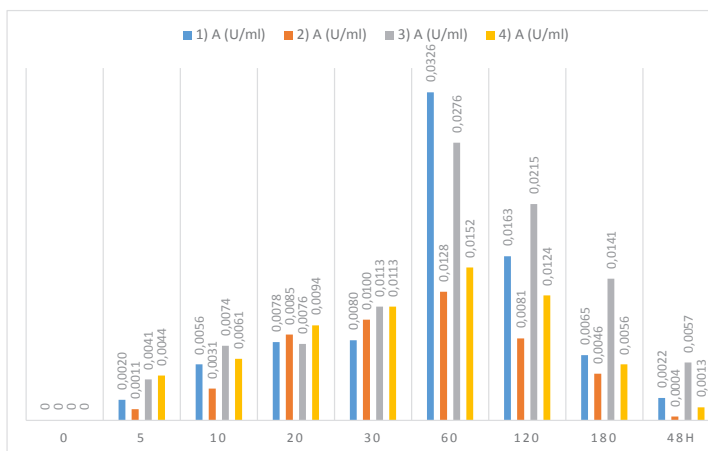
В следващия етап на изследването бяха проучени ефектът на броя слоеве и видът заряд върху имобилизирането на леванзахараза Lm 17-120. Най-висока ак-

тивност на ензима се детектира при положително зареден филм с 12 слоя (фиг. 3). При изчисляване ефективността на имобилизиране беше установено, че над 35 % от изходния ензим в разтвора се е имобилизирал.

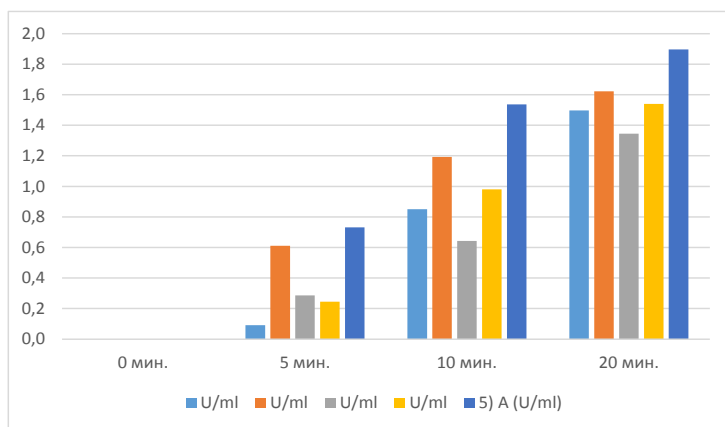
На фиг. 4 са представени данни за стабилността на имобилизирания ензим в продължение на 48 часа. Беше установено, че независимо от количеството имобилизиран ензим в многослойните филми неговата активност да хидролизира захароза, се запазва до 60 минути от началото на процеса. При продължаване на ензимната реакция хидролизата на субстрата рязко спада и е едва 10 % от отчетения максимум на 48 час. Това вероятно се дължи на продуктоинхибиране на ензима или намаляване на хидролазната активност за сметка на трансферазната.



**Фигура 3.** Влияние на заряда и броя на слоевете в многослойните филми върху имобилизирането на леванзахароза Lm 17-120.



**Фигура 4.** Стабилност на леванзахарозната реакция при имобилизирана леванзахароза в положително зареден многослоен филм с 12 слоя



**Фигура 5.** Влияние на концентрацията на захароза върху хидролазната и трансферазната активност на леванзахараза Lm 17-120

В следващия експеримент се проследи профилът на ензимната активност на леванзахараза Lm 17-120 в присъствие на захароза от 5 до 20 % (фиг. 5). Беше установено, че при концентрация на захароза до 10 % преобладава хидролазната реакция, докато при концентрация над 10 % е налице и трансферазна активност. В резултат на трансферазната активност се синтезират фруктоолигозахариди, като преобладават три- и тетразахаридите. Общото количество на синтезираните олигозахариди е сравнително ниско (8 %), което предполага бъдещо оптимизиране на процеса за неговото изместване в посока синтез на по-голямо количество олигозахариди.

