

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

BAKTERIĀLO LEVĀNU KVANTITATĪVĀS  
NOTEIKŠANAS METODES IZSTRĀDE

MAGISTRA DARBS

**Autors:** Renārs Broks  
Stud. Apl. Nr. rb12015

**Darba vadītāji:** Pēteris Zikmanis, *Dr.habil. biol*  
Pāvels Semjonovs, *Dr.biol*

**Recenzents:** Nils Rostoks, *Dr. biol.*

Rīga 2017

# Saturs

Saturs .....	2
Kopsavilkums .....	4
Summary.....	5
Ievads.....	6
1. Literatūras apskats.....	8
1.1. Fruktāni .....	8
1.2. Levāns.....	9
1.3. Fruktānu noteikšanas metodes .....	11
1.3.1. Inulīna kvantitatīvā analīze.....	11
1.3.2. Levāna kvantitatīvā analīze .....	13
1.4. Enzimātisko metožu izmantošana kvantitatīvajā analīzē .....	13
1.5. Inulināzes .....	15
2. Materiāli un metodes .....	17
2.1. Levānu producējošā kultūra un kultivēšanas apstākļi.....	17
2.2. Barotne.....	17
2.3. Levāna producenta kultivēšana.....	17
2.4. Levāna izdalīšana un svara analīze .....	17
2.5. Laboratorijas trauki un mērierīces .....	18
2.6. Vienreizējās lietošanas materiāli.....	18
2.7. Laboratorijas iekārtas.....	19
2.8. Analītiskās metodes .....	20
2.8.1. Šūnu biomasas noteikšana.....	20
2.8.2. pH noteikšana .....	20
2.8.3. Fruktānu noteikšana .....	20
2.8.4. Reducējošo cukuru noteikšana ar DNS metodi.....	20
2.8.5. Cukuru noteikšana ar Megazyme specifisko enzīmu komplektu (K-SURFG 06/14) .....	21
2.9. Eksperimenta plānošana un datu apstrāde .....	22
2.10. Metodes validācija .....	22
3. Rezultāti .....	23
3.1. Bakteriālo levānu noteikšana ar Megazyme enzimatisko fruktānu noteikšanas metodi .....	23

3.2.	Megazyme komplekta optimizācijas iespējas bakteriālo levānu hidrolīzei .....	25
3.2.1.	Megazyme komplekta inulināžu daudzuma un reakcijas laika ietekme uz bakteriālo levānu hidrolīzi .....	25
3.2.2.	Levāna kvantitatīvās noteikšanas iespējas izmantojot optimizēto hidrolīzes laiku un inulināžu daudzumus .....	27
3.2.3.	Temperatūras un inulināžu daudzuma ietekme uz bakteriālo levānu hidrolīzi ..	27
3.2.4.	Reakcijas laika ietekme ietekme uz levāna hidrolīzi paaugstinātā temperatūrā.	29
3.2.5.	Atšķirīgu Megazyme inulināžu komplektu ietekme uz bakteriālo levānu hidrolīzi .....	30
3.3.	Komerčiāli pieejamo inulināžu ietekme uz levānu hidrolīzi .....	32
3.3.1.	Endo-inulināzes daudzuma un hidrolīzes laika ietekme uz bakteriālā levāna hidrolīzi .....	32
3.3.2.	Dažādu ekso- un endo-inulināžu daudzumu ietekme uz levānu hidrolīzi .....	34
3.3.3.	Temperatūras un ekso-inulināzes daudzuma ietekme uz levāna hidrolīzi.....	36
3.4.	Levāna noteikšana optimālajos apstākļos .....	37
3.5.	Saharozes, cietes un reducējošo cukuru atdalīšana .....	38
3.5.1.	Nātrija borhidrīda iespējamās ietekmes pārbaude .....	38
3.6.	Hidrolizētā levāna cukuru noteikšana .....	38
3.7.	Levāna noteikšanas metodes pārbaude .....	39
3.7.1.	Levāna noteikšana standartšķīdumos .....	39
3.7.2.	Levāna noteikšana producenta <i>G. naphelii</i> P1464 kultūršķīdumos .....	39
3.8.	Metodes validācija .....	40
3.9.	Bakteriālā levāna enzimatiskās noteikšanas metode.....	42
4.	Diskusija .....	44
5.	Secinājumi .....	49
6.	Pateicības.....	50
7.	Literatūras saraksts.....	51

## Kopsavilkums

Bakteriālais levāns (BL) ir ekstracellulārs fruktozes polimērs ar ievērojamu tehnoloģisko potenciālu. Tā realizāciju veicina efektīvu producentu meklējumi un fermentācijas procesu optimizācija, bet kavē specifisku, precīzu un viegli īstenojamu BL noteikšanas metožu trūkums. Maģistra darbā, balstoties uz inulīna enzimatiskās noteikšanas metodi (K-RFUC, Megazyme), skaidroti dažādas izcelsmes endo- un ekso-inulināžu daudzumi, attiecības, reakcijas apstākļi (temperatūra, laiks), kas nodrošina BL pilnu hidrolīzi un kvantitatīvu noteikšanu. Modificētās K-FRUC metodes pārbaude BL standartšķīdumos un validācija ar standartpiedevu metodi producenta *Gluconobacter naphelii* kultūršķīdumos (BL atgūstamība  $97,34 \pm 6,14\%$ ;  $p < 0,05$ ) apstiprina, ka tā ir precīza un pielietojama BL kvantitatīvajai analīzei.

Atslēgas vārdi: levāns, inulīns, kvantitatīvā analīze, inulināzes.

## Summary

Bacterial levan (BL) is an extracellular fructose polymer with significant technological potential. Its realization is promoted by searches for efficient producers and an optimisation of fermentation processes but hampered by a lack of specific, precise and convenient BL determination methods. In the Master's thesis, based on the inulin enzymatic determination method (K-FRUC, Megazyme), the amount and ratios of different origin endo- and exo-inulinases, reaction conditions (temperature, time) have been clarified, which ensure full hydrolysis and quantitative determination of BL. Verification of modified K-FRUC method in BL standard solutions and validation in producers culture *Gluconobacter naphelii* supernatants by the Method of Standard Additions (BL recovery  $97,34 \pm 6,14\%$ ;  $p < 0,05$ ) confirmed that it is accurate and usable for a quantitative determination of BL.

Keywords: levan, inulin, quantitative analysis, inulinases.

## Ievads

Fruktāni ir fruktozes polisaharīdi un tie iedalās inulīnos, kurus sintezē augi, un levānos, kurus sintezē mikroorganismi un dažas augu sugas.

Levāns (( $\beta$ -2,6) - fruktozes polimērs) ir uzskatāms par tehnoloģiski nozīmīgu un perspektīvu produktu medicīnā, pārtikas un ķīmiskajā rūpniecībā.

Levānu sintezē daudzi mikroorganismi, tostarp *Acetobacter xylinum*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis*.

Pašlaik nav pazīstamas tādas baktēriju sintezēto levānu kvantitatīvās noteikšanas metodes, kas būtu specifiskas, precīzas un salīdzinoši viegli īstenojamas. Augu izcelsmes fruktānu noteikšanai izmanto Megazyme Inc. komplekso enzimatisko metodi (AOAC 999.03 un AAC 32.32), kas pamatā ir paredzēta īsākās ķēdes inulīnu noteikšanai. Levānu gadījumā šī metode dod jūtami samazinātus rezultātus, kuri ir pat 10 reizes mazāki par sagaidāmajiem.

Pēc literatūras datiem, agrākajos gados ir bijis komerciāli pieejams Fructozyme L preparāts (Novozymes), kura ekso- un endo-inulināžu maisījums spēja pietiekami efektīvi hidrolizēt dažāda veida fruktānus, tostarp arī levānus, līdz fruktozei. Taču šobrīd Fructozyme L preparāts nav pieejams, jo tā ražošana ir pārtraukta.

Megazyme reakciju kompleksā, analītiskajos paraugos, kas satur augu izcelsmes fruktānus, sākotnēji tiek enzimatiski hidrolizēti glikāna tipa polisaharīdi un reducēti attiecīgie cukuru monomēri, atstājot tikai fruktānu polimērus. Pēc tam tiek pievienots enzīmu maisījums, kas satur ekso- un endo-inulināzes. Šie enzīmi hidrolizē fruktānus līdz monomēriem, kuriem pēc tam ar PAHBAH krāsu reaģentu var spektrofotometriski reģistrēt absorbciju starpības salīdzinājumā ar kontroles paraugiem un aprēķināt fruktānu daudzumu (g/l) analizējamajos šķīdumos.

Šo metodi nepieciešams pilnveidot, lai ar tās modifikāciju būtu iespējams kvantitatīvi noteikt arī baktēriju sintezētos levānus.

Darba mērķis: Balstoties uz šobrīd komerciāli pieejamo (Megazyme) augu izcelsmes fruktānu (inulīni) noteikšanas metodi (AOAC 999.03/AACC 32.32) izstrādāt bakteriālo fruktānu (levāni) kvantitatīvās noteikšanas metodi.

Darba uzdevumi:

1. Balstoties uz inulīna enzimatiskās noteikšanas metodi (K-FRUC, Megazyme), skaidrot dažādas izcelsmes endo- un ekso-inulināžu daudzumus un attiecības, kas nodrošina efektīvu bakteriālo levānus sadalīšanu līdz monomēriem.

2. Novērtēt ārvides faktoru ietekmi (inkubācijas temperatūra, laiks, enzīmu / bakteriālā levāna attiecības) uz levānu hidrolīzi.

3. Optimizētajos apstākļos veikt modificētās levānu kvantitatīvās noteikšanas metodes pareizības pārbaudi un validāciju levānu standartšķīdumos un levāna producenta *Gluconobacter naphelii* P1464 kultūršķīdumos.

# 1. Literatūras apskats

## 1.1. Fruktāni

Fruktāni ir fruktozes polisaharīdi, kuri iedalās levānos (1.1. attēls) un inulīnos (1.2. attēls). Levāni ir fruktozes polimēri, kuru galvenā ķēde sastāv no ar  $\beta$ -2,6 saiti savienotiem fruktozes monomēriem un tiem ir raksturīgas sānu ķēdes. Inulīna molekulā fruktoze ir saistīta ar  $\beta$ -2,1 saitēm. Levāns ir lineārs ( $\beta$ -2,6) – D-fruktofuranozil-polisaharīds ar vairākām fruktofuranozil atzarojuma vietām. (Vijn & Smeekens 1999).

Ķīmiski fruktānu molekulas var tikt aprakstītas ar vienkāršu formulu  $GF_n$  kur: G = glikozes vienības, F = fruktozes vienības, n = saistītās fruktozes vienības ( $n \geq 2$ ). Glikozes daļa ir pievienota ķēdes galam ar  $\alpha$ (1-2) saiti. Fruktānu grupa satur arī mazsvarīgāku daudzumu  $F_m$  ( $m \geq 2$ ), fruktānus, kuros nav glikozes beigu vienības, un dažādi sazaroto molekulu (Knudsen et al. 2000).

Aptuveni 45000 augstāko augu sugu no 10 dzimtām, izmanto fruktānus kā galveno rezerves oghidrātu ar lokalizāciju lapās, stublājos, saknēs, īpaši diferencētajos augu uzkrājēj-organos, tādus kā bumbuļi, sīpoli, sakneņi (Knudsen et al. 2000).

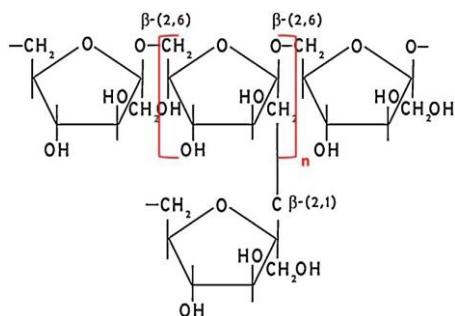
Galvenie komerciāli izmantojamie fruktāni ir inulīns (polimerizācijas pakāpe (DP) 3-60) un fruktooligosaharīdi (FOS) (ar DP 3-10) (Knudsen et al. 2000). Tie nav sagremojami cilvēka organismā, tādēļ ir pieskaitāmi pie šķiedrvielām vai "ne-cietes" polisaharīdiem. (Bender 2014).

Tomomatsu (1994) ir ziņojis par fruktānu kā prebiotiku priekšrocībām, norādot uz spēju palielināt resnajā zarnā *Lactobacillus* un *Bifidobacterium* baktēriju daudzumu, tādējādi nomācot pūšanas baktēriju aktivitāti un samazinot toksisko fermentācijas produktu daudzumu (Kang et al. 2009).

Fruktooligosaharīdu pievienošana galvenokārt palielina bifidobaktēriju skaitu, bet inulīna pievienošana izraisa *Lactobacillus* skaita palielināšanos. Līdztekus novērots, ka inulīnam piemīt lielāks bifidogēnais efekts nekā fruktooligosaharīdiem. Tādēļ inulīna tipa garo ķēžu fruktāniem, salīdzinot ar fruktooligosaharīdiem, ir labvēlīgāka ietekme uz cilvēka zarnu trakta dabiskās mikrofloras attīstību. Vislielāko prebiotisko efektu iespējams sasniegt izmantojot īsās un garās ķēdes fruktānu kombināciju, salīdzinot ar atsevišķu lielmolekulāro un mazmolekulāro fruktānu pielietojumu, t.i., to kombinācija ir fizioloģiski aktīvāka nekā atsevišķām frakcijām (van de Wiele et al. 2006).

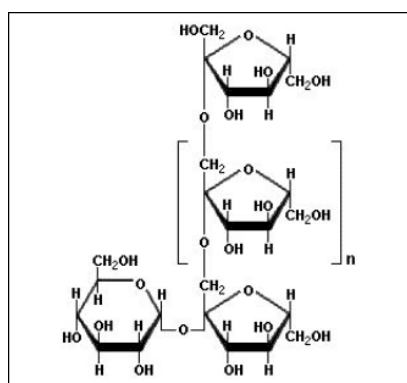
Fruktāni var tikt izmantoti rūpniecībā, lai ražotu bioloģiski noārdāmu plastmasu, kosmētiku, līmes, tekstila pārklājumus un mazgāšanas līdzekļus (Banguela & Hernandez 2006).

Jauni fruktānu paveidi, kurus būtu iespējams iegūt ar mazākām izmaksām vai ražot lielos daudzumos *in situ* no cilvēka pārtikā atļauto baktēriju celmiem, būtu nozīmīgi, lai aizvietotu pašreiz izmantojamās pārtikas piedevas, tādas kā ksantāns un guara sveķi (Jakob et al. 2012).



1.1 Attēls. Levāna struktūra (Srikanth et al. 2015).

Figure 1.1 Chemical structure of Levan (Srikanth et al. 2015).



1.2 attēls. Inulīna struktūra (Bosscher et al. 2009).

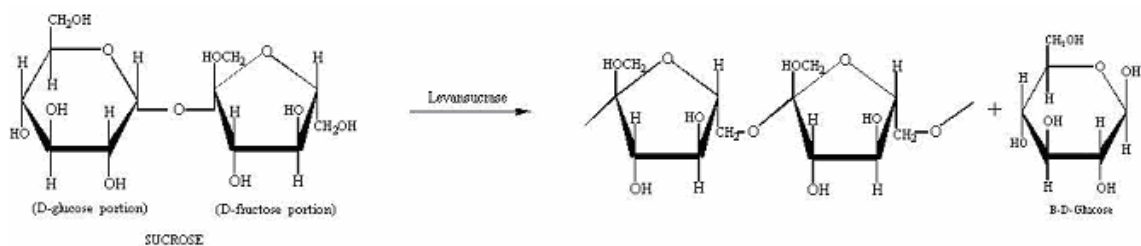
Figure 1.2 Chemical structure of inulin (Bosscher et al. 2009).

