



Politechnika Łódzka

Specjalistyczne Laboratorium Analityki Cukrowniczej

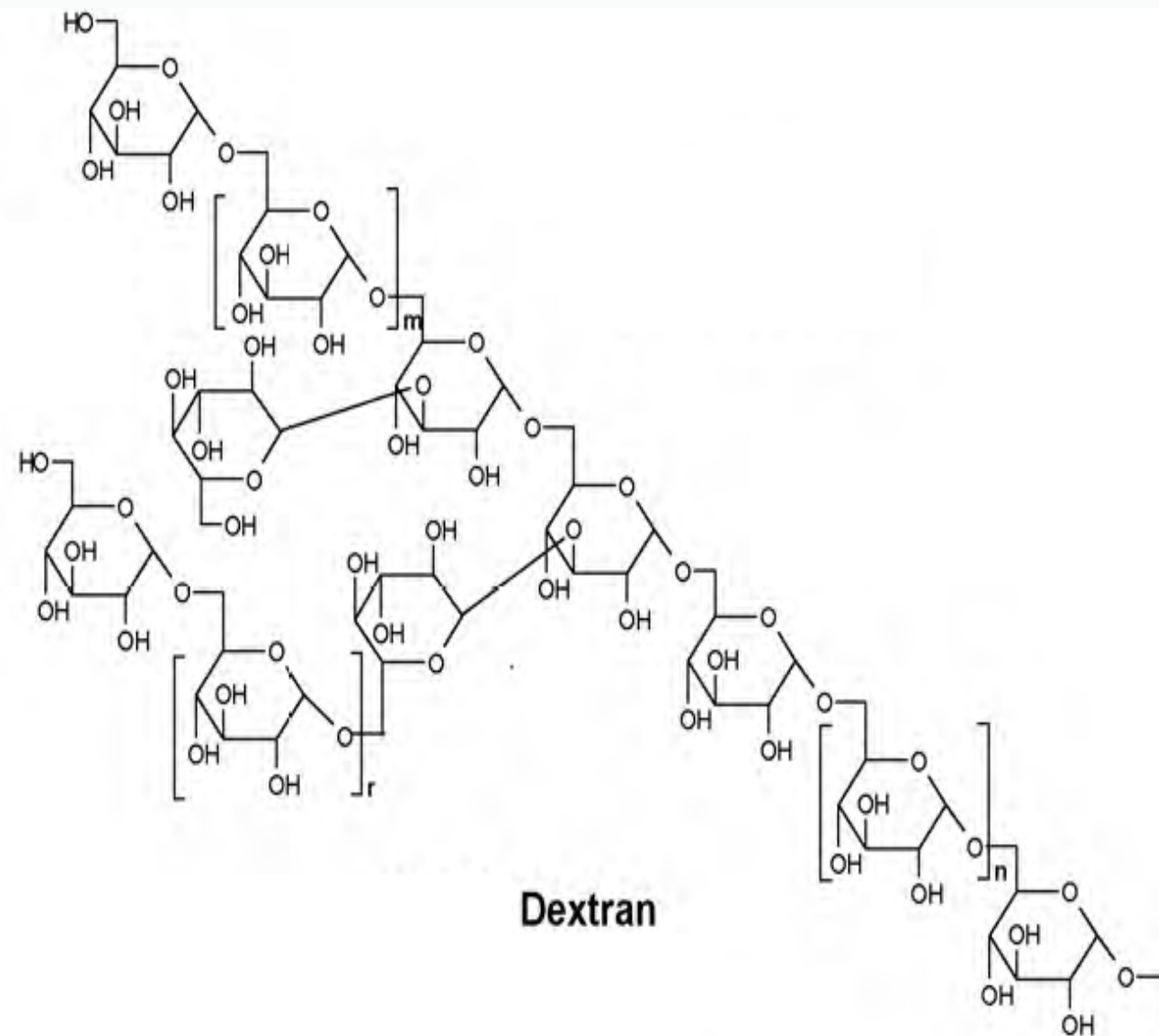
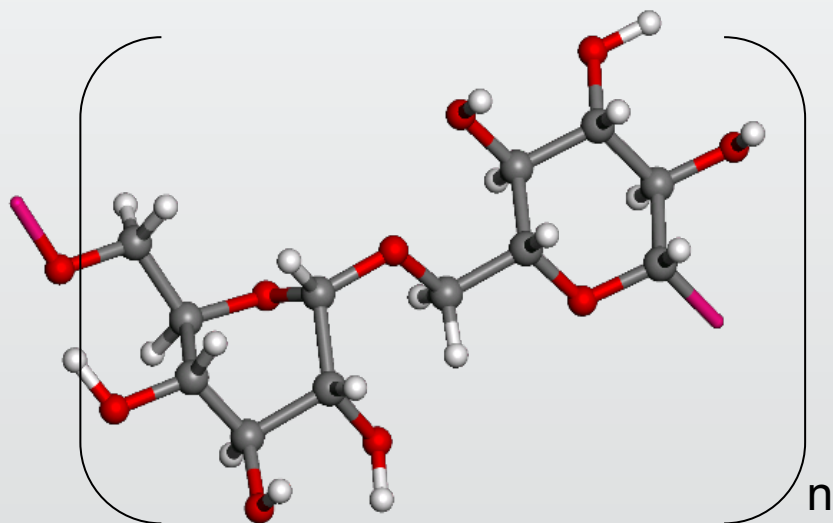
**Dekstranaza - metoda na przeciwdziałanie
niekorzystnym skutkom obecności dekstranu**