### Заклучение

В резултат на проведените експерименти беше установена възможността за имобилизиране на леванзахараза Lm 17-120 в многослойни филми, като най-ефективен е процесът при положително зареден филм с 12 слоя. Доказана е за първи път трансферазна реакция на имобилизирания ензим в многослоен филм, водеща до синтез на фруктоолигозахариди. Получените резултати са една добра основа за разработване на многослойни филми с имобилизирани ензими, които биха могли да се използват като активни опаковки на хранителни продукти, които по време на съхранението си да повишават своята функционалност, като се синтезират пребиотични олигозахариди.

## REFERENCES/ЛИТЕРАТУРА

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248 – 254.
- Daudé, D., Remaud-Siméon, M. & André, I. (2012). Sucrose analogs: an attractive (bio)source for glycodiversification. *Nat Prod Rep*, 29, 945 – 960.
- Divya, J.M. & Sugumaran, K.R. (2015). Fermentation parameters and condition affecting levan production and its applications. *J. Chem. & Pharm. Res.*, 7, 861 – 865.
- Dols, M., Remaud-Siméon, M. & Monsan, P. (1998). Optimization of the production of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 and its application to the synthesis of non digestible glucooligosaccharides. *Proc. 2nd European Symp. Biochem. Sci.*, pp. 86 – 92.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426 – 428.
- Nisha, S., Arun Karthick, S. & Gobi, N. (2012). A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chem. Sci. Rev. & Lett.*, 1(3), 148 – 155.
- Sessler, G.H., Sessler, G.M. & Gerhard-Multhaupt, R. (1999). *Electrets*. Morgan Hill: Laplacian Press.
- Shintani, H. (2014). Immobilized enzyme column combined with HPLC and column switching method for the analysis of complicated matrix such as body fluids. *Pharm. Reg. Affairs*, 3(5), art. no. 1000e142.
- Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T. & Goksungur, Y. (2014). Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydrate Polym.*, 99, 454 – 461.

## IMMOBILIZATION OF FRUCTOSYLTRANSFERASES ON COMPOSITE FILMS OF POLYLACTIC ACID, XANTHAN AND CHITOSAN

**Abstract.** Fructosyltransferases catalyze the synthesis of Levan type polysaccharides in the presence of sucrose in the reaction medium. In the presence of acceptors (maltose, isomaltose, lactose, fructose) and fructose donor sucrose, they synthesize oligosaccharides with a degree of polymerization DP 3 - 5 monosaccharide residues that have prebiotic potential. In the present study, the fructosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* Lm17 strain is immobilized on a multilayer polysaccharide structure composed of chitosan and xanthan. The layers were applied onto pre-loaded corn root cans of polylactic acid. The resulting composite films were investigated for the degree of immobilization of the

enzyme and the ability to synthesize fructan on the surface of the film. The activity of immobilized enzyme film was found 0.73 U/mg in the resulting films. In carrying out an enzymatic reaction in the presence of over 10 % sucrose, a hydrolysis and transferase reaction was established by which a polysaccharide was synthesized in both the solution and the membrane. Surface morphology of multilayer films is investigated using the Nanosurf Flex AFM. The values of the average roughness were obtained. It is found that it increases with increasing number of layers, regardless of their sequence.

✉ **Prof. Iliia Iliev**

University of Plovdiv  
24, Tzar Asen St.  
4000 Plovdiv, Bulgaria  
E-mail: ilievini@abv.bg

✉ **Dr. Tonka Vasileva**

University of Plovdiv  
24, Tzar Asen St.  
4000 Plovdiv, Bulgaria  
E-mail: tonika1@abv.bg

✉ **Dr. Veselin Bivolarski**

University of Plovdiv  
24, Tzar Asen St.  
4000 Plovdiv, Bulgaria  
E-mail: morydin@abv.bg

✉ **Dr. Asya Viraneva**

University of Plovdiv  
24, Tzar Asen St.  
4000 Plovdiv, Bulgaria  
E-mail: asia83@abv.bg

✉ **Dr. Ivan Bodurov**

University of Plovdiv  
24, Tzar Asen St.  
4000 Plovdiv, Bulgaria  
E-mail: bodurov\_ivan@yahoo.com

✉ **Dr. Maria Marudova**

University of Plovdiv  
24, Tzar Asen St.  
4000 Plovdiv, Bulgaria  
E-mail: marym\_99\_1999@yahoo.com

✉ **Prof. Temenuzhka Yovcheva**

University of Plovdiv  
24, Tzar Asen St.  
4000 Plovdiv, Bulgaria  
E-mail: yovchevat@gmail.com