## 1.2. Levāns

Levānus sintezē plašs mikroorganismu klāsts arī neliels daudzums augu sugu, kuriem tie ir rezerves oglehidrāti. Baktērijās levāns ir ekstracelulāro polisaharīdu matricas daļa un tiem ir nozīmīga loma baktēriju bioplēves veidošanā. Tāpat tie var kalpot kā rezerves oglekļa avots (Franken et al. 2013).

Pēc literatūras datiem levānu sintezē daudzi mikroorganismi, tostarp *Acetobacter xylinum*, *Actinomyces naeslundii*, *Bacillus circulans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Lactobacillus reuteri*, *Rahnella aquatilis*, *Zymomonas mobilis* (Rhee et al. 2002).

Bakteriālo levānu sintezē ekstracelulārs enzīms levansaharāze (EC 2. 4. 1. 10) kura substrāts ir saharoze (1.3. attēls) (Vijn & Smeekens 1999, Srikanth et al. 2015).



1.3 attēls. Levāna sintēze no saharozes (Ghaly et al. 2007).

Figure 1.3 Synthesis of levan (Ghaly et al. 2007).

Levānu degradāciju nodrošina specifisks enzīms levanāze, kas iedalās endo-levanāzē (E.C. 3.2.1.65) un ekso-levanāzēs (E.C. 3.2.1.65). Ekso-levanāze hidrolizē levānu, kā arī levānbiozi. Endo-levanāze hidrolizē levānu un levāna oligomērus, kuri sastāv no vairāk kā trim fruktozes vienībām. Levāna molekulas tiek nejausā secībā sašķeltas īsas ķēdes fragmentos (Vijn & Smeekens 1999).

Levāns uzskatāms par potenciāli nozīmīgu un perspektīvu produktu medicīnā, pārtikas un ķīmiskajā rūpniecībā. To ir iespējams pielietot kā asins plazmas aizstājēju, imūnomodulātoru, farmaceitisko preparātu prolongātoru, arī kā izejvielu tīras fruktozes un FOS ieguvei (Kang et al., 1998). Pārtikas rūpniecībā levānu var izmantot, lai fiksētu produktu krāsu un garšu, arī kā produktu sabiezinātāju un stabilizētāju (Ernandes & Garcia-Cruz 2011).

Vairākos pētījumos ir pierādīta no *Microbacterium laevaniformans*, *Rahnella aquatilis* un *Zymomonas mobilis* iegūto levānu pretvēža aktivitāte *in vitro* pret dažādām vēža šūnu līnijām (Esawy et al. 2012).

Levānu iespējams izmantot kā imunostimulatoru pret zivju slimībām un nelabvēlīgiem vides apstākļiem (Rairakhwada et al. 2006).

Pētījumos ar žurkām ir pierādīts, ka levāns ir efektīvs hipoglikemizētājs un antioksidants šūnu oksidatīvā stresa un brīvo radikāļu mazināšanai. Tāpat levāns spēj samazināt kopējo holesterola un triglicerīdu daudzumu, kā arī mazā blīvuma lipoproteīnu holesterola daudzumu (Dahec et al. 2011; 2013).

Levāna nanodaļiņas var izmantot efektīvai zāļu pārnesei īpaši peptīdu un olbaltumvielu gadījumā (Sezer et al. 2011). To iespējams izmantot kā stabilizējošu un biosavienojamu mikroelementu nanodaļiņu pārklājuma aģentu. Ar levānu pārklātas kobalta nenodaļiņas var kalpot, kā oglekļa un šķīstoša kobalta avots resnās zarnas baktērijām *B. thetaiotaomicron* (Bondarenko et al. 2016).

Levāna termoplastiskās īpašības ļauj to viegli apstrādāt, izmantojot tradicionālās formēšanas un presēšanas metodes, tādēļ tas var gūt pielietojumu polimēru produktu ražošanā (Barone & Medynets 2007).

Levānu iespējams izmantot zelta un sudraba nanodaļiņu sintēzē, kas ir salīdzinoši vienkāršāka un videi draudzīgāka par tradicionālām metodēm (Ahmed et al. 2014).

Salīdzinot ar citiem mikroorganismu polisaharīdiem, levāns tikai salīdzinoši nesen ir kļuvis komerciāli, pieejams un tam ir plašas pielietojuma perspektīvas biotehnoloģijā. Levāna ražošanas izmaksas lielākoties ir atkarīgas no izmantotajiem izejmateriāliem. No ekonomiskā viedokļa būtu svarīgi pilnveidot levāna liela apjoma iegūšanas metodes, lai tas varētu konkurēt ar citiem fruktozes polisaharīdu veidiem, piemēram, augu izcelsmes inulīnu un FOS. Tāpat ir nepieciešami pilnveidot esošās un izstrādāt efektīvas levāna attīrīšanas metodes (Rhee et al. 2002).

Baktēriju sintezēto levānu rūpnieciskais pielietojums joprojām ir ierobežots, kas skaidrojams ar to augstajām iegūšanas izmaksām un komplicēto izstrādes procesu. Atrodot un pielietojot mikroorganismu kultūras ar augstu sintezēto levānu daudzumu, būtu iespējams samazināt ražošanas izmaksas. Tādēļ aktuāli ir pētījumi, lai atrastu mikroorganismu kultūras un to celmus ar augstu levāna sintēzes iznākumu. Tāpat tiek optimizēti kultivēšanas apstākļi jau zināmajām kultūrām. Levāna sintēzes intensificēšanai tiek pielietoti arī ģenētikas un metaboliskās inženierijas pētījumi un meklēti arī lētāki celmi un metodes, lai veicinātu iespējamus EPS pielietojumus dažādās nozarēs (Patel & Prajapati 2013).

Pašlaik nav pazīstamas specifiskas, precīzas un salīdzināsi viegli īstenojamas bakteriālo levānu noteikšanas metodes. Tādu metožu izstrāde būtu noderīga un vēlama, lai atvieglotu efektīvu producentu meklējumus, veicinātu levānu pētījumu un sekmētu efektīvu biotehnoloģiskā rūpniecības procesu kontroli. Pašlaik izmantotās levānu noteikšanas metodes minētas 1.3.2. nodaļā.

### **1.3.Fruktānu noteikšanas metodes**

#### **1.3.1. Inulīna kvantitatīvā analīze**

Inulīna tipa fruktānu daudzumu paraugos var noteikt ar spektroskopiskajām, enzimatiskajām, plānslāņu hromatogrāfiju, gāzes hromatogrāfiju, augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfiju (HPCL), infrasarkanā spektroskopiju (IS), <sup>1</sup>H kodolu magnētisko rezonansi (KMR) (Petkova & Denev 2015).

Spektroskopiskajās inulīna analīžu metodēs tiek mērīta krāsu kompleksu veidošanās intensitāte inulīna kondensācijas vai mijiedarbības ar rezorcīnu, vanilīnu vai indol-3-acetātu rezultātā skābā vidē. Augstais vides pH nodrošina inulīna hidrolīzi līdz monomēriem un reizē

kalpo kā kondensācijas aģents hromogēno savienojumu veidošanā ar fruktozi vai tās fragmentiem (Petkova & Denev 2015).

Fruktooligosaharīdu (ar DP no 2 līdz 10) noteikšanai pārtikas produktu un augu izcelsmes paraugos iespējams izmantot modificēto augstās temperatūras kapilāro gāzu hromatogrāfijas metodi (Joye & Hoebregs 2000).

Pārtikas produktos esošo inulīnu iespējams noteikt ar plānslāņu hromatogrāfiju, pirms tam pētāmos paraugus hidrolizējot 1 % skābeņskābē vāroša ūdens vannā (Simonovska 2000).

IS un KMR tiek veiksmīgi pielietotas inulīna identificēšanai un tā analīzei pārtikas un augu izcelsmes paraugos. IS metodē paraugi netiek bojāti, bet KMR identificēšanai izmanto deitērija oksīdā hidrolizētu inulīnu (Petkova & Denev 2015).

AOAC enzimatiskās metodes inulīna analizēšanai pārtikas produktos tika veiksmīgi ieviestas deviņdesmito gadu beigās. Šīs metodes balstās uz inulīna hidrolīzi ar ekso- un endo-inulināzēm un iegūto cukuru (glikozes, fruktozes) noteikšanu ar 3,5-dinitrosalicilskābi (Rocha et al. 2006), HPLC (Vendrell-Pascuas et al. 2000), augstas izšķirtspējas anjonu apmaiņas hromotogrāfiju ar impulsa amperometrisko noteikšanu (Prosky & Hoebregs 1999) vai p-oksi-benzoskābes hidrazīdu (PAHBAH) (McCleary & Blakeney 1999).

Pašlaik komerciāli pieejams Megazyme metožu kopums fruktānu noteikšanai (AOAC 999.03 un AACC 32.32), kas balstās uz ekso- un endo-inulināžu darbību un monomēru spektrometrisko noteikšanu.

Šajā metodē paraugi sākumā jāapstrādā ar saharāzes,  $\alpha$ -amilāzes, pullulanāzes un maltāzes enzīmu maisījumu, lai hidrolizētu saharozi par glikozi un fruktozi, un cieti par glikozi. Tālāk tos apstrādā ar nātrija borhidrīda šķīdumu cukuru reducēšanai līdz cukuru spirtiem. Šķīdums tiek neitralizēts, un pāri palikušais borhidrīds tiek aizvākts, pievienojot atšķaidītu etiķskābi.

(saharāze, pH 6.5, 40°C)

**(1) Saharoze + H<sub>2</sub>O → D-glikoze + D-fruktoze**

(pullulanāze,  $\beta$ -amilāze, maltāze, pH 6.5, 40°C)

**(2) Ciete + maltosaharīdi → D-glikoze**

(nātrija borhidrīds)

**(3) D-glikoze + D-fruktoze → D-sorbitols + D-mannitols + reducētie frukto-oligosaharīdi**

Tālāk paraugā esošie fruktāni ar inulināžu palīdzību tiek hidrolizēti līdz glikozei un fruktozei. Iegūtie cukuri tiek kolimetriski noteikti ar PAHBAH.

(pH 4,5, 40° C)

**(4) Fruktāni + H<sub>2</sub>O → D-glikoze + D-fruktoze**

(PAHBAH reaģents, 100°C, 6 min)

**(5) D-glikoze + D-fruktoze → PAHBAH krāsu komplekss**

Mazākā absorbcijas vērtība ir 0,010 absorbcijas vienības, kas atbilst 12,8 µg/L D-glikozei un D-fruktozei kopā atšķaidījumā. Mazākais nosakāmais D-glikozes + D-fruktozes daudzums paraugā ir 25,6 µg/L. Fruktānu daudzumu aprēķina izmantojot specializēto kalkulatoru Megazyme Inc. mājaslapā (<http://secure.megazyme.com/Fructan-Assay-Kit>).

### **1.3.2. Levāna kvantitatīvā analīze**

Bieži baktēriju sintezēto fruktānu kvantificēšanai šobrīd visplašāk izmanto gravimetrisko metodi, izgulsnējot levānu ar etanolu (attiecīgi, 1:3). Nogulsnes atdala centrifūgējot un žāvē līdz nemainīgam svaram (Abou-Taleb et al. 2015).

Tāpat bieži izdalītie levāni tiek hidrolizēti un iegūtā fruktoze analizēta ar kādu no cukuru noteikšanas metodēm, dalot iegūtos skaitļus ar 1,11, t.i., ar atbilstošo koeficientu pārejai no monosaharīdiem uz fruktozes polimēriem (Jathore et al. 2012). Levānu kvantitatīvu hidrolīzi var panākt inkubējot paraugus 3 stundas 0,1 mol/l HCl 90° C temperatūrā, vai vienu stundu 0,1 mol/l skābeņskābes 100° C temperatūrā (Muñoz Gutiérrez et al. 2009).

Levāna daudzuma noteikšanai analizējamajos paraugos var tikt izmantota plānslāņa hromatogrāfija, pirms tam veicot kalibrāciju ar standarta levānu dažādās koncentrācijās un pēc iegūtā vienādojuma aprēķinot pētāmo levānu daudzumu (Franken et al. 2013). Līdzīgi iespējams izmantot augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfiju (Ghaly et al. 2007).

### **1.4. Enzimātisko metožu izmantošana kvantitatīvajā analīzē**

Analītiskajām metodēm jābūt ar pēc iespējas augstāku specifiskumu, atkārtojamību un jutību, bet vienlaikus arī realizējams ar iespējami lētiem materiāliem, īsāku laiku un minimālu darbietilpību. Teorētiski lielākā daļa šo prasību ir vienkārši sasniedzamas ar enzimatiskajām metodēm. Enzimātisko metožu galvenās priekšrocības ir spēja specifiski mijiedarboties ar

konkrētu substrātu un tām ir nepieciešams mazs tā (mērāmā parauga) daudzums. Izmantojot enzimatiskās metodes bieži iespējams novērtēt ar citām metodēm grūti sasniedzamus lielumus (Pomeranz & Meloan 1994).

Enzimātisko reakciju augstais specifiskums ļauj noteikt atšķirīgas substrāta koncentrācijas neapstrādātos paraugos, piemēram, šūnu kultūršķidrums. Šajās metodēs ir svarīgi, lai reakcija notiktu līdz galam un rastos izmērāma starpība starp tās sākuma un beigu punktiem, lai tādējādi spētu noteikt pētāmā substrāta daudzums. Tādēļ nepieciešams, lai enzīmu reakcijas notiktu līdz galam, un vajadzīgs lielāks enzīmu daudzums, lai paātrinātu reakciju. Tāpat jābūt definētiem citiem apstākļiem, kas var ietekmēt enzīmu darbību – temperatūrai, pH un citu sastāvdaļu koncentrācijām. Sastāvdaļām, kuras ir iesaistītas katalītiskajās reakcijās, jābūt pārstāvētām lielākos daudzumos nekā paredzamajās koncentrācijās, kas nepieciešamas substrāta noteikšanai, pretējā gadījumā limitējošās sastāvdaļas ietekmēs rezultātus (Bisswanger 2014).

Enzimātisko reakciju produktu novērojumus visvienkāršāk ir veikt reakcijās, kurām produktu koncentrāciju var mērīt spektrofotometriski. Citas optiskās metodes ir fluorometrija un luminometrija. Tāpat to iespējams izdarīt ar elektroķīmiskajām metodēm, piemēram, pH izmaiņu mērīšanu (Bisswanger 2014).

Enzimātisko reakciju optimālo temperatūru galvenokārt ietekmē divi faktori – ķīmisko reakciju ātrums, kas paaugstinoties temperatūrai pieaug, un enzīma struktūras termojūtība, jo enzīmi pie augstākām temperatūrām ir pakļauti denaturācijai. Augstākās temperatūrās enzīmi ātrāk tiek denaturēti, tādēļ nav vienas noteiktas optimālās temperatūras un tā ir atkarīga no enzīmu priekšapstrādes un procesa garuma. Enzīmu aktivitāte pieaugums aprakstāms ar zvanveida funkciju – no nulles, pie zemākām temperatūrām, tā strauji pieaug, tuvojoties optimālajai temperatūrai un tad strauji samazinās attālinoties no tās un atkal sasniedzot nulli pie augstākām temperatūrām (Bisswanger 2014).

Enzīmu aktivitāte ir atkarīga arī no pH, kurš mainās līdzīgi kā temperatūras gadījumā.

Nozīmīga loma enzīmatiskajās metodēs ir buferiem, kas stabilizē un regulē nepieciešamo pH, substrātam, enzīmu spējai izmantot arī cita veida savienojumus kā substrātus, un reakciju kofaktoriem (Bisswanger 2014).

Augu izcelsmes fruktānu noteikšanai, kā minēts 1.3.1. nodaļā, pašlaik komerciāli pieejama Megazyme metode (AOAC 999.03/ AACC 32.32.), kuras darbība balstās uz to hidrolīzi ar inulināzēm un reducēto cukuru noteikšanu ar PAHBAH metodi.