dr inż. Aneta Antczak-Chrobot
dr inż. Maciej Wojtczak

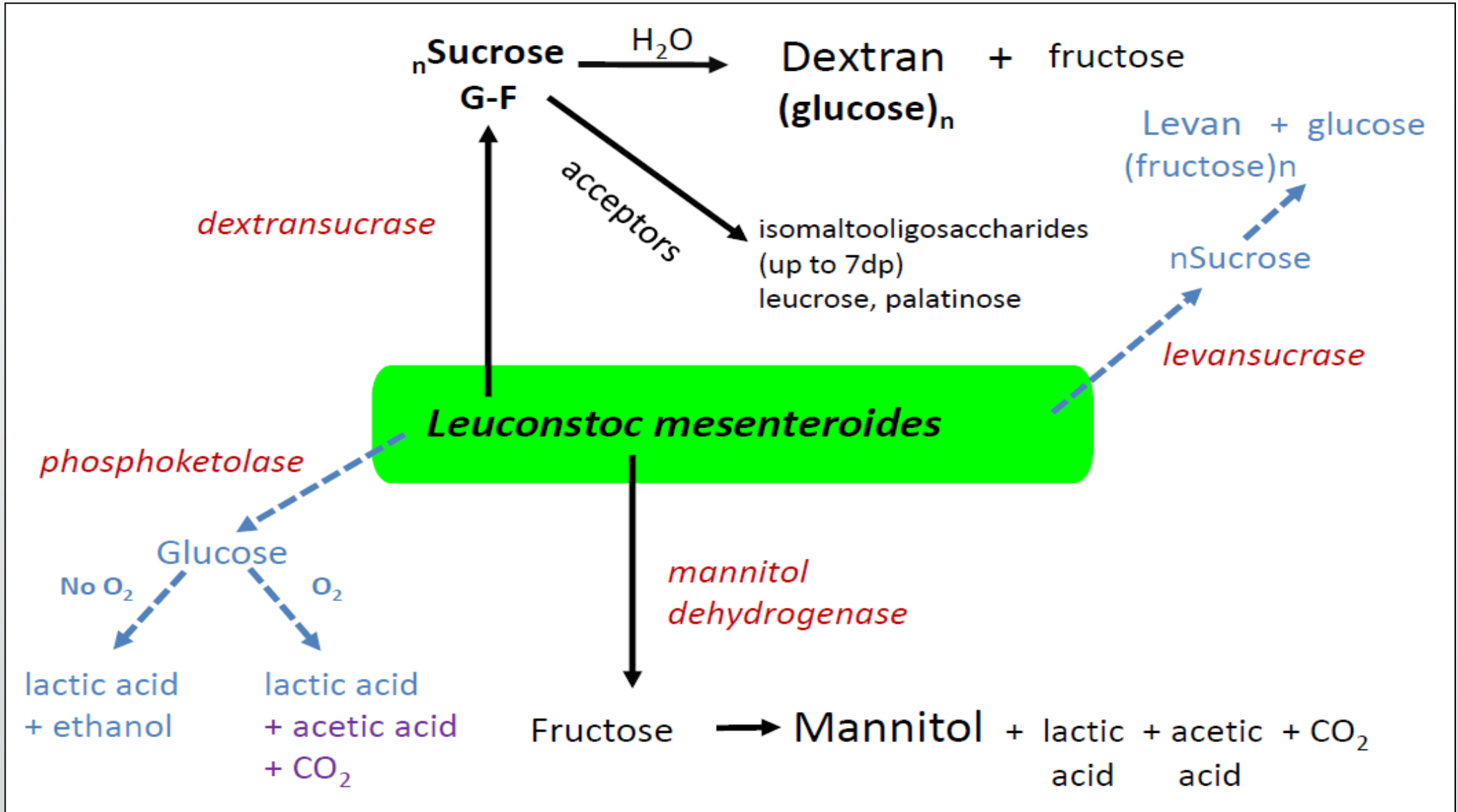


Dekstran – wysokołańcuchowy exo-polisacharyd





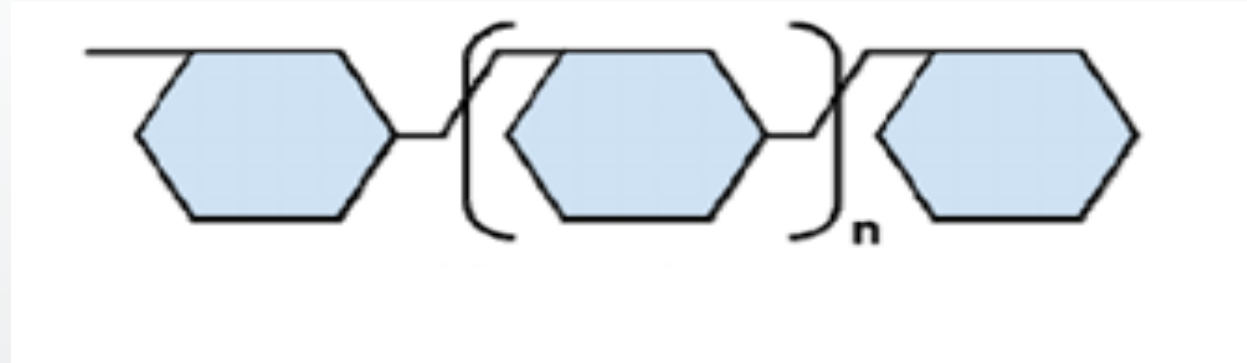
Dextran formation



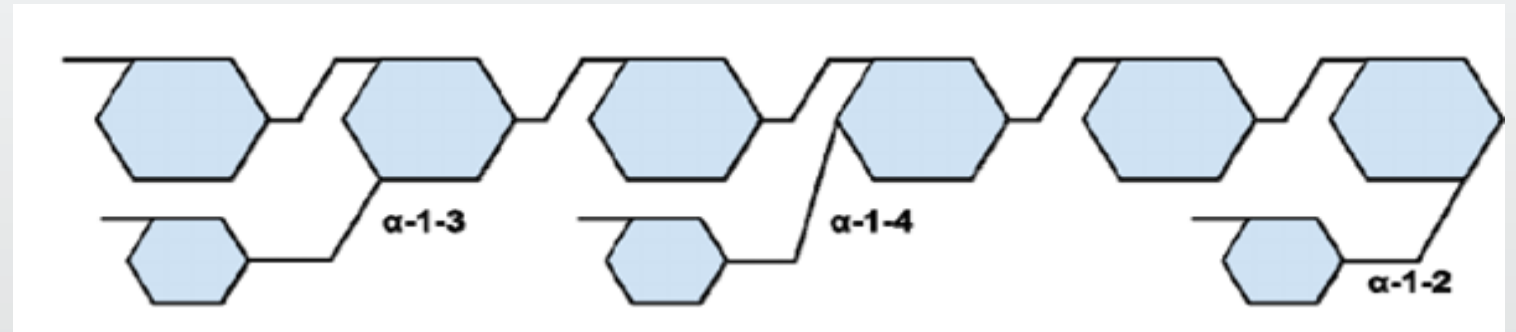


Struktura dekstranu:

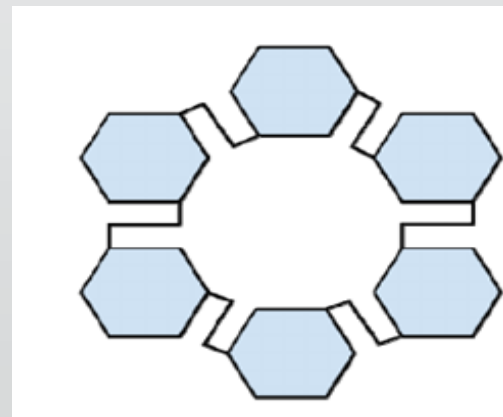
Liniowa

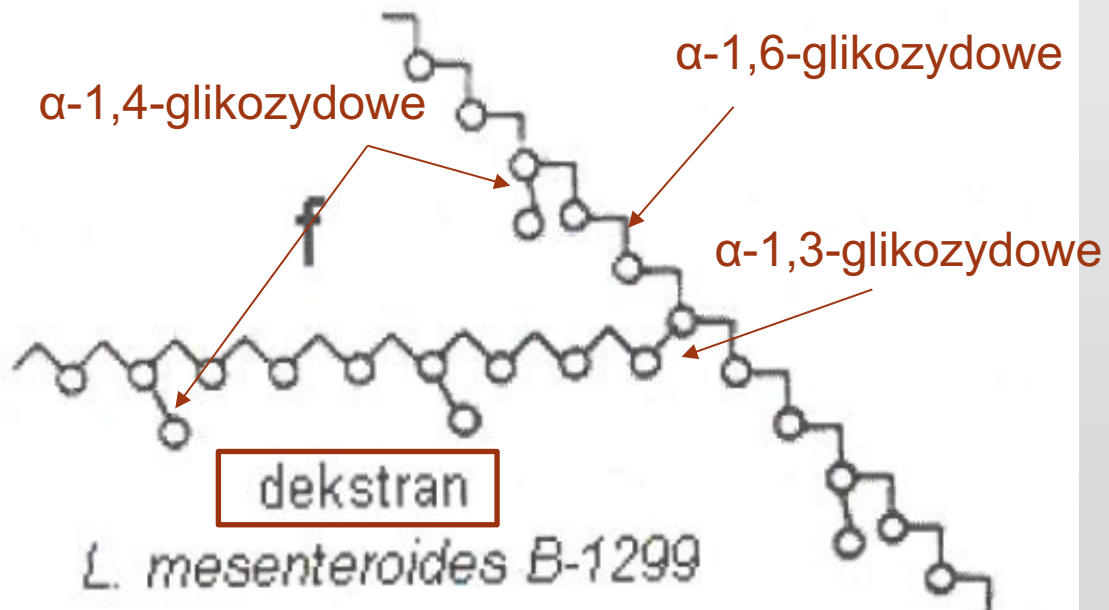
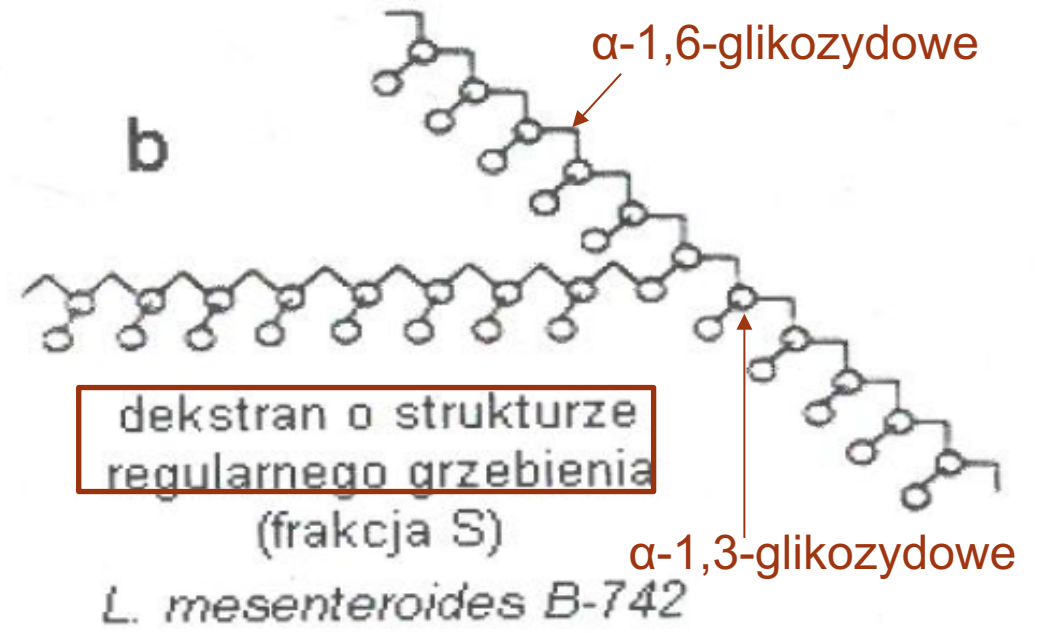
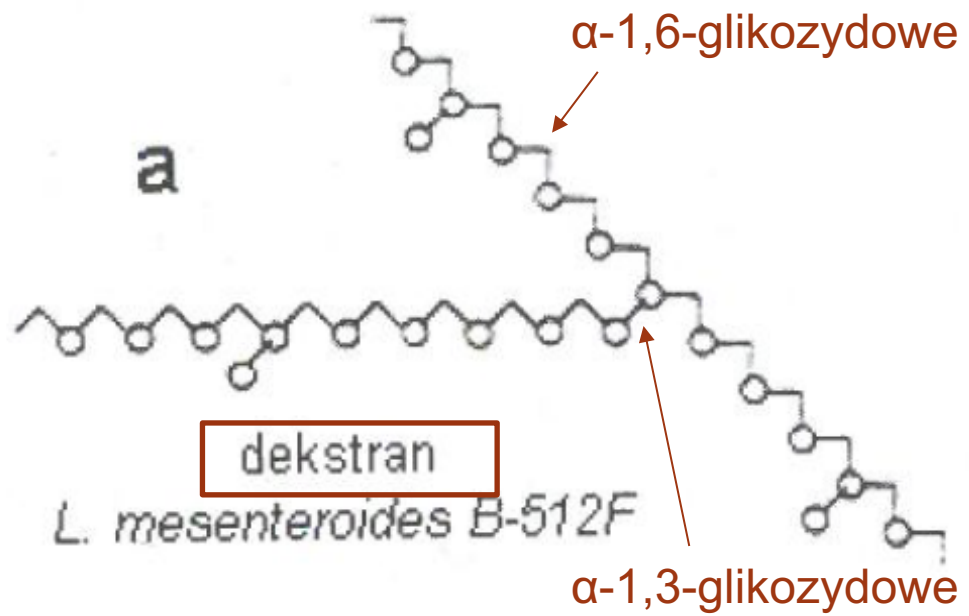


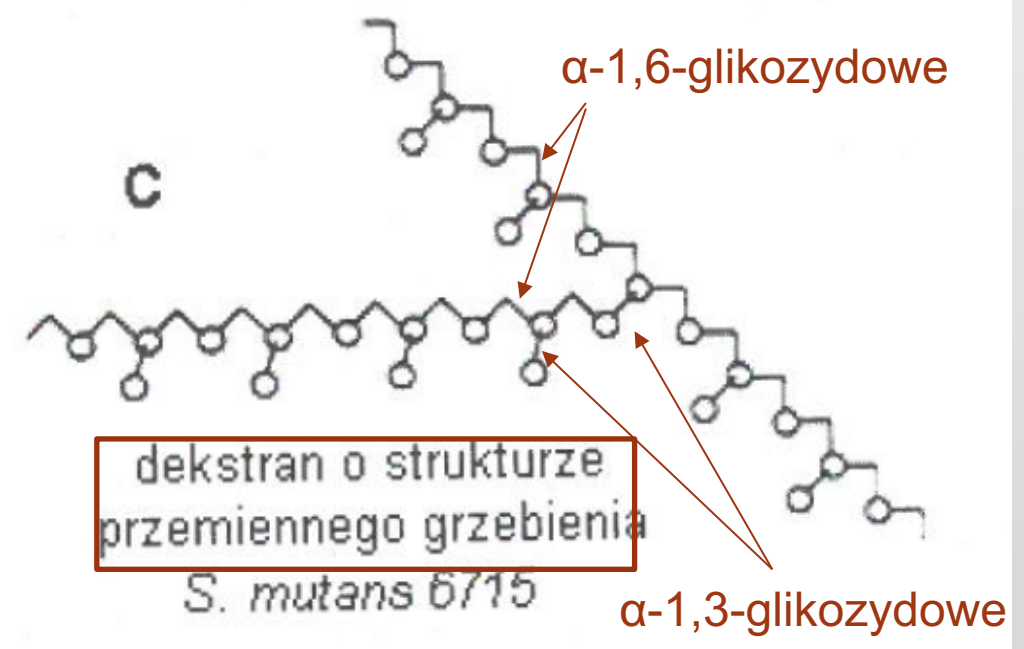
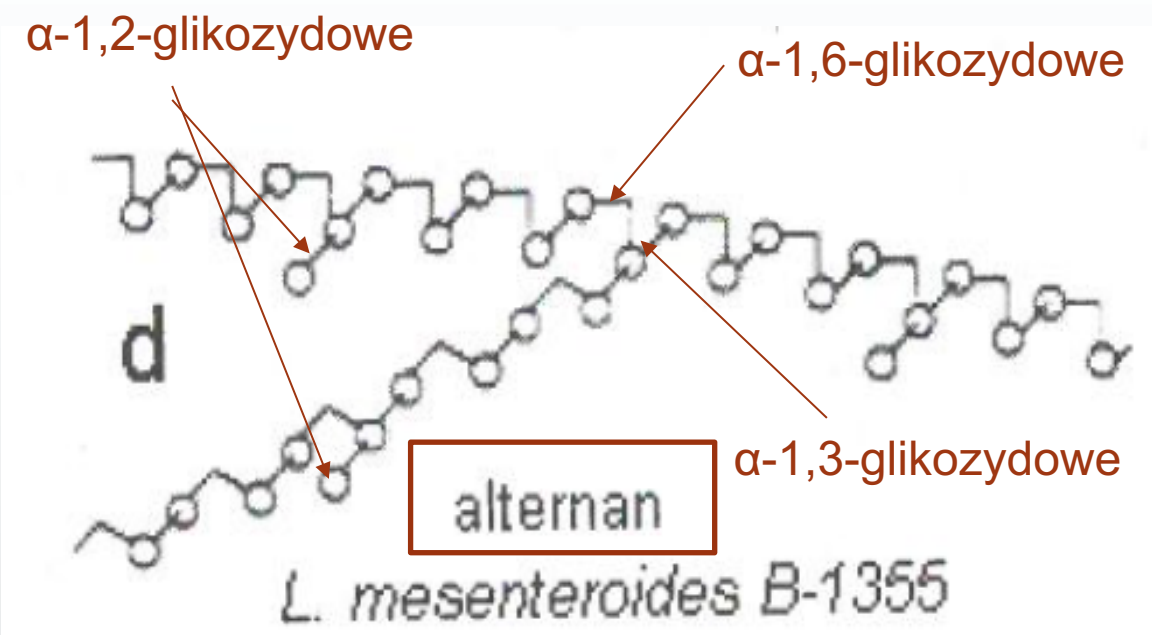
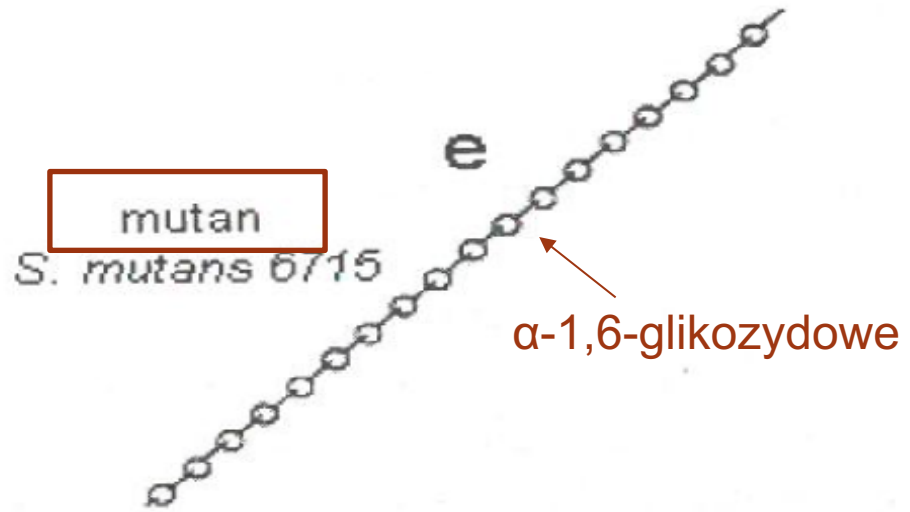
Rozgałęziona