## 1.5. Inulināzes

Inulīnu spēj hidrolizēt divu veidu inulināzes: ekso-inulināze ( $\beta$ -D-fruktanfruktohidrolāze, E.C. 3.2.1.80) un endo-inulināze (2-1- $\beta$ -D-fruktanfruktanohidrolāze, E.C. 3.2.1.7). Ekso-inulināze spēj sadalīt inulīna gala vienības saharozes un mazākas polimerizācijas inulīna molekulās, kā arī atbrīvo fruktozi. Endo-inulināze, savukārt, hidrolizē inulīnu sašķeļot saites starp fruktozes molekulām, kas atrodas tālāk no polimēru ķēdes galiem veidojot oligosaharīdus (1.4. attēls) (Baston & Neagu 2013).

Visbiežāk kā inulināžu avots tiek izmantoti raugi un sēnes, kurām enzīma produkcija ir augstāka, salīdzinot ar baktērijām. Vairāk kā 60 % pētījumu tiek izmantota sēņu izcelsmes inulināzes (Singh et al. 2017). Šobrīd visbiežāk izmantotie organismi inulināžu ieguvei ir *Kluyveromyces marxianus* un *Aspergillus niger* (Baston & Neagu 2013).

Nozīmīgākās atšķirības starp ekso- un endo-inulināžu struktūrām ir enzīmu katalītiskajā daļā. Ekso-inulināzei ir asparģīnskābes atlikums, bet endo-inulināzei tā vietā ir glutamīnskābes atlikums. Lielmolekulārā substrāta dēļ endo-inulināzes katalītiskā daļa ir salīdzinoši plata un aizņem 90 no 516 aminoskābju atlikumiem. Ekso-inulināzes aktīvais centrs, kas iedarbojas uz polimēra terminālajiem galiem, ir mazāks un ietver sevī 42 no 493 kopējām aminoskābēm (Basso et al. 2009).

Atkarībā no izcelsmes avota ekso-inulināzes reakcijas optimālā temperatūra ir no 25° C līdz 65°C. pH optimums ir robežās no 3,5 līdz 7. No *Aspergillus niger* iegūtai ekso-inulināzei optimālā temperatūra ir minēta 55° C un optimālais pH 4,5 (Anonīms 2017a).

Endo-inulināzei optimālā temperatūra ir no 30° C līdz 70° C, bet pH optimums no 4 līdz 7,5. *Aspergillus niger* gadījumā optimālā temperatūra ir no 37°C līdz 70°C un optimālais pH no 4 līdz 6 (Anonīms 2017b).

Atkarībā no inulināžu izcelsmes to molekulu masa ekso-inulināzei ir no 60 līdz 250 kDa, bet endo-inulināzei no 53 līdz 200 kDa (Anonīms 2017a, 2017b).

Inulināzei ir vairāki industriālie pielietojumi, tostarp fruktozes sīrupa iegūšanā no inulīna, bioetanolā ražošanā, inulo-oligosaharīdu iegūšanā, viensūņu – eļļas un viensūņu – proteīnu iegūšanā, dažādu ķīmikāliju iegūšanā, piemēram, citronskābes, alkohola, pienskābes (Baston & Neagu 2013).

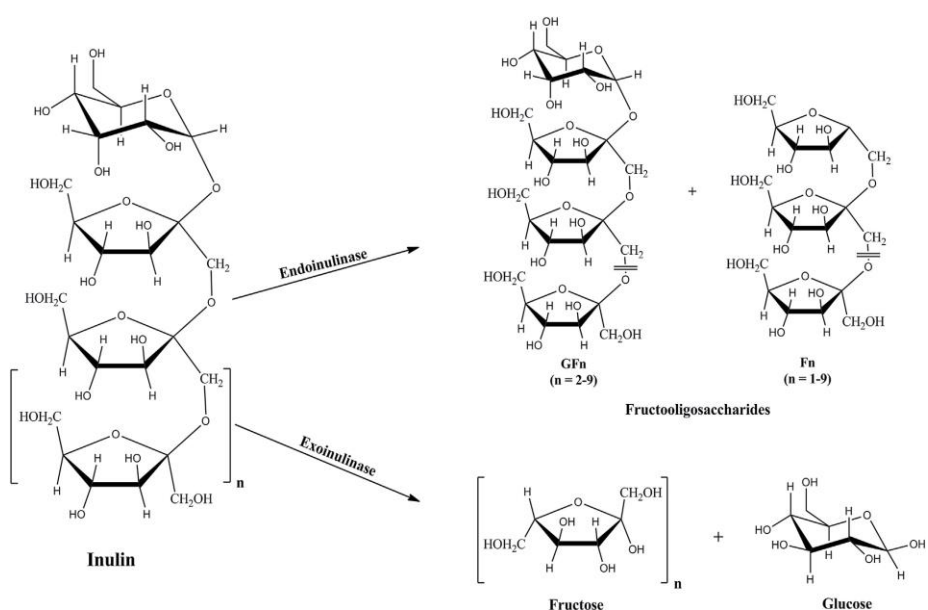
Ekso-inulināzes gadījumā nav novērojama enzīma inhibīcija ar reakcijas galaproduktiem – fruktozi. Endo-inulināzes gadījumā enzīma aktivitāti ietekmē inulo-oligosaharīdi, pie lielākām to koncentrācijām attiecīgi izzūd arī enzīmu aktivitāte (Liu et al. 2016).

Maisījumos, kas satur abus inulināžu veidus, endo-inulināzei ir nozīmīga loma inulīna polimēra polimerizācijas pakāpes samazināšanā un substrāta šķīdības palielināšanā. Tikmēr

ekso-inulināze samazināja endo-inulināzes produktu inhibīciju, efektīvi pārvēršot inhibitoros oligosaharīdus fruktozē (Liu et al. 2016).

Inulināzes nav absolūti substrāt specifiskas un tās spēj hidrolizēt ne tikai inulīna  $\beta$  2-1 saites, bet, vismaz principā, arī levāna  $\beta$  2-6 saites. Tāpat tās spēj izmantot arī saharozi kā substrātu, visos gadījumos atbrīvojot fruktozi kā galaproduktu (Nagem et al. 2004).

Pēc literatūras datiem, agrākajos gados ir bijis komerciāli pieejams Fructozyme L preparāts (Novozymes), kas spēja pietiekami efektīvi hidrolizēt dažāda veida fruktānus līdz fruktozei un tā sastāvu veidoja ekso- un endo-inulināžu maisījuma. To izmantojot, principā ir iespējama un tikusi sasniegta pilnīga fruktānu hidrolīze līdz monomēriem (Vigants et al. 2003, Munoz-Gutierrez et al. 2009). Šobrīd Fructozyme L ražošana ir pārtraukta.



1.4 attēls. Inulīna degradācija ar inulināzēm (Singh et al. 2017)

Figure 1.4 Degradation pattern of inulin by inulinases (Singh et al. 2017)

## 2. Materiāli un metodes

### 2.1. Levānu producējošā kultūra un kultivēšanas apstākļi

Darbā ir izmantota etiķskābes baktēriju kultūra: *Gluconobacter nephelii* P1464, kas uzglabāta LU MBI Tehniskās mikrobioloģijas un pārtikas biotehnoloģijas laboratorijas kultūru kolekcijā.

### 2.2. Barotne

Pētījumos izmantota Hestrin – Schramm (HS) barotne (Hestrin & Schramm 1954) ar sekojošām vielu koncentrācijām (g/l) – peptons 5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 12H<sub>2</sub>O 7,3, citronskābe 1,15 un MgSO<sub>4</sub> 0,5, saharoze 206 g/l, rauga ekstrakts 5,5 g/l. Barotnes sākotnējais pH 5,6.

Barotnes komponentes šķīdina destilētā H<sub>2</sub>O mērkolbās, tās uzpildot līdz atzīmei, pH regulējot ar koncentrētu HCl vai 1 M NaOH. Barotnes autoklavē divas reizes 30 min 0,5 atm.

### 2.3. Levāna producenta kultivēšana

Kultūras uzglabā sasaldētas ar 5% glicerīna piedevu saldētavā -20°C temperatūrā.

Sējmateriāla iegūšanai, tiek veikta kultūras aktivēšana, to iesējot mēģenēs ar HS barotni un audzējot 24 stundas.

Pēc kultūras aktivēšanas, to izmanto kā sējmateriālu tālākajos mēģinājumos (1% no tilpuma). Sējmateriāla daudzumu nepieciešamības gadījumā koriģē pēc kultūras suspensijas optiskā blīvuma (OD) rādītājiem. Kultūras audzē 24 h periodiskā procesā 100 ml kolbās ar 40 ml barotnes 30°C uz kratītāja ar 100 apgr/min.

### 2.4. Levāna izdalīšana un svara analīze

*Gluconobacter nephelii* P1464 kultūras šķidrumu centrifūgē 25 minūtes pie 4500 apgr/min, lai atdalītu šūnu biomasu. Noteiktam daudzumam iegūtā supernatanta pievieno trīs daļas atdzesēta etanola, lai izgulsnētu baktēriju sintezētos eksopolisaharīdus (EPS), kuri *G. Nephelii* P1464 gadījumā pārstāv fruktozes polisaharīdu levānu. Izgulsnēšanu atkārto trīs reizes, levāna paraugu šķīdinot destilētā ūdenī. Izgulsnēto levānu žāvē eksikatorā 37°C temperatūrā līdz nemainīgam svaram (apmēram 48 stundas). Izžāvētos paraugus nosver un levānu koncentrāciju aprēķina atbilstoši izgulsnētajam tilpumam (Abou-Taleb et al. 2015).

## 2.5. Laboratorijas trauki un mērierīces

Darbā izmantotie laboratorijas trauki un mērierīces:

Mērcilindri (50 ml, 100 ml)

Mēģenes (10 ml un 20 ml)

Vārglāzes (10 ml, 50 ml, 100 ml un 250 ml)

Automātiskās pipetes (0,002 - 5ml)

Mērkolbas (100 ml, 250 ml)

Koniskās kolbas ( 50 ml, 100 ml)

## 2.6. Vienreizējās lietošanas materiāli

2.1. Tabula. Vienreizējās lietošanas materiāli.

Table 2.1 Disposables.

Nosaukums	Ražotājs	Piegādātājs
Kivetes REF67.741 10x10x45 mm	Sarstedt; Aktiengesellschaft & Co; D-51588 Numbrecht, Vācija	Sarstedt pārstāvniecība Latvijā
Vienreizējās lietošanas pipetes 1 ml, 2 ml	Sarstedt; Aktiengesellschaft & Co; D-51588 Numbrecht, Vācija	Sarstedt pārstāvniecība Latvijā
Pipešu uzgaļi 5 – 1000 µm	Nuova APTACA, Itālija	SIA Santaks, Latvija
Centrifūgas mēģenes 1,5 ml; 50 ml	Nuova APTACA, Itālija	SIA Santaks, Latvija

2.2. Tabula Reaģenti un ķīmikālijas.

Table 2.2 Reagents and chemicals.

Reaģentu un ķīmikāliju nosaukumi	Ražotājs
Peptons	Sigma-Aldrich, ASV
Rauga ekstrakts	BBL Becton Dickinson and Company, ASV
Citronskābe	Sigma-Aldrich, ASV

Saharoze	Sigma-Aldrich, ASV
Nātrijs hidroksīds (NaOH)	Sigma-Aldrich, ASV
Etiķskābe (CH <sub>3</sub> COOH)	Sigma-Aldrich, ASV
Nātrijs borhidrīds (NaBH <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, ASV
Di-nātrijs fosfāts dodehidrāts (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 12H <sub>2</sub> O)	Реахим, PSRS
Amonija citrāts (C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	Реахим, PSRS
Mangāna(II) sulfāta monohidrīds (MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O)	Реахим, PSRS
3,5-dinitrosalicilskābe	Sigma-Aldrich, ASV
K-Na tartrāts	Enola, Latvija
Fruktānu noteikšanas komplekts (Fructans Assay Kit K-FRUC 5/2008 un K-FRUC 03/14)	Megazyme, Īrija
Glikozes/fruktozes noteikšanas komplekts (Sucrose, D-fructose and D-glucose K- SUFRC 06/14)	Megazyme, Īrija
<i>Erwinia herbicola</i> levāns	Sigma-Aldrich, ASV
Endo-inulināze	Sigma-Aldrich, ASV
Ekso-inulināze	Megazyme, Īrija

## 2.7. Laboratorijas iekārtas

Darbā izmantotās šādas laboratorijas iekārtas:

Svari d=0,01 g max 1500 g: *BOECO, Boeckel + Co*, Vācija

Spektrofotometrs: *Libra S22*, Apvienotā Karaliste

Centrifūga: *Hermel 2383 K*, Vācija

Termostats: *ТЕРМОСТАТ TC-80M-2*, PSRS

Sildvanna: *Shimadzu TB-85*, Japāna

pH-metrs: *Microprocessor pH Meter pH211, HANNA instruments*, Rumānija

Maisītājs: *Vortex Mikrospin FV-2400, BioSan*, Latvija

Ledusskapis: *Samsung Silver Nano*, Korejas Republika

Kratītājs – *Enviromental shaker ES-20, BioSan*, Latvija

## 2.8. Analītiskās metodes

### 2.8.1. Šūnu biomasas noteikšana

Šūnu suspensijas optiskais blīvums (OD) raksturo biomasas koncentrāciju šķidrumā. To nosaka spektrofotometriski (*Libra S22, Apvienotā Karaliste*). Šūnu suspensiju gatavo ņemot noteiktu daudzumu kultūras šķidruma, kas satur mikroorganismu šūnas un izvēloties atšķaidījumu tā, lai OD rādījumi būtu 0,1 – 0,5 vienību diapazonā. OD mēra pie 550 nm pret destilētu ūdeni. Biomasas koncentrāciju (X) aprēķina pēc vienādojuma  $X \text{ (g/l)} = 0,19 * OD$ , ņemot vērā izmantoto atšķaidījumu.

### 2.8.2. pH noteikšana

5 – 10 ml vārglāzē ielej 5 ml pētāmā šķidruma un ievieto pH-metra elektrodu, lai tas nepieskartos glāzītes sienai. Mērījumus nolasa pēc 10 sekundēm. Pēc katra mēģinājuma elektrodu noskalo ar destilētu ūdeni un nosusina. pH mērīšanu veic ar pH-metru *Microprocessor pH Meter pH211*.

### 2.8.3. Fruktānu noteikšana

Inulīna un bakteriālā levāna noteikšanai izmanto K-SURFG (Megazyme International., Īrija) specifisko enzīmu kompleksu (<http://secure.megazyme.com/Fructan-Assay-Kit>).

Bakteriālais levāns tiek noteikts gravimetriski (Abou-Taleb et al. 2015).

### 2.8.4. Reducējošo cukuru noteikšana ar DNS metodi

Reducējošo cukuru noteikšanai izmantota 3,5-dinitrosalicil skābes (DNS) metode (Miller 1959):

0,5 ml pētāmajam paraugam pievieno 2 ml DNS reaģenta un to karsē 8 minūtes 100° C. Paraugus atdzesē līdz istabas temperatūrai un to absorbciju mēra pie 570 nm pret kontroli, kurā parauga vietā ir destilēts ūdens.

**3,5-dinitrosalicilskābe + reducējošie cukuri → 3-amino-5-nitro salicilskābe**

DNS reakcijai izveidots kalibrācijas vienādojums. Trīs paralēlās tika noteikti fruktozes standartšķīdumu koncentrācijas robežās no 0,1 mg/l līdz 2 mg/l. No iegūtajiem rezultātiem, izmantojot *Microsoft Excel 2016*, aprēķinātais kalibrācijas vienādojums ir:

$$\text{Cukuri (g/l)} = 2,9496 * \text{absorbciija} + 0,0782$$

Mazākā absorbcijas vērtība ir 0,010 absorbcijas vienības, kas atbilst 0,1 g/l.

### 2.8.5. Cukuru noteikšana ar Megazyme specifisko enzīmu komplektu (K-SURFG 06/14)

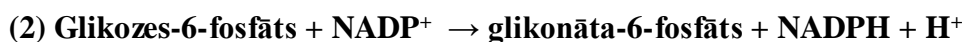
Cukuru noteikšanai izmantots Megazyme specifiskais enzīmu komplekss (<http://secure.megazyme.com/Sucrose-Fructose-D-Glucose-Assay-Kit>).

#### **Glikozes noteikšana.**

(heksokināze)



(Glikozes-6-fosfāta dehidrogenāze)



Izveidojušais NADPH daudzums ir stehiometriski vienāds ar glikozes daudzumu un tiek mērīts spektrofotometriski pie 340 nm.

#### **Fruktozes noteikšana.**

(heksokināze)



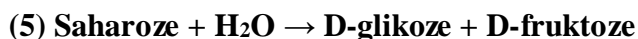
(fosfoglikozes izomerāze)



G-6-P reaģē ar NADP<sup>+</sup> veidojot glikonāta-6-fosfātu un NADPH, kas ir stehiometriski vienāds ar fruktozes daudzumu un tiek mērīts spektrofotometriski pie 340 nm.

#### **Saharozes noteikšana.**

(β-fruktozidāze)



Glikozes daudzumu pēc saharozes hidrolīzes (kopējā glikoze) nosaka tāpat, kā aprakstīts iepriekš.

Pēc absorbciju iegūšanas, rezultāti tiek aprēķināti ar Megazyme aprēķinu kalkulatoru (<http://secure.megazyme.com/Sucrose-Fructose-D-Glucose-Assay-Kit>).

Mazākā absorbcijas vērtība ir 0,010 absorbcijas vienības, kas atbilst 0,69 mg/l parauga atšķaidījumā. Mazākais nosakāmais cukuru daudzums ir 1,38 mg/l.

## 2.9. Eksperimenta plānošana un datu apstrāde

Pētāmo faktoru ietekmes izvērtēšanai izmanto pilnus  $3^2$  (divi faktori trīs līmeņos) faktoreksperimentus (Semjonovs et al. 2016).

Datu apstrādei, aprēķiniem, tabulu un grafiku veidošanai izmanto datorprogrammu *Microsoft Excel 2016* un *STATGRAPHICS Centurion XVII*.

Daudzfaktoru regresijas analīze tiek izmantota, lai noskaidrotu sakarības starp atkarīgo mainīgo un vairākiem neatkarīgiem faktoriem, kā arī lai prognozētu atkarīgo mainīgo izmaiņas pie atšķirīgiem faktoru līmeņiem.

No iegūtajiem rezultātiem tiek veidoti daudzfaktoru lineārās/kvadrātiskās regresijas modeļi, lai aprakstītu temperatūras, laika, enzīmu daudzuma ietekmi uz fruktānu hidrolīzi (*STATGRAPHICS Centurion XVII*).

## 2.10. Metodes validācija

Pēc metodes izstrādes nepieciešama tās pareizības pārbaude un validācija. Metodi pārbauda analizējot standartšķīdumus, kuri satur zināmu daudzumu levāna standarta (*Erwinia herbicola* L8647, Sigma-Aldrich) dažādās koncentrācijās. Mērījumus veic vismaz divos atkārtojumos. Rezultātus izsaka kā mērījumu vidējo aritmētisko  $\pm$  standartkļūda ( $S = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ ).

Metodi pārbauda arī uz kultūršķīdumiem, kas satur levānus un rezultāti līdzīgā veidā tiek salīdzināti ar svāra analīzē iegūtajiem.

Papildus tam metodes validācijai tiek izmantota standartpiedevu metode. Šķīdumiem ar nezināmas koncentrācijas paraugu tiek pievienoti iepriekš zināmas koncentrācijas levāna standartšķīdums dažādos daudzumos vismaz divās paralēlēs. Pēc tam izmantojot pētāmo metodi visiem šķīdumiem tiek noteiktas to koncentrācijas. Starpībai starp šķīdumos noteiktajām koncentrācijām jāatbilst pievienoto standartšķīdumu koncentrāciju starpībām (Harvey 2008).

### 3. Rezultāti

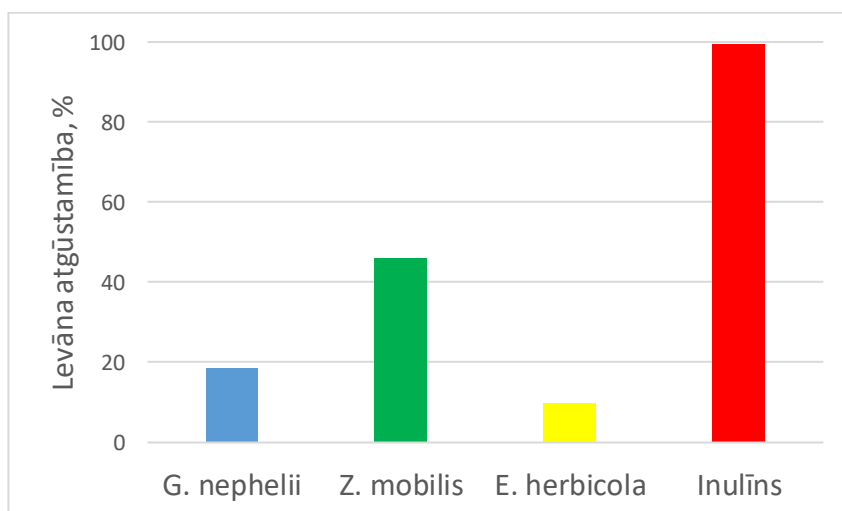
#### 3.1. Bakteriālo levānu noteikšana ar Megazyme enzimatisko fruktānu noteikšanas metodi

Izmantojot Megazyme specifisko enzīmu komplektu fruktānu kvantitatīvai noteikšanai tika analizēti trīs dažādu baktēriju (*Gluconobacter naphelii*, *Zymomonas mobilis*, *Erwinia herbicola*) sintezēto levānu un pašā komplektā iekļautā inulīna standartšķīdumi. Izmantoti specifiskā enzīmu komplektā definētie standarta apstākļi un enzīmu koncentrācijas (<http://secure.megazyme.com/Fructan-Assay-Kit>). Rezultāti apkopoti 1. attēlā.

Izmantots Megazyme enzīmu komplekts (K-FRUC 5/2008), kuram definētie standarta apstākļi fruktānu hidrolīzei nosaka reakcijas laiku 20 min, 40°C temperatūra izmantojot 0,1 ml enīmu maisījuma, kas satur 45,5 U ekso-inulināzes (Eksol) un 0,45 U endo-inulināzes (EndoI). Tika izmantoti standartšķīdumi ar sekojošām levāna koncentrācijām: *G. naphelii* 22,38 g/l, *Z. mobilis* 24,22g/l, *E. herbicola* 20,3 g/l, inulīns 20,92 g/l.

3.1 Attēls. Fruktānu atgūstamība standart apstākļos izmantojot Megazyme inulināžu komplektu.

Figure 3.1 Recovery of fructans using inulinases of the Megazyme kit under standard conditions.



Kā redzams attēlā, inulīna atgūstamība salīdzinājumā ar ievadītajiem daudzumiem ir ļoti tuva 100 %, bet levānu paraugu gadījumā to atgūstamība ir mazāka par 50 % no ievadītā daudzuma. Tas norāda, ka Megazyme komplektam definētie reakcijas apstākļi, tostarp inulināžu daudzumi, nevar nodrošināt bakteriālo levānu kvantitatīvo analīzi. Tādēļ pārbaudījām

vai ilgāks enzīmātisko reakciju laiks un palielināta inulināžu daudzuma izmantošana veicina bakteriālo levānu kvantitatīvu hidrolīzi.

### 3.2. Megazyme komplekta optimizācijas iespējas bakteriālo levānu hidrolīzei

#### 3.2.1. Megazyme komplekta inulināžu daudzuma un reakcijas laika ietekme uz bakteriālo levānu hidrolīzi

Lai izvērtētu enzīmu daudzuma un laika ietekmi, tika veikts  $3^2$  faktoreksperiments ar 2 faktoriem 3 līmeņos, kopā veidojot 9 dažādas faktoru kombinācijas. Izmantots *G. nephelii* P1464 levāna standartšķīdums 20,39 g/l un nemainīga temperatūra 40° C, un Megazyme K-FRUC 5/2008 inulināžu komplekts. Visi mēģinājumi tika veikti vismaz divos atkārtojumos, 3.1. tabulā pārstāvētas levāna atgūstamības vidējās vērtības un to standartklūdas.

3.1. Tabula. Faktoru līmeņi (kodētās vērtības) un eksperimenta atsauces.

Table 3.1 Factor levels (coded values) and the responses of experiment.

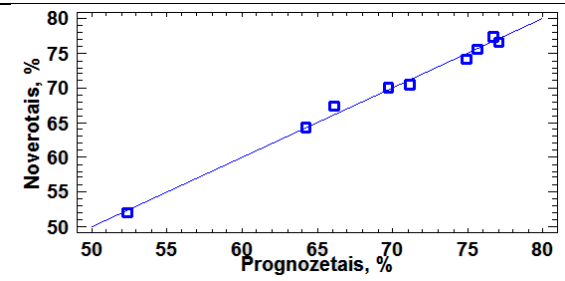
Variants	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Enzimātiski noteiktā koncentrācija g/l	Atgūstamība %
1.	-1	-1	10,59 ± 0,04	51,94 ± 0,19
2.	-1	0	13,73 ± 0,36	67,34 ± 1,75
3.	-1	1	14,34 ± 0	70,34 ± 0
4.	0	-1	13,11 ± 0,44	64,31 ± 2,14
5.	0	0	15,11 ± 0,16	74,09 ± 0,78
6.	0	1	15,78 ± 0	77,39 ± 0
7.	1	-1	14,29 ± 0,39	70,07 ± 1,93
8.	1	0	15,61 ± 0	76,56 ± 0
9.	1	1	15,43 ± 0,12	75,65 ± 0,58

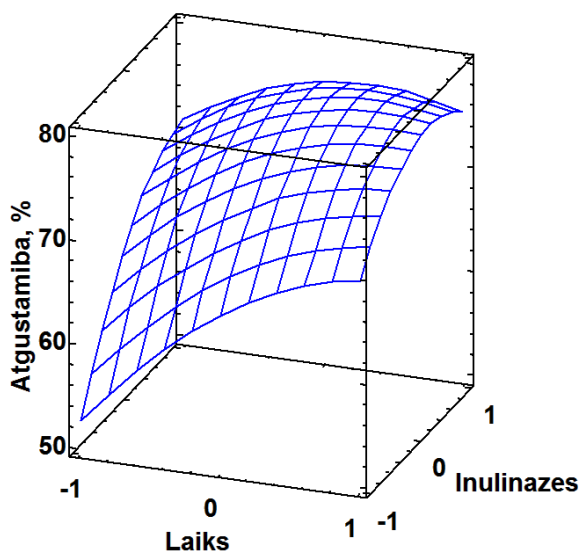
- X<sub>1</sub> – laiks (min): -1 = 40; 0 = 60; +1 = 80
- X<sub>2</sub> – ekso-/endo-inulināžu daudzums (U): -1 = 91/9; 0 = 136/13,5; +1 = 182/18

No iegūtajiem rezultātiem tika izveidots daudzfaktoru otrās kārtas regresijas modelis, kurš apraksta bakteriālā levāna atgūstamības atkarību no enzimatiskās hidrolīzes laika (X, min) un inulināžu daudzuma (Y, U). Pēc iegūtajiem regresijas koeficientiem redzams, ka uz levāna hidrolīzi abiem faktoriem ir vienlīdz liela ietekme. Ir vērojama būtiska abu faktoru mijiedarbība, kur inulināžu daudzuma ietekme uz levāna atgūstamību ir tuvāka lineārai sakarībai un ir izteiktāka pie īsāka hidrolīzes laika. Kā norāda determinācijas koeficients (R<sup>2</sup>), modelis levānu hidrolīzei „izskaidro” gandrīz visu (98,03%) eksperimenta atsauču dispersiju un p<0,0021 norāda uz to, ka tas ir ticams.

3.2. Tabula. Daudzfaktoru regresijas modelis, kas apraksta atgūtā levāna daudzumu.

Table 3.2 Multivariate regression model, which describes the amount of recovered levan.

Modelis	Daudzfaktoru regresija	Lineārā sakarība starp novērotajiem un modeļa prognozētajiem rezultātiem
I	$\text{Atgūstamība}(\%) = 0,7485 + 0,0544 * X + 0,0618 * Y - 0,0328 * X^2 - 0,0438 * Y^2 - 0,0321 * X * Y$ <p> <b>R</b> = 0,9926  <b>R<sup>2</sup></b> = 98,0296 %  <b>p</b> = 0,0021  <b>F</b> = 80,60                 </p>	



3.2. Attēls. Bakteriāla levāna atgūstamība atkarībā no hidrolīzes laika un inulināžu daudzuma.

Figure 3.2 Recovery of bacterial levan upon the hydrolysis time and the amount of inulinases.

Atsauces virsmai (3.2. attēls) ir maksimums, kura vērtības atrastas izmantojot tiešsaistes kalkulatoru (<https://www.wolframalpha.com>). Tas norāda, ka dotajā apstākļu diapazonā maksimāli iespējamo levāna hidrolīzi iespējams sasniegt pie  $X=73.98$  min (74min) un  $Y=0.337$ ml (0.34 ml) (ekso – 154,56 U/ endo – 1,55 U).

### 3.2.2. Levāna kvantitatīvās noteikšanas iespējas izmantojot optimizēto hidrolīzes laiku un inulināžu daudzumus

Izmantojot atsauces virsmas maksimumam atbilstošos optimizētos parametrus tika analizēti standartšķīdumi, kas gatavoti no *G. nephelii* vai *E. herbicola* levāniem, lai noteiktu maksimāli atgūstamo levānu kvantitatīvo daudzumu pie izmainītajiem enzimatiskās hidrolīzes apstākļiem (laiks – 74 min, inulināžu daudzums – 0,34 ml (EksoI – 154,56 U/ EndoI – 1,55 U)). Rezultāti pārstāvēti 3.3. tabulā.

3.3. Tabula. Bakteriālo levānu atgūstamība izmainītajos hidrolīzes apstākļiem

Table 3.3 Recovery of bacterial levam under changed hydrolysis conditions.

Levāns	Koncentrācija paraugā, g/l	Enzimātiski noteiktā koncentrācija g/l	Atgūstamība %
<i>G. nephelii</i>	20,39	16,05 ± 0,52	78,69 ± 2,53
<i>E. herbicola</i>	20,10	14,67 ± 0,28	72,98 ± 1,38

Pēc tabulas datiem jāsecina, ka arī šādi mainītajos hidrolīzes apstākļos, izmantojot Megazyme komplekta inulināzes, nav iespējams sasniegt atgūstamību augstāku par 78,69% no ievadītās koncentrācijas *G. nephelii* levānam, bet *E. herbicola* levāna gadījumā tā bija vēl mazāka (72,98%), kas nav pietiekama, lai nodrošinātu bakteriālo levānu kvantitatīvu enzimatisko noteikšanu.

### 3.2.3. Temperatūras un inulināžu daudzuma ietekme uz bakteriālo levānu hidrolīzi

Ir labi zināms, ka temperatūra var būtiski ietekmēt enzimatisko reakciju ātrumu, pie tam inulināzes ir salīdzinoši termotoleranti enzīmi un ir iespējama temperatūras pozitīva ietekme uz bakteriālo levānu hidrolīzi (Bisswanger 2014). Tādēļ, lai noteiktu temperatūras ietekmi uz inulināžu aktivitāti, tika veikts 3<sup>2</sup> faktoreksperiments faktoru kombinācijām veidojot 9 variantus (3.4. tabula). Tika pārbaudītas trīs dažādas inkubācijas temperatūras (40°C, 50°C, 60°C) un trīs dažādi enzīmu daudzumi (0,2, 0,3, 0,4 ml). Levāna standartšķīduma koncentrācija 19,84 g/l, fiksētais inkubācijas laiks - 30 min, izmantots Megazyme K-FRUC 03/14 enzīmu komplekts.