Cykliczna









Dextran w procesie produkcji cukru

Obecność dekstranu powoduje:

- obecność dekstranu powoduje problemy podczas przerobu surowca o pogorszonej jakości
 - wzrost lepkości soków
 - spowolnienie procesu filtracji i krystalizacji
 - wzrost strat cukru
- ostatecznie prowadzi do spowolnienia procesu i zwiększenie kosztów produkcji

Eliminowanie negatywnego wpływu dekstranu

- Zapobieganie przed syntezą dekstranu
- Poprawa filtracyjności przez zastosowanie świeżo wytrąconego węgla wapnia (PCC)

- Hydroliza dekstranu dekstranazą





Dekstranaza

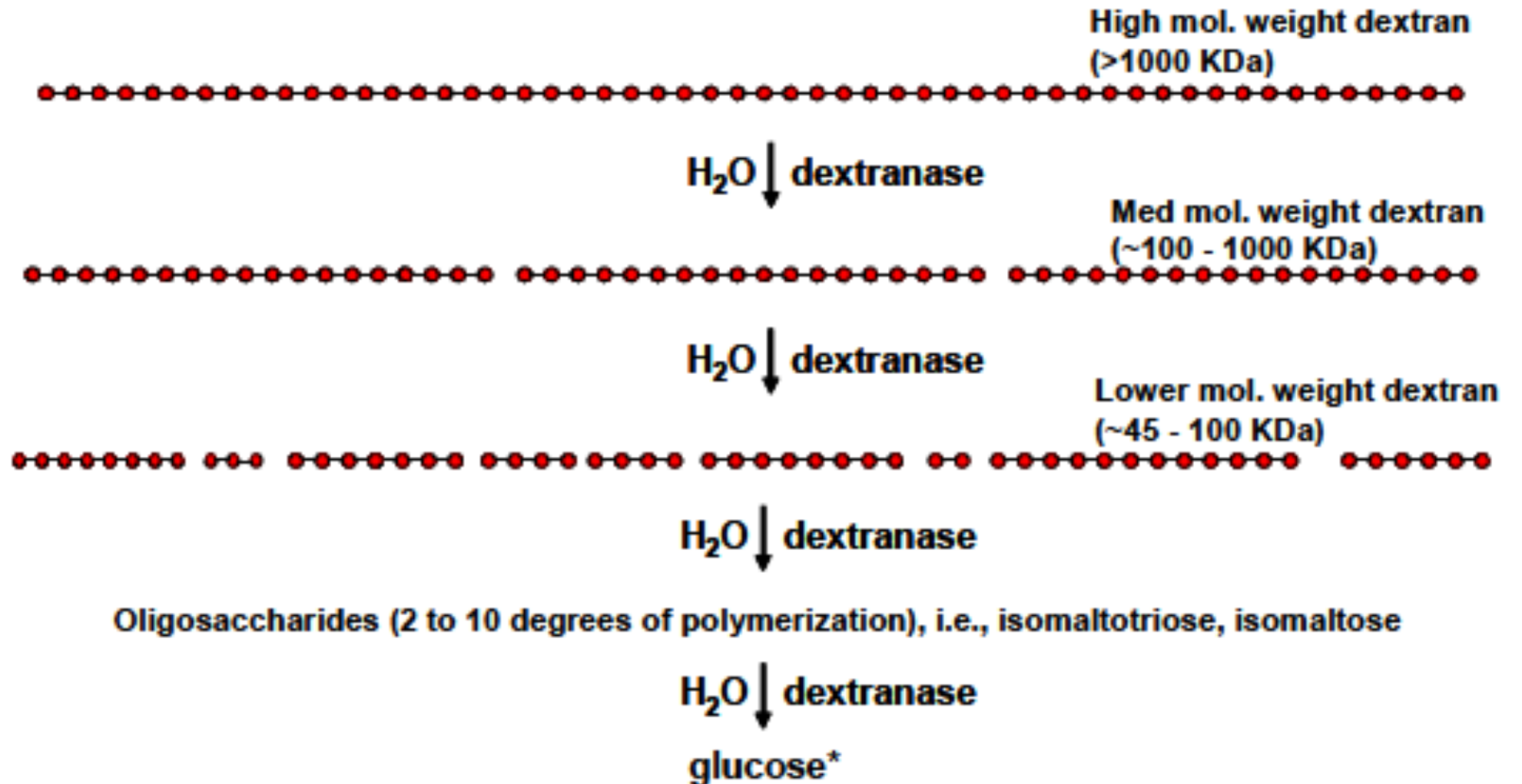
Enzym – α -1,6-D-glukano-6-glukanohydrolaza (EC 3.2.1.11)

Dekstranaza hydrolizuje wiązania **α - 1,6-glikozydowe** w **losowo wybranych miejscach**, a na skutek jej działalności następuje stopniowy **spadek średniej masy cząsteczkowej dekstranu**.