3.4. Tabula. Faktoru līmeņi (kodētās vērtības) un eksperimenta atsaucis.

Table 3.4 Factor levels (coded values) and the responses of experiment.

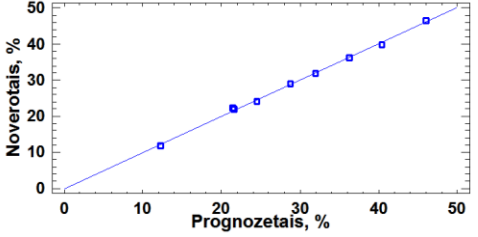
Variants	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Enzimātiski noteiktā koncentrācija g/l	Atgūstamība %
1.	-1	-1	2,34 ± 0,18	11,8 ± 0,91
2.	-1	0	4,42 ± 0,07	22,3 ± 0,37
3.	-1	1	4,80 ± 0,18	24,2 ± 0,91
4.	0	-1	4,34 ± 0,04	21,9 ± 0,19
5.	0	0	6,33 ± 0,19	31,9 ± 0,96
6.	0	1	7,16 ± 0	36,1 ± 0
7.	1	-1	5,75 ± 0,04	29,0 ± 0,19
8.	1	0	7,88 ± 0,27	39,7 ± 1,36
9.	1	1	9,21 ± 0,15	46,4 ± 0,78

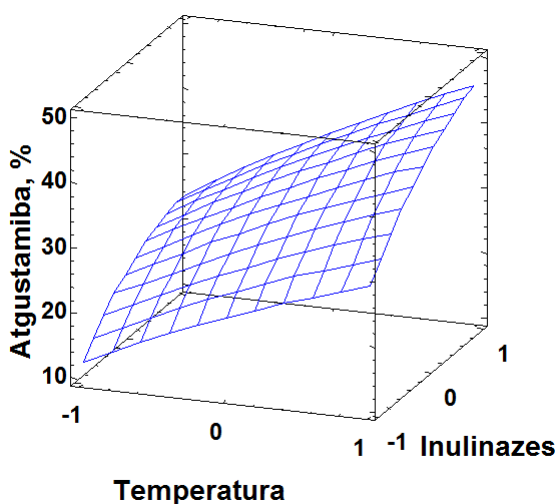
- X<sub>1</sub> – hidrolīzes temperatūra (°C): -1 = 40; 0 = 50; +1 = 60
- X<sub>2</sub> – Megazyme komplekta ekso-/endo-inulināžu daudzums (ml): -1 = 0,2; 0 = 0,3; +1 = 0,4

Iegūtos rezultātus apraksta daudzfaktoru otrās kārtas regresijas modelis, kas saista levāna atgūstamību ar reakcijas temperatūru (X, °C), un inulināžu daudzumu (Y, ml). Kā norāda iegūtie regresijas koeficienti temperatūrai ir nedaudz lielāka ietekme uz levāna hidrolīzi nekā inulināžu daudzumam. Faktoru kvadrātiskie efekti, tāpat arī to mijiedarbība ir salīdzinoši neliela. Pēc R<sup>2</sup> redzams, modelis „izskaidro” gandrīz visas (99,43%) eksperimenta atsaucju dispersiju un p<0,0026 norāda uz to, ka tas ir statistiski ticams.

3.5. Tabula. Daudzfaktoru regresijas modelis, kas apraksta bakteriālo levānu atgūstamību atarībā no hidrolīzes temperatūras un inulināžu daudzuma.

Table 3.5 Multivariate regression model describing recovery of bacterial levan upon hydrolysis temperature and amount of inulinases.

Modelis	Daudzfaktoru regresijas modelis	Lineārā sakarība starp novērotajiem un modeļu prognozētajiem rezultātiem
II	$\text{Atgūstamība}(\%) = 0,3200 + 0,0949 * X + 0,0735 * Y - 0,0106 * X^2 - 0,0306 * Y^2 + 0,0126 * X * Y$ $R = 0,9979$ $R^2 = 99,4321\%$ $p = 0,0003$ $F = 281,12$	



3.3. Attēls. Bakteriālā levāna atgūstamība atkarībā no hidrolīzes temperatūras un inulināžu daudzuma.

Figure 3.3 Recovery of bacterial levan upon the hydrolysis temperature and the amount of inulinase.

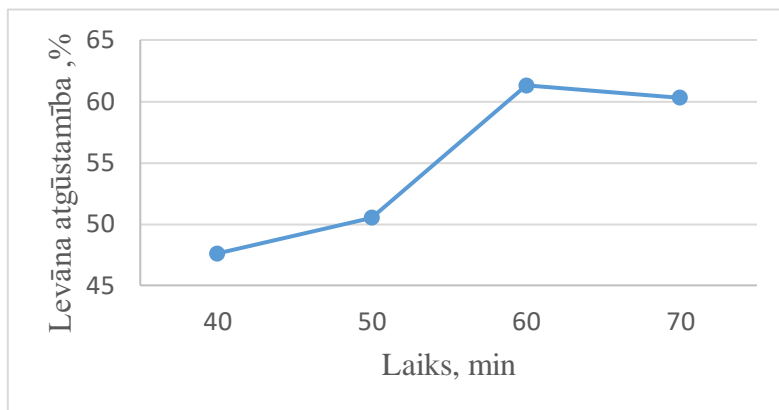
### 3.2.4. Reakcijas laika ietekme ietekme uz levāna hidrolīzi paaugstinātā temperatūrā

Jau minējām, ka pēc literatūras datiem ekso- un endo-inulināzes ir salīdzinoši termotolerantas, t.i., spēj darboties augstākās temperatūrās, salīdzinot ar Megazyme komplektam definētajiem 40°C. Tādēļ, lai novērtētu šī inulināžu maisījuma aktivitāti un

noturību, pārbaudīta laika ietekme izmantojot 4 inkubācijas laikus (40-70 min) pie fiksētas paaugstinātas temperatūras 55° C. Izmantota 25,17 g/l levāna koncentrācija, 55°C temperatūra un 0,3 ml ekso-/endo-inulināžu maisījums.

3.4. Attēls. Laika ietekme uz bakteriālā levāna hidrolīzi fiksētā 55°C temperatūrā.

Figure 3.4 Time effect on the hydrolysis of bacterial levan at fixed temperature 55°C.



Labākais rezultāts tika saniegts inkubējot paraugus 60 min, bet pat tad ievadītā levāna atgūstamība tikai nedaudz pārsniedza 60 %.

Jāsecina, ka izmantojot Megazyme fruktānu noteikšanas komplektā iekļautās inulināzes arī modificētos/optimizētos enzimatiskās reakcijas apstākļos nav iespējama pilnīga bakteriālā levāna hidrolīze, tātad arī tā kvantitatīvā noteikšana.

### 3.2.5. Atšķirīgu Megazyme inulināžu komplektu ietekme uz bakteriālo levānu hidrolīzi

Vienas izcelsmes bakteriālo levānu standartšķīdumu hidrolīzei izmantojot atšķirīgas Megazyme komplektu (K-FRUC 5/2008; K-FRUC 03/14) inulināzes, atkārtoti novērojām būtiski atšķirīgu levāna atgūstamību. To apstiprina 3.6. tabulas dati, kur hidrolīze ar it kā „jaunākās” Megazyme modifikācijas (K-FRUC 03/14) inulināzēm uzrāda pat ievērojami zemāku (28,8%) atgūstamību salīdzinot ar K-FRUC 5/2008.

Savukārt abas minētās Megazyme komplektu modifikācijas spēj vienlīdz kvantitatīvi hidrolizēt inulīnu. Jāmin, ka K-FRUC 03/14 no K-FRUC 5/2008 atšķiras ar to, ka tajā izmantotas rekombinantās inulināzes, turklāt metodes protokolā tās nav raksturotas ar aktivitātes vienībām. Abām modifikācijām definētie analīzes soļi, reakciju apstākļi un izmantojamie reaktīvi ir palikuši nemainīgi.

3.6. Tabula. Megazyme K-FRUC 5/2008 un K-FRUC 03/14 komplektu modifikāciju salīdzinājums fruktānu hidrolīzē.

Table 3.6 Comparison of modified Megazyme K-FRUC 5/2008 and K-FRUC 03/14 kits in fructan hydrolysis.

<b>Fruktāns</b>	<b>Koncentrācija paraugā g/l</b>	<b>Koncentrācija hidrolizējot ar K-FRUC 5/2008 g/l</b>	<b>Koncentrācija hidrolizējot ar K-FRUC 03/14 g/l</b>
<i>G. nephelii</i> levāns	19,84	11,02 ± 0,12	5,72 ± 0,06
Megazyme inulīns	10,46	10,78 ± 0,20	11,12 ± 0,22

Jāsecina, ka abos gadījumos bakteriālā levāna atgūstamība, tātad tā enzimatiskā hidrolīze, neatbilst kvantitatīvās analīzes nosacījumiem. Turklāt novērotās atšķirības rada arī būtiskus metodiskus sarežģījumus jebkura Megazyme inulināžu komplekta tiešam pielietojumam bakteriālo levānu analīzē. Tādēļ varētu būt lietderīgi arī citu komerciāli pieejamu endo- un ekso-inulināžu aktivitātes novērtējums to izmantošanai bakteriālo levānu hidrolīzei.

### 3.3. Komerčiāli pieejamo inulināžu ietekme uz levānu hidrolīzi

Turpmākajos pētījumos tika pārbaudītas šobrīd komerciāli pieejamās endo- (I6285, Sigma-Aldrich) un ekso-inulināzes (E-EXOIAN, Megazyme).

#### 3.3.1. Endo-inulināzes daudzuma un hidrolīzes laika ietekme uz bakteriālā levāna hidrolīzi

Lai izvērtētu endo-inulināzes daudzuma un reakcijas laika ietekmi uz levānu hidrolīzi tika veikts  $3^2$  faktoreksperiments. Kopējais variantu skaits – 9. Temperatūra tika saglabāta  $40^\circ\text{C}$ , izmantots 9,92 g/l *G. nephelii* levāna standartšķīdums. Endo-inulināzes aktivitāte noteikta pēc hidrolīzes rezultātā izveidoto reducējošo cukuru atlikumiem, t.i., iegūtajiem spektrofotometriskās absorbcijas (570 nm) rādītājiem DNS reakcijā. Rezultāti pārstāvēti 3.7. tabulā.

3.7. Tabula. Faktoru līmeņi (kodētās vērtības) un eksperimenta atsaucis.

Table 3.7 Factor levels (coded values) and the responses of experiment.

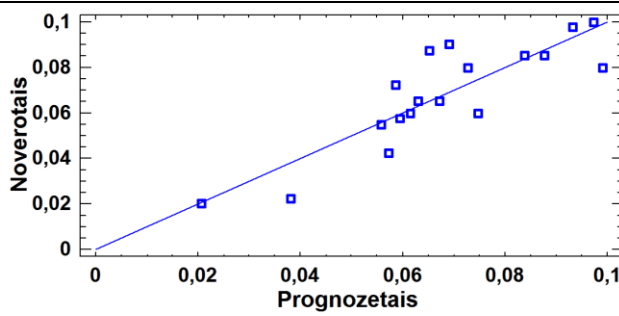
Variants	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Absorbcija 570 nm
1.	-1	-1	0,110 ± 0,001
2.	-1	0	0,065 ± 0,004
3.	-1	1	0,065 ± 0,003
4.	0	-1	0,120 ± 0,001
5.	0	0	0,070 ± 0
6.	0	1	0,095 ± 0,006
7.	1	-1	0,045 ± 0,003
8.	1	0	0,110 ± 0,001
9.	1	1	0,120 ± 0,003

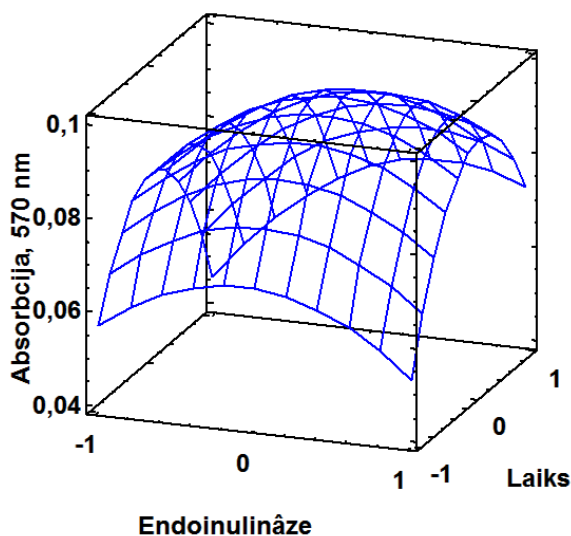
- X<sub>1</sub> – laiks (min): -1 = 15; 0 = 25; +1 = 35
- X<sub>2</sub> – endo-inulināzes daudzums (U): -1 = 15; 0 = 22,5; +1 = 30

No iegūtajiem rezultātiem tika izveidots daudzfaktoru otrās kārtas regresijas modelis, kurš apraksta bakteriālo levānu hidrolīzes atkarību no enzimatiskās hidrolīzes laika (X, min) un endo-inulināzes daudzuma (Y, U). Pēc iegūtajiem regresijas koeficientiem redzams, ka vislielākā ietekme ir endo-inulināzes daudzumam. Tāpat ir vērojama būtiska abu faktoru mijiedarbība. Kā norāda R<sup>2</sup>, levāna hidrolīzi aprakstošais modelis „izskaidro” lielāko daļu (64,44%) no eksperimenta atsauču dispersijas un  $p < 0,0026$  norāda uz to, ka tas ir ticams.

3.8. Tabula. Daudzfaktoru regresijas modelis, kas apraksta levāna atgūstamību atkarībā no endo-inulināzes un laika

Table 3.8 Multivariate regression model describing recovered levān depending on endo-inulinase and time

Modelis	Daudzfaktoru regresija	Lineārā sakarība starp novērotajiem un modeļu prognozētajiem rezultātiem
III	$\text{Absorbciija}(570\text{nm}) = 0,0990 + 0,0028 * Y + 0,0056 * X - 0,0279 * Y^2 - 0,0138 * X^2 + 0,0077 * Y * X$ $R = 0,749$ $R^2 = 64,441 \%$ $p = 0,0026$ $F = 7,16$	



3.5. Attēls. Absorbciija pie 570 nm atkarībā no endo-inulināzes daudzuma un inkubācijas laika.  
Figure 3.5 Absorption at 570 nm depending on endo-inulinase amount and incubation time.

Atsauces virsmai (3.5. attēls) ir maksimums, kura vērtības atrastas izmantojot tiešsaistes kalkulatoru (<https://www.wolframalpha.com>). Tas norāda, ka dotajā apstākļu diapazonā maksimālā iespējamā absorbciija pie 570 nm iespējams sasniegt pie un  $X=25,8$  min un  $Y=24,18U$ .

### 3.3.2. Dažādu ekso- un endo-inulināžu daudzumu ietekme uz levānu hidrolīzi

Lai izvērtētu ekso- un endo-inulināžu daudzumu vienlaicīgu izmaiņu ietekmi uz levāna hidrolīzi, tika veikts  $3^2$  faktoreksperiments, kopā veidojot 9 dažādas faktoru kombinācijas. Pārējie faktori: laiks 35 min, temperatūra  $40^\circ\text{C}$ , *G. nephelii* levāna standartšķīdums 19,8 g/l. Dati pārstāvēti 3.9. tabulā.

3.9. Tabula. Faktoru līmeņi (kodētās vērtības) un eksperimenta atsaucis.

Table 3.9 Factor levels (coded values) and the responses of experiment.