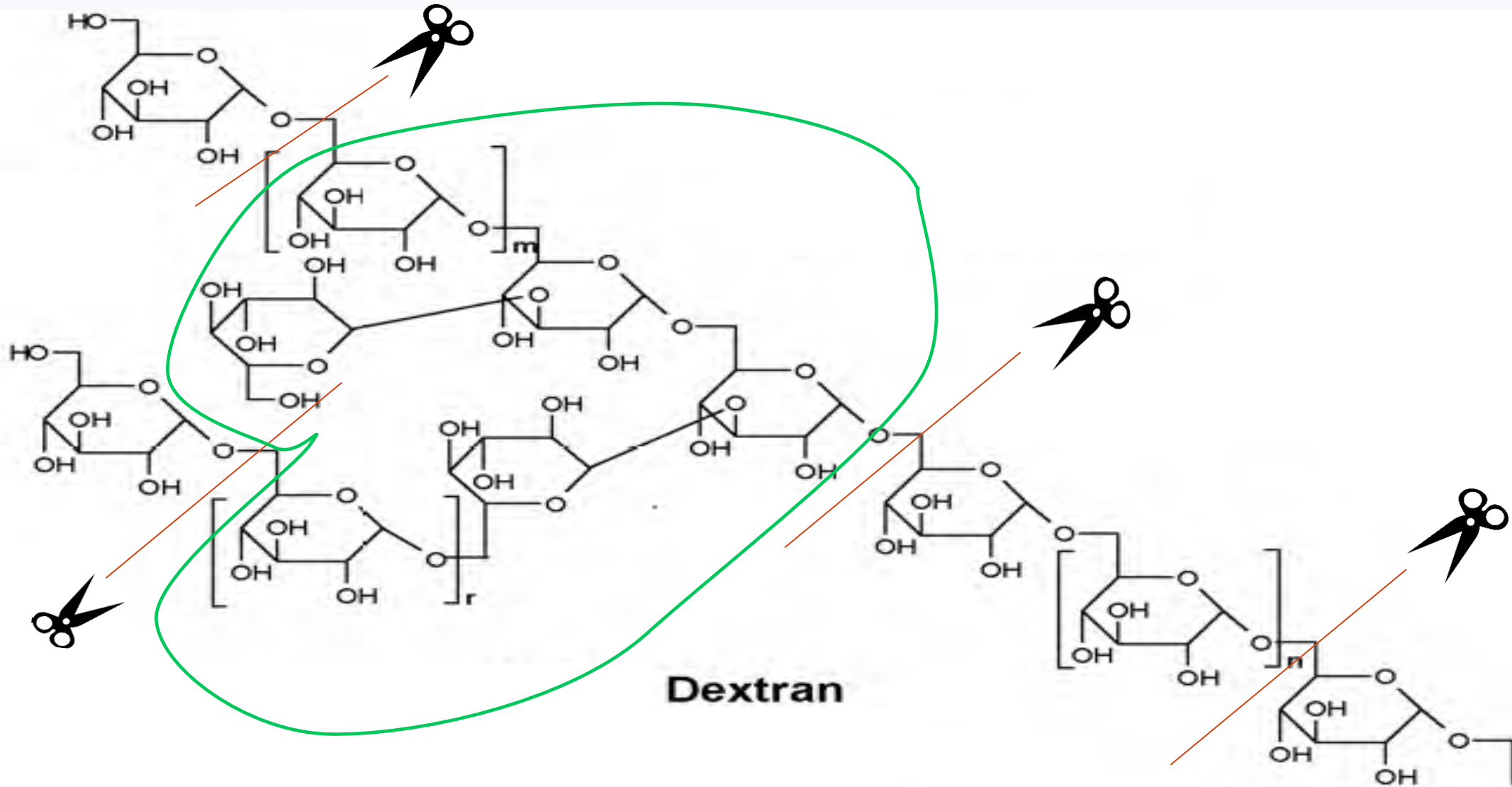


Hydroliza dekstranu





Hydroliza dekstranu





Dextranases	Source		Optimum Value			
			pH	Temperature		
	Bacteria	<i>Brevibacterium fuscum</i> var. <i>Dextranlyticum</i> [15]	7.0-7.5	NR		
		<i>Streptococcus mutans</i> [16]	5.5	37 °C		
		<i>Streptomyces anulatus</i> (two enzymes) [48]	7.0	40 y 50 °C		
		<i>Flavobacterium</i> sp. M-73 [19]	7.0	35 °C		
		<i>Thermoanaerobacter wiegelii</i> [38]	5.5	70 °C		
		Strain of <i>Thermoanaerobacter</i> [39]	4.5-5.5	80 °C		
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> [47]	5.5	65-70 °C		
		Yeast	<i>Lipomyces starkeyi</i> [21]	5.0	55 °C	
		Recombinant	Fungi	<i>Paecilomyces lilacinum</i> in <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> and <i>Griberella</i> [46]	NR	60 °C
				<i>Penicillium miniuloteum</i> in <i>Pichia pastoris</i> [32]	4.0-5.0	57 °C
	Bacteria	<i>Streptococcus sobrinus</i> in <i>Escherichia coli</i> [34]	5.3	39 °C		





Optymalne warunki pH i temperatury dla działania dekstranazy stosowanej w przemyśle cukrowniczym syntetyzowanej z różnych szczepów grzybów

Szczep	Optymalne pH	Optymalna temperatura
<i>Penicillium lilacinum</i>	5.0 – 6.0	50 – 60°C
<i>Paecilomyces lilacinum</i>		
<i>Penicilium minioluteum</i>	5.0	50°C
<i>Chaetomium gracile</i>	3.0 – 7.0	do 85°C
<i>Chaetomium erraticum</i>		

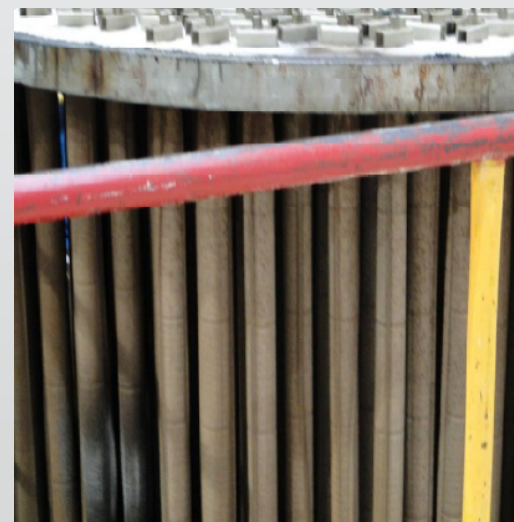
(Jimenez 2005; 2009)





Dekstranaza w przemyśle cukrowniczym

- brak ujednoliconej metody badania aktywności dekstranazy
- aktywność enzymu wyrażona w różnych jednostkach: U/g, DU/g, U/ml i DU/ml





Dekstranaza w przemyśle cukrowniczym

Dekstranaza	
skoncentrowana	nieskoncentrowana
25 000 – 58 000 DU/ml najczęściej 48 000-58 000 DU/ml	< 25 000 DU/ml najczęściej < 6 000 DU/ml





Stabilność dekstranazy w czasie

Spadek aktywności po 90 dniach (temp. 4°C)

skoncentrowana

0,5%

nieskoncentrowana

8%

Spadek aktywności po 90 dniach (temp. 25°C)

skoncentrowana

9%

nieskoncentrowana

46%





Dekstranaza skoncentrowana

- **wyższa aktywność**
- **bardziej stabilna w czasie**

Zaleca się przygotowywanie w cukrowniach „roztworów roboczych” poprzez rozcieńczenie dekstranazy skoncentrowanej (4-5 krotne rozcieńczenie, stabilizowane 24% roztworem sacharozy).