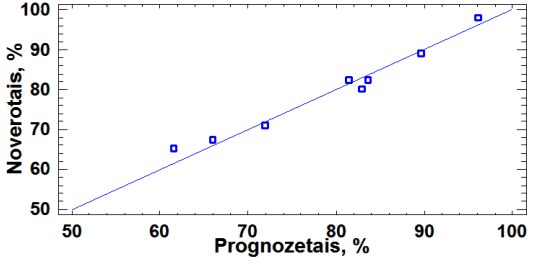
Variants	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Enzimātiski noteiktā koncentrācija g/l	Atgūstamība %
1.	-1	-1	16,30 ± 0,28	82,3 ± 1,43
2.	-1	0	17,63 ± 0,39	89,0 ± 1,96
3.	-1	1	19,40 ± 0,07	98,0 ± 0,36
4.	0	-1	12,91 ± 0,42	65,2 ± 2,14
5.	0	0	14,09 ± 0	71,1 ± 0
6.	0	1	15,86 ± 0,04	80,1 ± 1,43
7.	1	-1	9,66 ± 0,04	48,8 ± 0,21
8.	1	0	13,35 ± 0,28	67,4 ± 1,43
9.	1	1	16,30 ± 0,07	82,3 ± 0,36

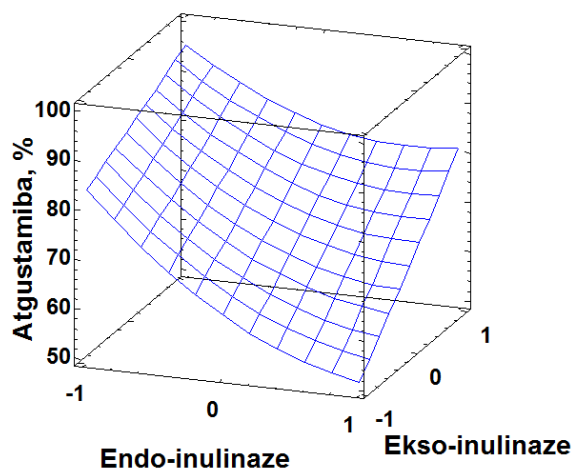
- X<sub>1</sub> – endo-inulināzes daudzums (U): -1 = 15; 0 = 22,5; +1 = 30
- X<sub>2</sub> – ekso-inulināzes daudzums (U): -1 = 140; 0 = 160; +1 = 180

Iegūtos rezultātus apraksta daudzfaktoru otrās kārtas regresijas modelis, kas saista levāna atgūstamību ar endo-inulināzes (X, U) un ekso-inulināzes (Y, U) daudzumiem. Pēc iegūtajiem regresijas koeficientiem (3.10. tabula, 3.6. attēls) redzams, ka vislielākā ietekme uz levānu hidrolīzi ir ekso-inulināzes daudzumam. Faktoru kvadrātiskie efekti, tāpat arī to mijiedarbība ir salīdzinoši nelieli. R<sup>2</sup> norāda, ka modelis levānu hidrolīzei „izskaidro” gandrīz visu (94,37%) eksperimenta atsauču dispersiju un p<0,0026 norāda uz to, ka tas ir statistiski ticams.

3.10. Tabula. Daudzfaktoru regresijas modelis, kas apraksta bakteriālā levāna atgūstamību atkarībā no endo- un ekso-inulināžu daudzumiem.

Table 3.10 Multivariate regression model describing recovery of bacterial levan upon amount of endo- and exo-inulinases.

Modelis	Daudzfaktoru regresijas modelis	Lineārā sakarība starp novērotajiem un modeļu prognozētajiem rezultātiem
IV	$\text{Atgūstamība}(\%) = 0,7194 + 0,1068 * Y - 0,118 * X + 0,0028 * Y^2 + 0,0583 * X^2 + 0,0445 * Y * X$ $R = 0,9789$ $R^2 = 94,37 \%$ $p = 0,0102$ $F = 27,82$	



3.6. Attēls. Bakteriālā levāna atgūstamība atkarībā no endo- un ekso-inulināžu daudzumiem.

Figure 3.6 Recovery of bacterial levan upon amounts of endo- and exo-inulinases.

Jāsecina, ka izmantojot komerciāli pieejamās ekso- un endo-inulināzes, pie noteiktiem to daudzumiem ir iespējama kvantitatīva bakteriālo levānu hidrolīze un tātad arī to kvantitatīvā noteikšana.

### 3.3.3. Temperatūras un ekso-inulināzes daudzuma ietekme uz levāna hidrolīzi

Lai pārbaudītu temperatūras ietekmi tika veikti eksperimenti izmantojot 140 U ekso-inulināzes, 15 U endo-inulināzes dažādās temperatūrās inkubējot *G.nephelii* levāna standartšķīdumu (20,2 g/l) 35 min. Iegūtās vērtības redzamas tabulā.

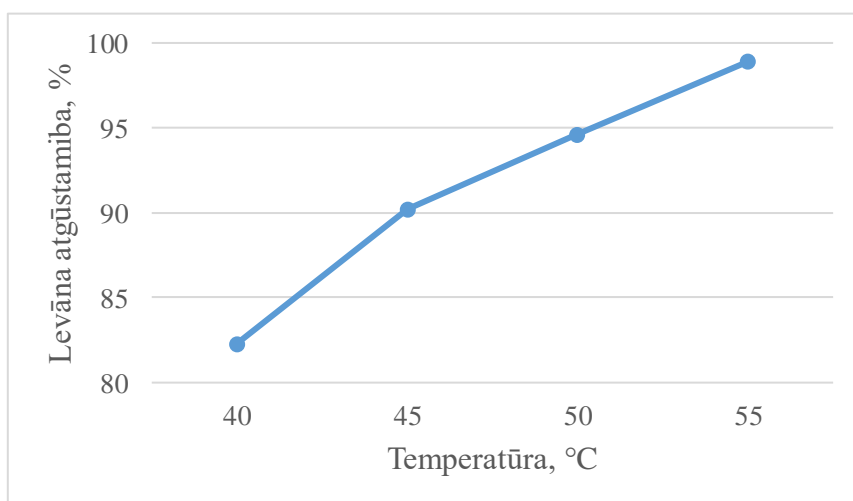
3.11. Tabula. Atgūtais levāns atkarībā no inkubācijas temperatūras

Table 3.11 Recovered levam depending of incubation temperature.

Temperatūra	Enzimātiski noteiktā koncentrācija g/l	Atgūstamība %
40°C	16,62 ± 0,28	82,3 ± 1,39
45°C	18,22 ± 0,11	90,2 ± 0,54
50°C	19,2 ± 0,17	95,0 ± 0,84
55°C	19,99 ± 0,14	98,9 ± 0,69

3.7. Attēls. Atgūtais levāns atkarībā no inkubācijas temperatūras

Figure 3.7 Recovered levam depending of incubation temperature



Kā redzams attēlā, atgūtais levāna daudzums pieaug, pieaugot inkubācijas temperatūrai, pie 55°C tuvinoties 100% atgūstamībai.

### 3.4. Levāna noteikšana optimālajos apstākļos

Izmantojot atrastos optimālos apstākļus (ekso-inulināze 140 U, endo-inulināze 15 U, 55°C temperatūra, 35 min inkubācijas laiks) tika analizēti levānu standartšķīdumi. Rezultāti pārstāvēti tabulā.

3.12. Tabula. Atgūtais levāns izmantojot atrastos optimālos apstākļus

Table 3.12 Recovered levam using found optimal conditions.

Levāns	Koncentrācija paraugā g/l	Enzimātiski noteiktā koncentrācija g/l	Atgūstamība %
<i>G. nephelii</i>	20,2	19,99 ± 0,14	98,9 ± 0,69
<i>E. herbicola</i>	20,2	20,23 ± 0,07	100,16 ± 0,35

Kā redzams tabulā, izmantojot komerciāli pieejamo standarta *E. herbicola* levānu, tika sasniegta vidējā atgūstamība 100,16±0,35%, kas praktiski neatšķiras no ievadītā daudzuma. Tādēļ var secināt, ka atrasti optimālie apstākļi bakteriālo levānu hidrolīzei, kas vienlaikus patērētu arī vismazāk resursu.

### **3.5. Saharozes, cietes un reducējošo cukuru atdalīšana**

Megazyme fruktānu noteikšanas metodē, pirms fruktānu hidrolīzes tiek veikta reducējošo cukuru atdalīšana. Saharozē, cietē un reducējošie cukuri tiek hidrolizēti ar 0,2 ml enzīmu maisījumu, kas satur 0,91 U saharāzes, 4,55 U pullulanāzes, 0,91 U  $\beta$ -amilāze, 9,09 U maltāzes. Paraugi tiek inkubēti 30 min 40°C temperatūrā.

Lai varētu noteikt maksimālo cukuru koncentrāciju, ko standarta apstākļos spētu hidrolizēt dotais enzīmu maisījums, tika pārbaudīti vairāki saharozes standartšķīdumi ar dažādām tās koncentrācijām. No iegūtajiem rezultātiem tika secināts, ka enzīmu maisījums pilnībā spēj hidrolizēt cukurus līdz 5 g/l standarta apstākļos.

Lai varētu palielināt hidrolizēto saharozes daudzumu un atrastu tās maksimālo ievadīto daudzumu pilnīgai redukcijai, enzīmu daudzumi tika palielināti divas reizes (1,82 U saharāzes, 9,10 U pullulanāzes, 1,82 U  $\beta$ -amilāze, 18,18 U maltāzes). Tāpat tika palielināts inkubācijas laiks līdz 60 min. Temperatūra saglabāta 40°C. Šajos apstākļos pilnīga cukuru hidrolīze notika standartšķīdumos, kas saturēja līdz 20 g/l saharozes.

Pēc iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka analizējamajiem paraugiem jā satur ne vairāk kā 5 g/l cukuru, bet ja to koncentrācija ir robežās no 5 līdz 20 g/l, tad jāpielieto paaugstinātais inkubācijas laiks (60 min) un dubultotais enzīmu daudzums (0,4 ml).

#### **3.5.1. Nātrija borhidrīda iespējamās ietekmes pārbaude**

Pēc paraugu inkubācijas ar enzīmu maisījumu tiek pievienots nātrija borhidrīda šķīdums reducēto cukuru aizvākšanai. Pārbaudot reducētos cukurus, pēc inkubācijas ar enzīmu maisījumu, izmantojot standartšķīdumus, kas atbilst lielākajam ieteicamajam cukuru daudzumam, netika konstatēti būtiski ietekme uz Megazyme komplekta metodikas levāna noteikšanas daļu.

### **3.6. Hidrolizētā levāna cukuru noteikšana**

Megazyme fruktānu noteikšanas metodē, pēc fruktānu hidrolīzes ar inulināzēm, reducētie cukuri tiek noteikti ar PAHBAH metodi. Pārbaudot šo metodi modificētajā levānu noteikšanas metodē, tika konstatēts, ka glicerīna ietekmes dēļ, kas bija endo-inulināzes šķīduma sastāvā, var rasties neprecīzi rezultāti. Tādēļ tika izmantotas DNS un Megazyme (K-SUFRG 06/14) metodes reducējošo cukuru noteikšanai, kurām netika konstatētas līdzīga veida neprecizitātes rezultātos. Mazākais nosakāmais cukuru daudzums DNS metodei ir 100 mg/l, bet Megazyme

metodei 1,38 mg/l. Modificētajai levānu noteikšanas metodei tika izvēlēta Megazyme metode, kuru raksturo mazāks minimāli nosakamais cukuru daudzums.

### 3.7. Levāna noteikšanas metodes pārbaude

#### 3.7.1. Levāna noteikšana standartšķīdumos

Tika izveidoti dažādu koncentrāciju *G. nephelii* levāna standartšķīdumi, un analizēti izmantojot kā svara analīzi (Abou-Taleb et al. 2015), tā arī modificēto levāna kvantitatīvās noteikšanas enzimatisko metodi. Rezultāti (vidējie ± standartklūda) pārstāvēti 3.13. tabulā.

3.13. tabula. Svara analīzes un enzimatiskās metodes salīdzinājums levāna standartšķīdumiem  
Table 3.13. Comparison of gravimetric analysis and enzymatic method for levam standard solutions

Variants	Iesvērtais g/l	Svara analīzes rezultāti g/l	Enzimātiskās metodes rezultāti g/l	Starpība g/l
1	6	5,76 ± 0,11	5,83 ± 0,14	0,07 ± 0,18
2	12	11,95 ± 0,13	12,04 ± 0,07	0,09 ± 0,15
3	18	17,82 ± 0,03	17,74 ± 0,17	0,08 ± 0,17
4	24	22,96 ± 0,23	23,04 ± 0,24	0,08 ± 0,23
5	30	30,24 ± 0,17	29,91 ± 0,08	0,33 ± 0,19

Pēc iegūtajiem rezultātiem jāsecina, ka ar enzimatisko metodi iegūtie rezultāti ir tuvi svara analīzē iegūtajiem un to starpības praktiski iekļaujas standartklūdās. Arī vidējās starpības (0,13 ± 0,08 g/l) ticamības intervāls 0,13 ± 0,2 g/l, ievērojot Stjudenta koeficientu (2,78, n=5, f=(n-1)=4), statistiski neatšķiras (p<0,01) no 0 vērtības.

#### 3.7.2. Levāna noteikšana producenta *G. nephelii* P1464 kultūršķīdumos

*G. nephelii* kultūra tika audzēta 24 h levāna producēšanai optimālajos apstākļos un levāna koncentrācijas noteiktas kinētikā dažādās kultivācijas stundās (Semjonovs et al. 2016).

Producētais levāns tika noteikti ar svara analīzi (Abou-Taleb et al. 2015) un centrifūgētie kultūršķīdumu paraugi analizēti izmantojot modificēto levānu kvantitatīvās noteikšanas metodi. Rezultāti (vidējie ± standartklūda) redzami 3.14. tabulā.

3.14. Tabula. Svāra analīzes un enzīmātiskās metodes salīdzinājums levāna noteikšanai kultūršķidrums

Table 3.14 Comparison of gravimetric analysis and enzymatic methods for levam determination in culture liquid

Variants	Laiks, h	Levāns (svāra analīze) g/l	Levāns (enzīmātiskās metode) g/l	Starpība g/l
1	4	3,2 ± 0,16	3,45 ± 0	0,25 ± 0,16
2	8	5,8 ± 0,14	5,68 ± 0,25	0,12 ± 0,29
3	12	8,6 ± 0,21	8,82 ± 0,14	0,22 ± 0,25
4	16	9,8 ± 0,14	10,00 ± 0,28	0,2 ± 0,31
5	20	11,4 ± 0,28	10,98 ± 0,32	0,42 ± 0,43
6	24	17,4 ± 0,06	17,06 ± 0,64	0,36 ± 0,64

Arī šie dati apstiprina, ka izmantojot enzīmātisko levānu noteikšanas metodi iespējams iegūt rezultātus, kas nav atšķirīgi no svāra analīzē iegūtajiem, jo rezultātu starpības praktiski iekļaujas to standartklūdās un arī vidējā starpības (0,26 ± 0,15 g/l) ticamības intervāls 0,26 ± 0,43 g/l, ievērojot Stjudenta koeficientu (2,78, n=5, f=(n-1)=4), statistiski neatšķiras (p<0,01) no 0 vērtības.

### 3.8. Metodes validācija

Metodes validācijai pielietota standartpiedevu metode (Harvey 2008). Tika analizēti vienādi tilpumi nezināmas koncentrācijas bakteriālo levānu saturoši *G. nephelii* P1464 kultūršķidrums, kuriem dažādos daudzumos pievienoti levāna standartšķidrums un paraugu kopējais tilpums uzpildīts visiem vienāds ar destilētu ūdeni. Mērijumi veikti vismaz divās paralēlēs. Validācijas rezultāti (vidējie ± standartklūda) pārstāvēti 3.15. tabulā.

3.15. Tabula. Bakteriālo levānu kvantitatīvās noteikšanas novērtējums ar standartpiedevu metodi.

Table 3.15 Evaluation of bacterial levam quantification by the method of standard additions.