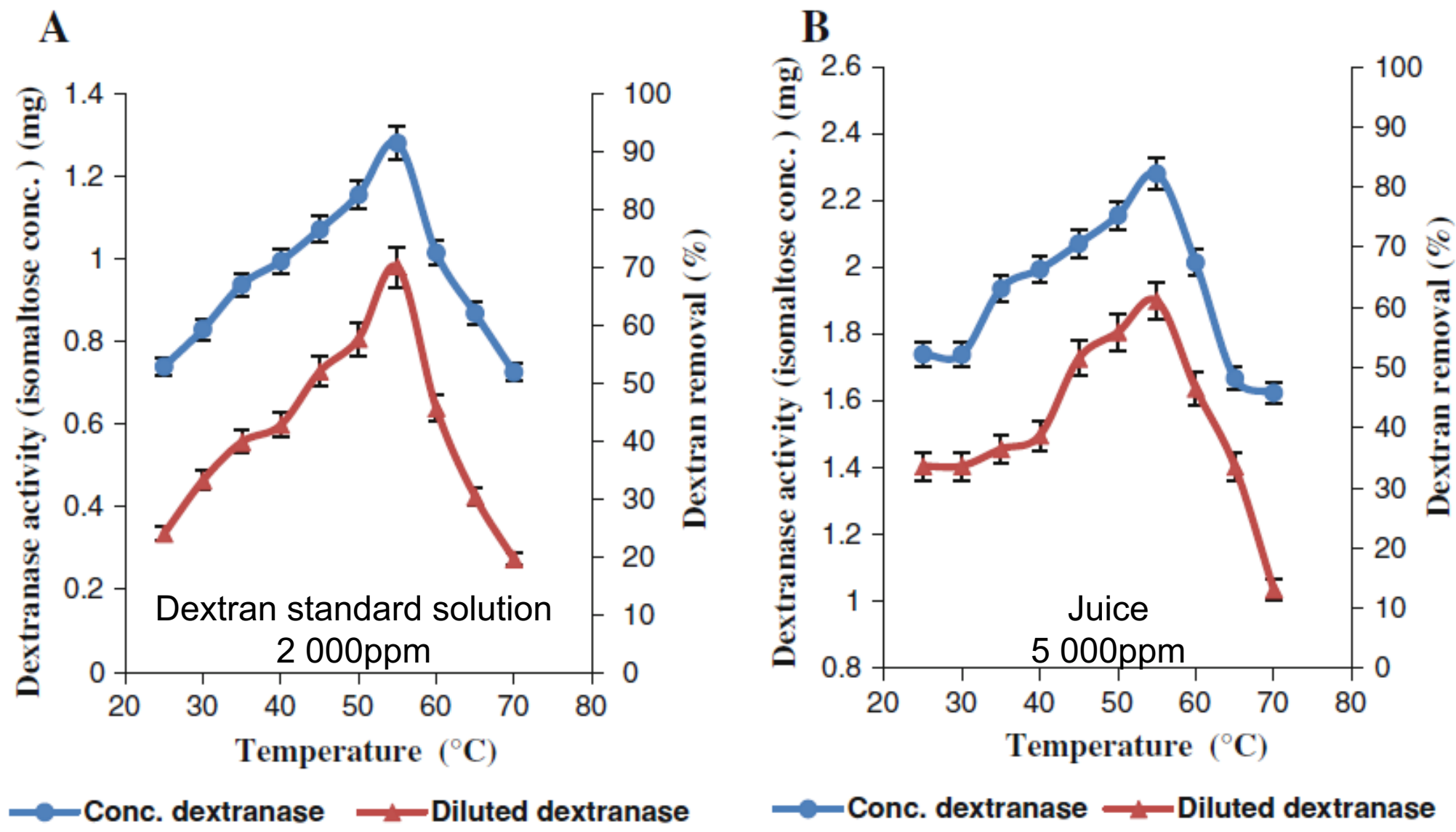


Aktywność dekstranazy regulowana jest przez kilka czynników:

- temperatura i pH środowiska
- czas reakcji
- stężenie substratu
- wyjściowa zawartości dekstranu
- rodzaju, wyjściowej aktywności oraz zastosowanej dawki enzymu

Wpływ temperatury na aktywność dekstranazy

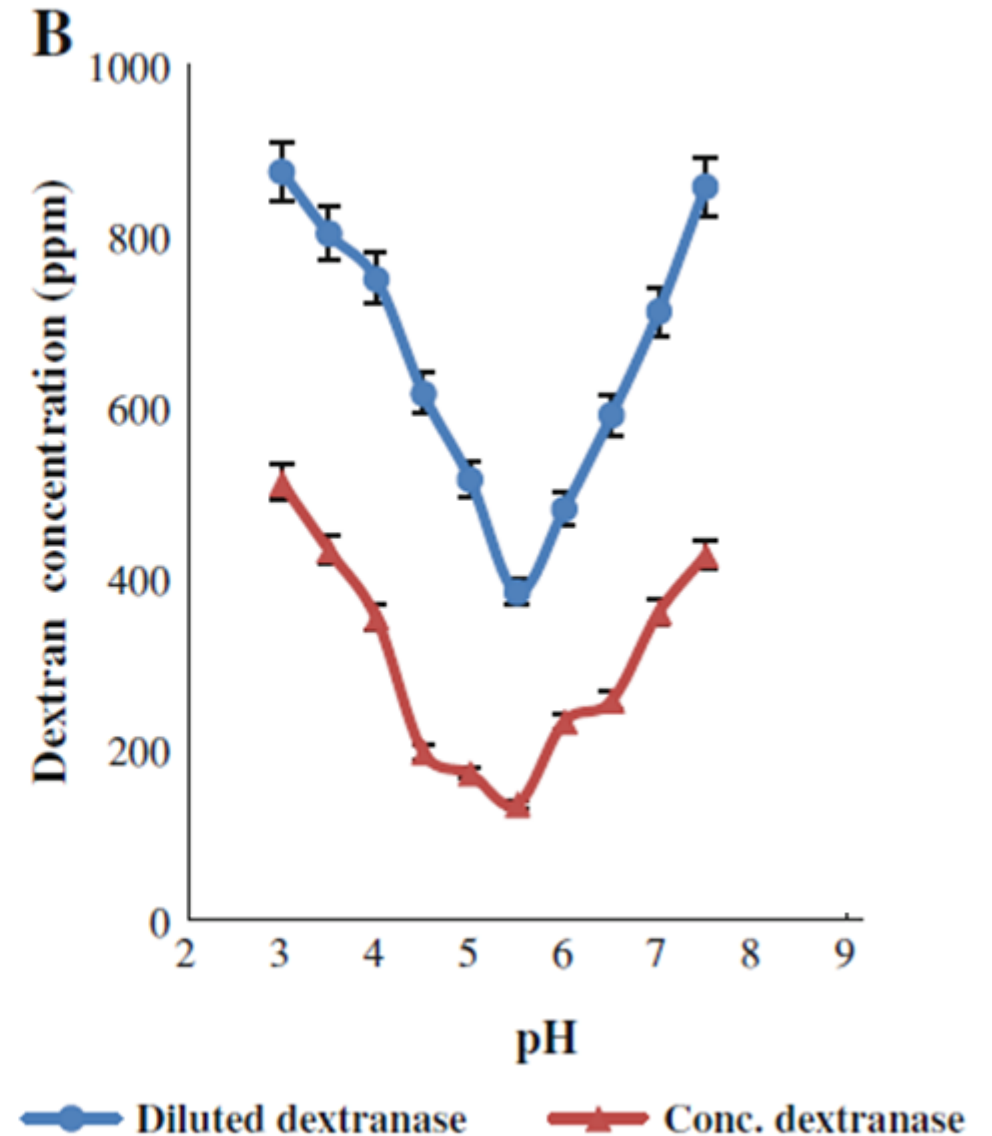
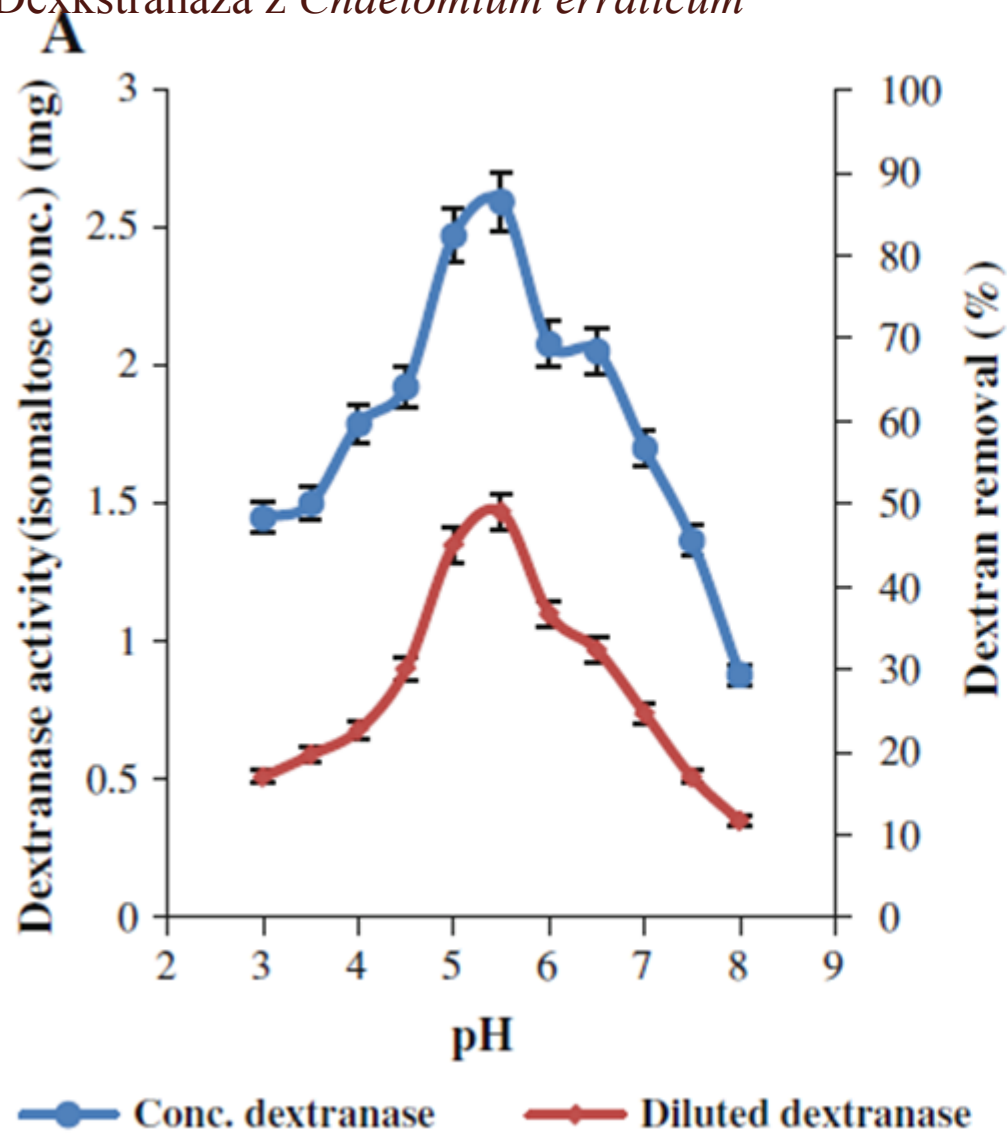
Dekstranaza z *Chaetomium erraticum*