Variants	Piedeva g/l	Parauga koncentrācija bez piedevas g/l	Enzimātiski noteiktā koncentrācija g/l	Starpība g/l	Atgūstamība %
1.	3	12,79 ± 0,26	15,56 ± 0,16	2,92 ± 0,31	97,3 ± 10,3
2.	6	12,79 ± 0,26	18,36 ± 0,08	5,87 ± 0,27	97,8 ± 4,5
3.	9	12,79 ± 0,26	21,40 ± 0,20	8,71 ± 0,33	96,8 ± 3,7
4.	3	7,5 ± 0,15	10,41 ± 0,15	2,91 ± 0,21	97,3 ± 7,0
5.	6	7,5 ± 0,15	13,28 ± 0,12	5,88 ± 0,19	98,0 ± 3,2
6.	9	7,5 ± 0,15	16,03 ± 0,17	8,73 ± 0,23	97,0 ± 2,6

Vidējā atgūstamība ir 97,34 ± 2,39 %. Stjudenta koeficients (n=6; f=n-1=5) ir 2,57. Attiecīgi, vidējā atgūstamība ar ticamības intervālu 97,34 ± 6,14 % (p=0,05) statistiski neatšķiras no teorētiski iespējamās (100%).

Tādēļ jāsecina, ka izveidotā levānu noteikšanas metode ir pietiekami precīza un to iespējams pielietot levāna kvantitatīvajai noteikšanai baktēriju kultūršķidrumos.

Izvērtējot eksperimentāli iegūtos datus par dažādās izcelsmes inulināžu daudzuma un reakcijas apstākļu ietekmi Megazyme K-SURFG metodes soļi (A,B) tika modificēti, lai nodrošinātu bakteriālā levāna pilnīgu enzimātisko hidrolīzi un kvantitatīvo noteikšanu.

A un B soļu attiecīgās modifikācijas iezīmētas *kursīvā*.

### 3.9. Bakteriālā levāna enzimatiskās noteikšanas metode

#### A. Saharozes, cietes un reducējošo cukuru atdalīšana

- a. Pētāmos paraugus atbilstoši atšķaida, lai tie saturētu *apmēram 0,5 līdz 1,5 g/l levāna*.
- b. Analīzei ņem vienādus daudzumus (0,2 ml) šķīduma, kuru iepilda stikla mēģeņu (16\*100 mm) apakšā.
- c. Katrā mēģenē pievieno vienādus daudzumus (0,2 ml) atšķaidītā Saharāzes/Amilāzes šķīduma un mēģenes inkubē 40° C temperatūrā 30 min, ja pirms šī soļa reducējamo cukuru daudzums šķīdumā ir līdz 5 mg/ml. *Ja šķīdumā reducējamo cukuru daudzums ir no 5 līdz 20 g/l, tad pievieno 0,4 ml atšķaidītā saharāzes / amilāzes šķīduma un mēģenes inkubē 40° C temperatūrā 60 min.*
- d. Katrai mēģenei pievieno nātrija borhidrīda šķīdumu (10 mg/ml nātrija borhidrīda 50 mM NaOH šķīdumā). Mēģenes samaisa uz Vorteksa maisītāja un inkubē 40°C 30 min. Reducējošie cukuri tiek reducēti līdz cukuru spirtiem.
- e. Katrai mēģenei maisot uz Vorteksa pievieno 0,5 ml etiķskābes (200 mM). Šī apstrāde novāc borhidrīda pārpalikumus un stabilizē pH līdz apmēram 4,5. Šīs komponentes veido A šķīdumu.

#### B. Levānu hidrolīze un tā kvantitatīvā noteikšana.

- a. No A šķīduma paņem vienādus (0,2 ml) daudzumus un iepilda 2 mēģenēs (16\*100 mm).
- b. Katrai mēģenei *pievieno 0,13 ml nātrija acetāta bufera, 0,1 ml endo-inulināzes (I6285, Sigma-Aldrich), kas satur 15 U, un 0,07 ml ekso-inulināzes (E-EXOIAN, Megazyme), kas satur 140 U.*
- c. Šķīdumu samaisa uz Vorteks maisītāja un inkubē *55° C temperatūrā 35 min*, lai pilnībā pabeigtu *levānu* hidrolīzi līdz fruktozei un glikozei.
- d. Pēc inkubācijas reducētos cukurus mēra izmantojot *Megazyme saharozes, fruktozes, glikozes noteikšanas metodi (K-SURFG).*

Iegūtie rezultāti tiek pareizināti ar paraugu atšķaidījumu un metodes soļos radušos atšķaidījumu *13,75 vai 16,25, ja A solī izmantots palielinātais enzīmu daudzums*. Iegūtie galarezultāti atbilst levāna koncentrācijai izmantotajos paraugos.

**Kontroles.**

*Ja ir pamats domāt par A daļā neatdalītu cukuru pārpalikumu, no A šķīduma paņem 2 (0,05 ml) paraugus cukuru noteikšanai. Iegūto kontroles rezultātu vidējās vērtības atņem no attiecīgajiem hidrolizēto levānu cukuru noteikšanā iegūtajiem skaitļiem, lai iegūtu noteikto levāna daudzumu.*

## 4. Diskusija

Kā jau vairākkārt minēts, šobrīd nav pazīstamas tādas baktēriju sintezēto levānu kvantitatīvās noteikšanas metodes, kas būtu specifiskas, precīzas un salīdzinoši viegli īstenojamas. Augu izcelsmes īsākās ķēdes inulīnu noteikšanai izmanto komerciāli pieejamo Megazyme komplekso enzimatisko metode (AOAC 999.03 / AAC 32.32). Tās pielietojums bakteriālo fruktānu gadījumā var būt ierobežots, jo lai gan kā levāns, tā inulīns ir fruktānu polimēri, kas pamatā sastāv no fruktozes, taču atšķirībā no inulīna, levānam ir  $\beta$  2-6 saites un tiem ir raksturīgas sānu ķēdes. Pārsvārā levāniem ķēdes ir garākas, tātad arī lielāka molekulmasa (Vijn & Smeekens 1999).

Šo faktoru ietekme apstiprinās, jo izmantojot Megazyme enzimatisko fruktānu noteikšanas metodi, fermentācijās iegūto *G. nephelii*, *Z. mobilis* un komerciāli pieejamā levāna standarta *E. herbicola* (L8647-1G Sigma-Aldrich) levānu noteikšanā tika konstatēts, ka rezultāti ir gandrīz 10 reizes mazāki par sagaidāmajiem (3.1. attēls). Tādēļ jāsecina, ka inulināžu maisījums, kas tiek izmantots Megazyme komplektā, nespēj pilnībā sadalīt baktēriju sintezētos levānus līdz monomēriem.

Iepriekšējos pētījumos (Semjonovs et al. 2015) izmantojot SEC hromatogrāfiju tika noteiktas levānu molekulmasas. Vislielākā vidējā skaitliskā molekulmasa bija *E. herbicola* levānam 192,78 KDa, *G. nephelii* tā bija 53,51 KDa un *Z. mobilis* 6,85 KDa. Aplūkojot 3.1. attēla rezultātus var secināt, ka jo lielāka levāna vidējā skaitliskā molekulmasa, jo mazāk to spēj hidrolizēt Megazyme komplektā iekļautās inulināzes. „Lielākajam” *E. herbicola* atgūstamībai sasniedzot tikai ap 10%, bet pat „mazākajam” *Z. mobilis* levānam tā bija mazāka par 50 % no ievadītā daudzuma. Iepriekš jau minēts, ka ekso-inulināzes sadala fruktānu gala vienības, bet endo-inulināzes sašķeļ saites, kas atrodas tālāk no polimēru ķēdes galiem (Baston & Neagu 2013). Tāpat endo-inulināzes samazina fruktānu polimerizācijas pakāpi un palielina substrāta šķīdību (Liu et al. 2016). No iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka „lielākajam” levānam, pēc tā inkubācijas ar Megazyme inulināžu maisījumu, saglabājas mazāki polimēri ar salīdzinoši augstu polimerizācijas pakāpi, kurus ekso-inulināze nespēj pilnībā sadalīt. Tādēļ jāsecina, ka Megazyme komplekta sastāvā esošajā inulināžu maisījumā ir nepietiekams daudzums endo-inulināžu, kas salīdzinoši lielos levāna polimērus spētu sadalīt mazākajos oligosaharīdos.

Kā redzams 3.1., 3.3., 3.4. tabulās, tad mainot Megazyme metodes apstākļus (temperatūru, inkubācijas laiku) un inulināžu daudzumu, palielinājās levāna atgūstamība, bet tā joprojām pat optimālajos apstākļos (3.3 tabula) nepārsniedz 78 %. Tādēļ jāsecina, ka Megazyme fruktānu noteikšanas komplektā esošās inulināzes nespēj pilnībā hidrolizēt bakteriālos levānus. Temperatūras paaugstināšana, palielināja levāna atgūstamību, norādot, ka

arī Megazyme komplektā esošo inulināžu maisījumam optimālā temperatūra hidrolytiskajām reakcijām ir lielāka par metodē definētajiem 40°C.

Levāna kvantitatīvu degradāciju nodrošina specifiskie enzīmi levānāzes, kas arī iedalās ekso- un endo-levānāzēs (Vijn & Smeekens 1999). Tomēr pašlaik tās vēl nav komerciāli pieejamas.

Agrākajos gados ir bijis komerciāli pieejams Fructozyme L preparāts, kas sastāvēja no *Aspergillus niger* endo- un ekso-inulināzēm un principā spēja hidrolizēt arī bakteriālās izcelsmes levānus līdz monomēriem (Vigants et al. 2003, Munoz-Gutierrez et al. 2009). Taču tā ražošana ir pārtraukta.

Šobrīd komerciāli pieejamas Megazyme un Sigma-Aldrich *Aspergillus niger* izcelsmes vai arī rekombinantās inulināzes. Inulināzes hidrolizē inulinīna β 2-1 saites, bet tā kā tās nav stingri substrātspecifiskas, tās spēj hidrolizēt, vismaz principā, arī levāna β 2-6 saites. Tas bija vērojams kā nemainītajos Megazyme metodes standarta apstākļos (3.1. attēls), tā arī vēlāk mainītajos (3.1., 3.4. tabulas) apstākļos, kad inulināzes spēja daļēji hidrolizēt dažādas izcelsmes levānu. Optimizējot inulināžu daudzumu un hidrolīzes apstākļus ir iespējams panākt pilnīgu levāna hidrolīzi (3.12. tabula), kas apstiprina, ka inulināzēm nav nepārvaramu katalītisku šķēršļu, lai pilnībā hidrolizētu β 2-6 saites levānu polimērus sadalot līdz monomēriem. Tādēļ tās principā ir iespējams izmantot arī bakteriālā levāna kvantitatīvās analīzes metodēs.

Maģistra darba izstrādē izmantoti divi Megazyme metodes komplektācijas varianti – K-FRUC 5/2008 un K-FRUC 03/14. Pētījumu gaitā tika novērotas atšķirības uz komplektos iekļauto inulināžu spēju hidrolizēt levānu (3.6. tabula). K-FRUC 5/2008 komplektā iekļautas augsti attīrītas ekso- un endo-inulināzes ar definētām aktivitātēm, bet K-Fruc 03/14 iekļautas rekombinantās ekso- un endo-inulināzes, un to aktivitātes nav definētas. Literatūrā minēts, ka inulināzēm, atkarībā no to izcelsmes, ir atšķirīgas īpašības, kas izpaužas enzimatisko reakciju optimālajos apstākļos (temperatūra, pH) un molekulmasās. Šādas atšķirības ir novērojamas pat no vienas sugas mikroorganismiem iegūtās inulināzēs (Anonīms 2017a, 2017b). No iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka rekombinantās inulināzes, no K-Fruc 03/14 apskatītajos apstākļos ir mazāk efektīvas uz levānu hidrolīzi, tātad vairāk substrātspecifiskas attiecībā uz β 2-1 saitēm, nekā augsti attīrītās inulināzes no K-FRUC 03/14. Šīs izmaiņas, protams, neatstāja nekādu ievērojamu ietekmi uz inulīna hidrolīzi (3.6. tabula).

Endo-inulināzes gadījumā ir novērojama enzīmu inhibīcijas ar reakcijas galaproduktiem – inulo-oligosaharīdiem. Tādēļ maisījumos, kur izmantotas abu veidu inulināzes, ekso-inulināze samazina endo-inulināzes produktu inhibīciju (Liu et al. 2016). 3.9. tabulā un 3.6. attēlā redzams, ka palielinoties endo-inulināžu daudzumiem samazinās atgūtā levāna daudzums. Tāpat neatkarīgi no endo-inulināzes daudzuma, levāna atgūstamība palielinās,

palielinoties ekso-inulināzes daudzumam. To iespējams izskaidrot ar endo-inulināzes enzīmu inhibīciju ar produktu, t.i. ar veidotajiem inulo-oligosaharīdiem. Pie mazākiem ekso-inulināzes daudzumiem tā nespēj pietiekamā ātri sadalīt radušos inulo-oligosaharīdus. Tādēļ jāsecina, ka enzīmu maisījumos ar abu veida inulināzēm ir svarīgi ne tikai to daudzumi, bet arī to savstarpējās proporcijas. Pēc 3.9. tabulas datiem var secināt, ka 40°C optimālā EksoI:EndoI daudzumu proporcija ir 12:1.

Paaugstinoties temperatūrai enzīmu aktivitāte ir atkarīga no ķīmisko reakciju ātruma, kas pieaugot temperatūrai paātrinās, un pašu enzīmu termostabilitātes, pie augstākām temperatūrām tie ātrāk tiek inaktivēti (Bisswanger 2014). Izmantojot 55°C temperatūru un 140 U ekso-inulināzes bija iespējams sasniegt gandrīz tādu pašu bakteriālā levāna hidrolīzes apjomu (3.11. tabula, 3.7. attēls), kā izmantojot 40°C un 180 U ekso-inulināzes (3.9. tabula). Ekso-inulināzēm, atkarībā no izcelsmes avota, optimālā reakcijas temperatūra ir no 25°C līdz 65°C. No *Aspergillus niger* iegūtās ekso-inulināzēm tā minēta 55°C (Anonīms 2017a), kas saskan ar iegūtajiem rezultātiem (3.11. tabulā un 3.7. attēlā). Tādēļ tā atšķirībā no inkubācijas pie 40°C spēja ātrāk hidrolizēt oligosaharīdus samazinot endo-inulināzes inhibīciju. Visticamāk, ka endo-inulināzes aktivitāte arī pieaug vai vismaz saglabājas tuvu iepriekšējo inkubācijas temperatūru līmeņiem. Kopumā jāsecina, ka paaugstinātā temperatūra paātrinās arī šo enzimatisko reakciju ātrumu un pilnīgu bakteriālo levānu hidrolīzi ir iespējams sasniegt izmantojot mazākus inulināžu daudzumus.

Megazyme fruktānu noteikšanas komplektā (K-FRUC 5/2008) iekļauto inulināžu aktivitātes ir 454,55 U/ml ekso-inulināzei un 4,55 U/ml endo-inulināzei. Inulināžu daudzuma attiecība EksoI:EndoI ir 100:1. Kādreiz pieejamajā Fructozyme L preperātā ekso- un endo-inulināžu daudzumi attiecīgi bija 2000 U/ml un 200 U/ml. To proporcijai esot 10:1 attiecīgi EksoI:EndoI. Fructozyme L palielinātā endo-inulināzes proporcija, salīdzinot ar Megazyme metožu komplektā iekļauto inulināžu maisījumu, palīdz izskaidrot, kādēļ tas spēja pilnībā hidrolizēt levānus līdz to monomēriem.

Izveidotajā levānu noteikšanas metodē izmantoti inulināžu daudzumi ir 140 U ekso-inulināzes un 15 U endo-inulināzes, to daudzumu proporcija esot apmēram 9,33:1 attiecīgi EksoI:EndoI. Ar šādiem inulināžu daudzumiem tika panākta pilnīga levāna hidrolīze un to proporcijas ir tuvas Fructozyme L preperātā esošajām. Lai gan pat no vienas sugas izdalītajiem enzīmiem var atšķirties optimālie to reakciju apstākļi, no iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka *A. niger* izcelsmes vai arī Megazyme komplektā iekļautajām rekombinantajām inulināzēm visefektīvākā daudzumu proporcija bakteriālo levānu hidrolīzei optimālajos apstākļos ir 9-10 ekso-inulināzes vienības pret 1 endo-inulināzes vienību.

Izmantojot Fructozyme L inulināžu maisījumu, lai sasniegtu pilnīgu levānu hidrolīzi, pētāmie paraugi jāinkubē 60°C temperatūrā, 24 h (Semjonovs 2015). Lai gan Fructozyme L ir salīdzinoši efektīvs preparāts, tomēr tā izmantošana ir laikietilpīga, sasniedzot pat 24 h. Optimizētajā levānu noteikšanas metodē pilnīga bakteriālo levānu hidrolīze tika panākta 35 min laikā.

Tāpat šo inulināžu optimālo daudzumu un apstākļu izmantošana levāna hidrolīzē ir ātrāka, nekā citās bakteriālā levāna hidrolīzes metodēs - 3 stundas 0,1 mol/l HCl 90° C temperatūrā vai vienu stundu 0,1 mol/l skābeņskābes 100° C temperatūrā (Muñoz Gutiérrez et al. 2009). Modificētajai levānu noteikšanas metodei nepieciešama mazāka inkubācijas temperatūra (55°C), kas atvieglo nepieciešamo apstākļu nodrošināšanu.

Visbiežāk lietotās bakteriālo levānu kvantifikācijas metodei – svara analīzei – nepieciešams salīdzinoši ilgs laiks, kas pārsniedz modificētās levānu noteikšanas metodē nepieciešamo. Kultūršķidrumu paraugus izgulsnē ar etanolu, parasti vismaz 24 h, un tad centrifūgējot tiek atdalītas nogulsnes un žāvētas līdz nemainīgam svaram, arī parasti vismaz 24 h vai pat ilgāk (Abou-Taleb et al. 2015). Kopumā šis process var aizņemt pat vairākas dienas. Tādēļ ir nozīmīgi, ka izstrādātā bakteriālo levānu noteikšanas metodes izpilde aizņem tikai dažas stundas un nepieciešamie rezultāti ir ātri iegūstami.

Bakteriālā levāna atgūstamību tuvu 100 % iespējams sasniegt pie 140 U ekso-, 15 U endo-inulināžu, inkubējot 35 min, 55°C temperatūrā (3.11., 3.12. tabulas, 3.7. attēls). Šāda atgūstamība bija gan *G. nephelii*, gan arī komerciāli pieejamajam standarta levānam no *E. herbicola*. Tādēļ var secināt, ka šī metode ir efektīva attiecībā uz dažādas izcelsmes un garuma levāniem un būtu pielietojama nosakot arī citu sugu bakteriju izcelsmes levānus.

Pēc literatūras datiem baktēriju celmi dažādos apstākļos spēj sintezēt no 0,32 līdz 86,3 g/l levāna (Donat et al. 2012). Izmantotā *G. nephelii* kultūra optimālajos apstākļos spēj sintezēt līdz 33,66 g/l levāna (48 h) (Semjonovs 2016). Iegūtie 17,4 g/l (3.13. tabula) ko var uzskatīt par labu rezultātu ņemot vērā, ka kultūra tai optimālajos apstākļos audzēta 24 h.

Salīdzinot levāna svara analīzes rezultātus un enzimatiski noteiktos rezultātus standartšķīdumiem un *G. nephelii* kultūršķidrumiem (3.13. tabula) var redzēt, ka iegūtie rezultāti abām metodēm ir ļoti tuvi viens otram un to starpības praktiski iekļaujas to standartklūdās. Tādēļ var secināt, ka modificētā levānu noteikšanas metode ir vismaz tik pat precīza, kā svara analīzes metode, kas pašlaik ir visbiežāk lietotā levānu kvantifikācijas metode.

Metodes validācija veikta ar standartpiedevu metodi (Harvey 2008) (3.14. tabula). Iegūtā vidējā atgūstamība bija  $97,34 \pm 2,39\%$ , arī vidējā atgūstamība ar ticamības intervālu  $97,34 \pm 6,14\%$  ( $p=0.05$ ) statistiski neatšķiras no teorētiski iespējamajiem 100%. Tādēļ šī modificētā

fruktānu enzimatiskās noteikšanas metode ir objektīvi uzskatāma kā pietiekami precīza un izmantojama bakteriālo levānu kvantitatīvajā noteikšanai.

## 5. Secinājumi

1. Atšķirībā no augu izcelsmes inulīniem, Megazyme (K-FRUC) metode standartapstākļos nespēj nodrošināt pilnīgu bakteriālā levāna hidrolīzi, tādēļ arī tā kvantitatīvu noteikšanu.
2. Arī modificējot reakcijas apstākļos (temperatūra, laiks, enzīmu daudzums) ar Megazyme komplektos iekļautajām inulināzēm nav panākama bakteriālā levāna kvantitatīva hidrolīze.
3. Izmantojot atšķirīgas komerciāli pieejamās ekso-inulināzes (Megazyme) un endo-inulināzes (Sigma-Aldrich) pie noteiktiem to daudzumiem optimālajos enzimatisko reakciju apstākļos, iespējams panākt kvantitatīvu bakteriālā levāna hidrolīzi līdz monomēriem un tādēļ arī to kvantitatīvo noteikšanu.
4. Bakteriālo levāna paraugiem (0,5 – 30 g/l) kvantitatīvu hidrolīzi nodrošina to inkubācija ar 140 U ekso-inulināzes un 15 U endo-inulināzes 35 minūtes 55°C temperatūrā.
5. Bakteriālo levānu saturošo standartšķīdumu un producenta kultūršķīdumu analīzes rezultāti, kas iegūti ar izstrādāto levānu enzimatiskās noteikšanas metodi statistiski neatšķiras no svara analīzē iegūtajiem un validācija ar standartpiedevu metodi nodrošina atgūstamību 97,34±6,14%, tā apstiprinot, ka izveidotā metode ir precīza un izmantojama levānu kvantitatīvajā analīzē.

## **6. Pateicības**

Autors izsaka pateicību darba vadītājiem - Dr. habil. biol. Pēterim Zikmanim un Dr. biol. Pāvelam Semjonovam par ieguldījumu darba tapšanā. Paldies LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtam un LU Bioloģijas fakultātei par materiālu nodrošināšanu.

## 7. Literatūras saraksts

1. Anonīms 2017a. [www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.80#SYNONYMS](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.80#SYNONYMS)
2. Anonīms 2017b. [www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.7#](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.7#)
3. Anonīms 2014a. Megazyme Fructan Assay Kit <http://secure.megazyme.com/Fructan-Assay-Kit>
4. Anonīms 2014b. Megazyme Sucrose/Fructose/D-Glucose Assay Kit <http://secure.megazyme.com/Sucrose-Fructose-D-Glucose-Assay-Kit>
5. Anonīms. Wolframalfa 2017. <https://www.wolframalpha.com>
6. Abou-Taleb K. A., Sbdel-Monem M. O., Yassin M. H., Draz A. A., 2015. Production, Purification and Characterization of Levan Polymer from *Bacillus lentus* V8 Strain. *British Microbiology Research Journal*. Vol. 5 (1) 22-32 .
7. Ahmed K. B. A., Kalla D., Uppuluri K. B., Anbazhagan V., 2014. Green synthesis of silver and gold nanoparticles employing levan, a biopolmer from *Acetobacter xlinum* NCIM 2526, as a reducing agent and capping agent. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 112. 539-545.
8. Banguela A., Hernández L., 2006. Fructans from natural sources to transgenic plants. *Biotechnologia Aplicada*. Vol. 23 (3). 202-210.
9. Barone J.R., Medynets M., 2007. Thermally processed levan polymers. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 69. 554-561.
10. Basso A., Spizzo P., Ferrario V., Knapic L., Savko N., Braiuca P., Ebert C., Ricca E., Calabrò V., Gardossi L., 2009. Endo- and Exo-Inulinases: Enzyme-Substrate Interaction and Rational Immobilization. *Biotechnology Progress*. Vol. 26 (2). 397-405.
11. Baston O., Neagu C., 2013. Establishing the optimal conditions for fructose production from chicory inulin. *Romanian Biotechnological Letters*. Vol. 18 (3). 8263.-8270.
12. Bender D. A., 2014. A Dictionary of Food and Nutrition (4.ed.). Oksforda: Oxford University Press. 608 pp.
13. Bisswanger H., 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science*. Vol 1. 41-55.
14. 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. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 136. 710-720.
15. Bosscher D., Breynaert A., Pieters L., Hermans N., 2009. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 60 (6) 5-11.

16. Dahec I., Belghith K. S., Hamden K., Feki A., Belghith H., Mejdoub H., 2011. Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol 49. 942-947.
17. Dahec I., Harrabi B., Hamden K., Feki A., Mejdoub H., Belghith H., Belghith K. S., 2013. Antioxidant effect of nondigestible levan and its impact on cardiovascular disease and atherosclerosis. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol 58. 281-286.
18. Ernandes F. M. P. G., Garcia-Cruz C. H., 2005. Bacterial Levan: technological aspects, characteristics and production. *Semina: Ciências Agrárias* Vol 26. (1). 71-82.
19. Esawy M. A., Ahmed E. F., Helmy W. A., Mansour N. M., El-Senousy W. M., El-Safty M. M., 2012. Antiviral Levans of *Bacillus* spp. Isolated from Honey – in Karunaratne d. N. (ed) *The Complex World of Polysaccharides* Rijeka: InTech. 195-214.
20. Franken J., Brandt B. A., Tai S. L., Bauer F. F., 2013. Biosynthesis of Levan, a Bacterial Extracellular Polysaccharide, in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE*. Vol. 8 (10). 1-14.
21. Ghaly A. E., Arab F., Mahmoud N. S., Higgins J., 2007. Production of Levan by *Bacillus licheniformis* for Use as a Soil Sealant in Earthen Manure Storage Structures. *American Journal of Biotechnology and Biochemistry*. Vol 3 (2). 47-54.
22. Harvey D., 2000. *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill Publishing. 798 pp.
23. Hestrin S., Schramm M., 1954. Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Biochemical Journal*. Vol.58. 345-352.
24. Jakob F., Steger S., Vogel R. F., 2012. Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads – *European Food Research & Technology* 234 (3). 493-499
25. Jathore N. R., Bule M. V., Tilay A. V., Annapure U. S., 2012. Microbial Levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and Medium Optimization for Enhanced Production. *Food Science Biotechnology* Vol 21 (4). 1045-1053.
26. Joye D., Hoebregs H., 2000. Determination of Oligofructose, a Soluble Dietary Fiber, by High-Temperature Capillary Gas Chromatography. *Journal of AOAC International*. Vol. 83 (4). 1020-1026.
27. Kang S. A., Jang K. H., Seo J. W., Kim K. H., Kim Y. H., Rairakhwada D., Seo M. Y., Lee J. O., Ha S. D., Kim C. H., Rhee S. K., 2009. Levan: Applications and Perspectives. – in Rehm B. H. A.(ed.). *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors*. Norviča: Caister Academic Press 145. – 162.

28. Knudsen I., Andersen R., Mejborn H., Poulsen M., Andersson C., Gudmundsdóttir E., Hallikainen A., Mølk A-M., & Paulsen J. E. 2000. *Safety evaluation of fructans*. Nordisk Råd. (TemaNord; No. 523) Kopenhægena. 115 pp.
29. McCleary B.V., Blakeney A. B., 1999. Measurement of Inulin and Oligofructan. *Cereal Foods World* Vol 44. 398-406.
30. Miller G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. Vol 31 (9). 426-428.
31. Muñóz Gutiérrez I., Rodríguez-Alegría M. E., Munguía A. L., 2009. Kinetic behaviour and specificity of  $\beta$ -fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochemistry*. Vol 44. 891-898.
32. Nagem R. A. P., Rojas A. L., Golubev A. M., Korneeva O. S., Eneyskaya E. V., Kulminskaya A. A., Neustroev K. N., Polikarpov I., 2004. Crystal Structure of Exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: The Enzyme Fold and Structural Determinants of Substrate Recognition. *Journal of Molecular Biology*. Vol 344 (2). 471-480.
33. Liu Y., Zhou S. H., Cheng Y. R., Chi Z., Chi. Z. M., Liu G. L., 2016. Synergistic effect between the recombinant exo-inulinase and endo-inulinase on inulin hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 128. 27-38.
34. Patel A., Prajapati J. B., 2013. Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria. *Advances in Dairy Research*. Vol. 1. (2) 1-7.
35. Petkova N., Denev P., 2015. Methods for determination of inulin - In: Proceedings Book International Scientific-practical Conference - Food, Technology and Health. 135 – 140.
36. Pomeranz Y., Meloan C. E., 1994. Food Analysis: Theory and Practice, 3rd ed. Chapman & Hall. Nujorka. 778 pp.
37. Prosky L., Hoebregs H., 1999. Methods to Determine Food Inulin and Oligofructose. *Journal of Nutrition*. Vol. 129 (7). 1418s-1423s.
38. Rairakhwada D., Pal A. K., Bhatena Z. P., Sahu N. P., Jha A., Mukherjee S. C., 2006. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*. Vol. 22. 477-486.
39. Rhee S. K., Song K. B., Kim C. H., Park B. S., Jang E. K., Jang K. H., 2002. Biopolymers Volume 5. Levan. Weinheim. WILEY-VCH. pp 532.
40. Rocha J. R., Catana R., Ferreira B. S., Cabral J. M. S., Fernandes P., 2006. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*. Vol 95. 77-82.
41. Semjonovs P., Shakirova L., Treimane R., Shvirksts K., Auzina L., Cleenwerck I., Zikmanis P., 2015. Production of extracellular fructans by *Gluconobacter nephelii* P1464. *Letters in Applied Microbiology*. Vol 62. 145-152.

42. Semjonovs P., Shakirova L., Broks R., Kistkins S., Zikmanis P., 2016. Influence of Environmental Factors on Extracellular Fructan and Oligosaccharide Production by *Gluconobacter naphelii*. *Research Journal of Microbiology*. Vol 12 (1). 33-41.
43. Sezer A. D., Kazak H., Öner E. T., Akbuga J., 2011. Levan-based nanocarrier system of peptide and protein drug delivery: Optimal and influence of experimental parametr on the nanoparticle characteristics. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 84. 358-363.
44. Simonovska B., 2000. Determination of Inulin in Foods. *Journal of AOAC International*. Vol. 83 (3). 675-678.
45. Singh R. S., Chauhan K., Kennedy J. F., 2017. A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 96. 312-322.
46. Srikanth R., Sundhar Reddy C. H. S. S., Siddartha G., Ramaiah M. J., Uppuluri K. B., 2015. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 120. 102-114.
47. Vendrell-Pascuas S., Castellote-Bargalló A. I., López-Sabater M. C., 2000. Determination of inulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*. Vol. 881 (1-2). 591-597.
48. Vigants A., Marx S. P., Linde R., Ore S., Bekers M., Vina I., Hicke H. G., 2003. A Novel and Simple Method for the Purification of Extracellular Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Current Microbiology*. Vol 47. 198-202.
49. Vijn I., Smeekens S., 1999. Fructans: More Than Reserve Carbohydrate? *Plant Physiology*, Vol 120. 351-359.
50. Wiele van de T., Boon N., Possemiers S., Jacobs H., Verstraete W., 2006. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced *in vitro* prebiotic effects. *Journal of Applied Microbiology* Vol 102 (2). 452-460.