Wpływ pH na aktywność dekstranazy

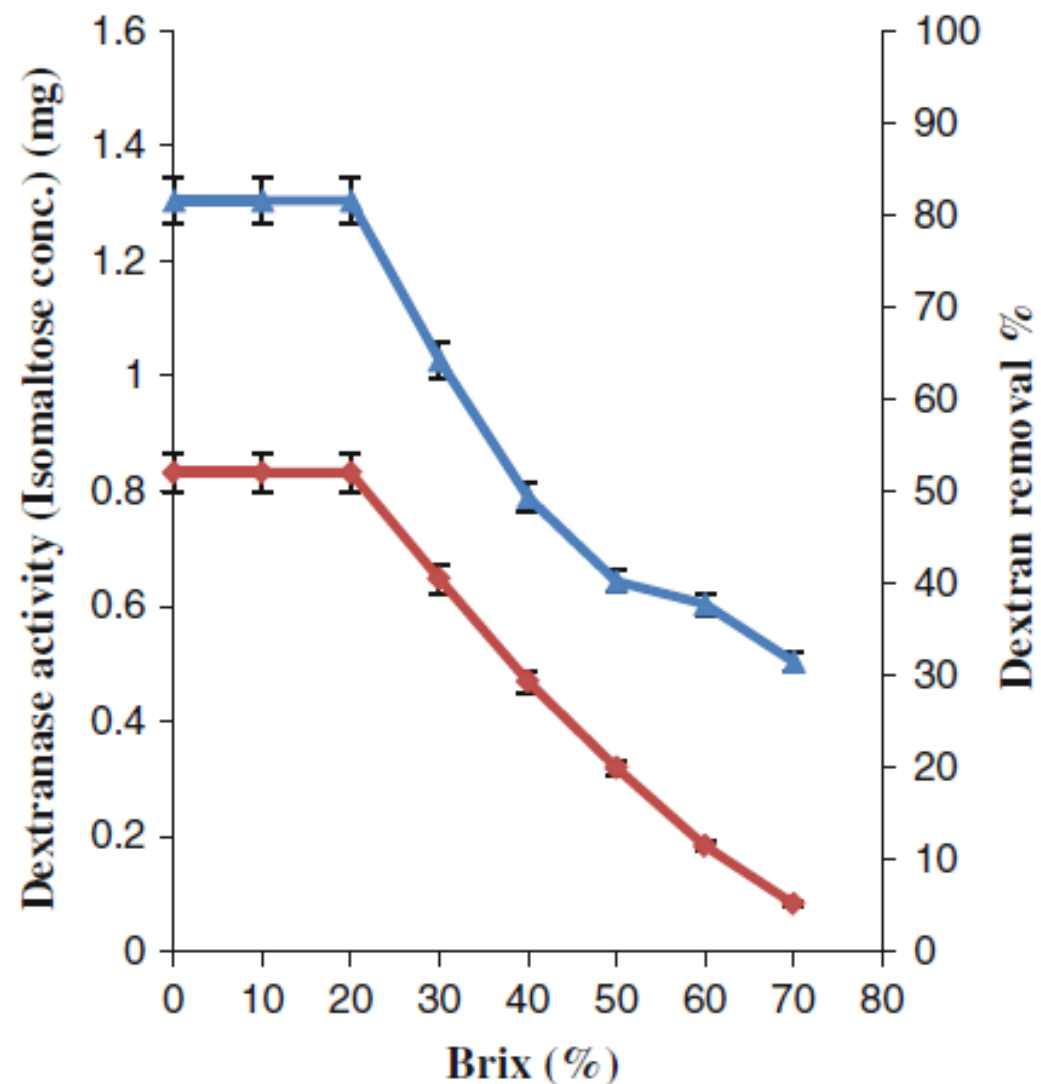
Dekstranaza z *Chaetomium erraticum*





Wpływ stężenia roztworu na aktywność dekstranazy

Dekstranaza z *Chaetomium erraticum*

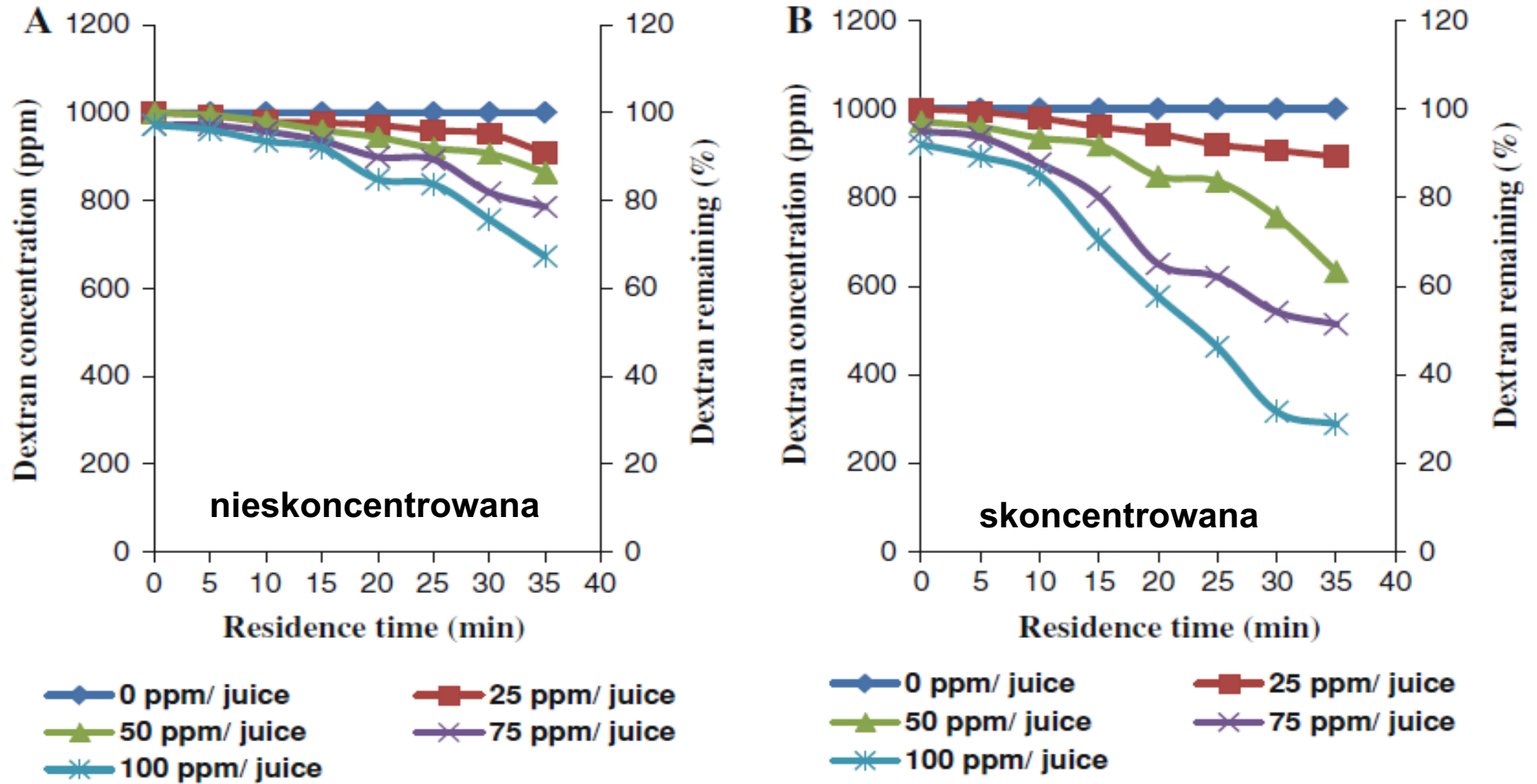


—▲— Concentrated dextranase —◆— Diluted dextranase



Wpływ czasu reakcji i stężenia enzymu na redukcję dekstranu

Dekstranaza z *Chaetomium erraticum*





Dextranaza

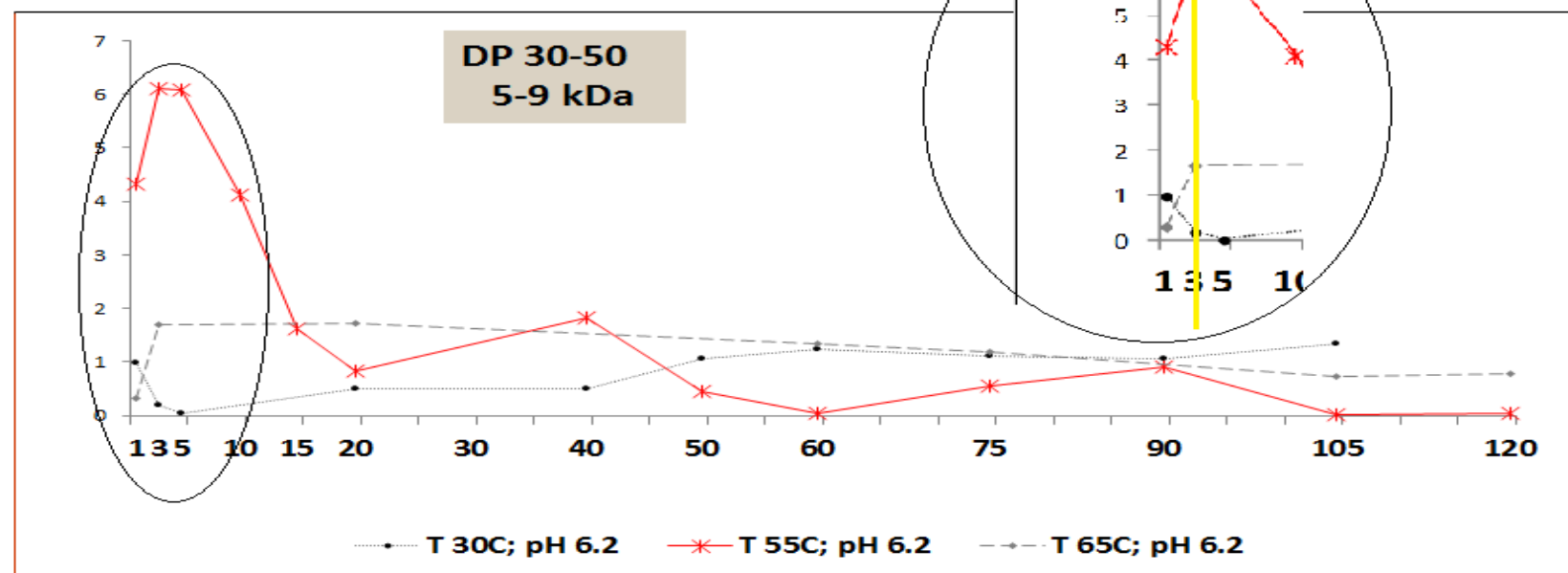
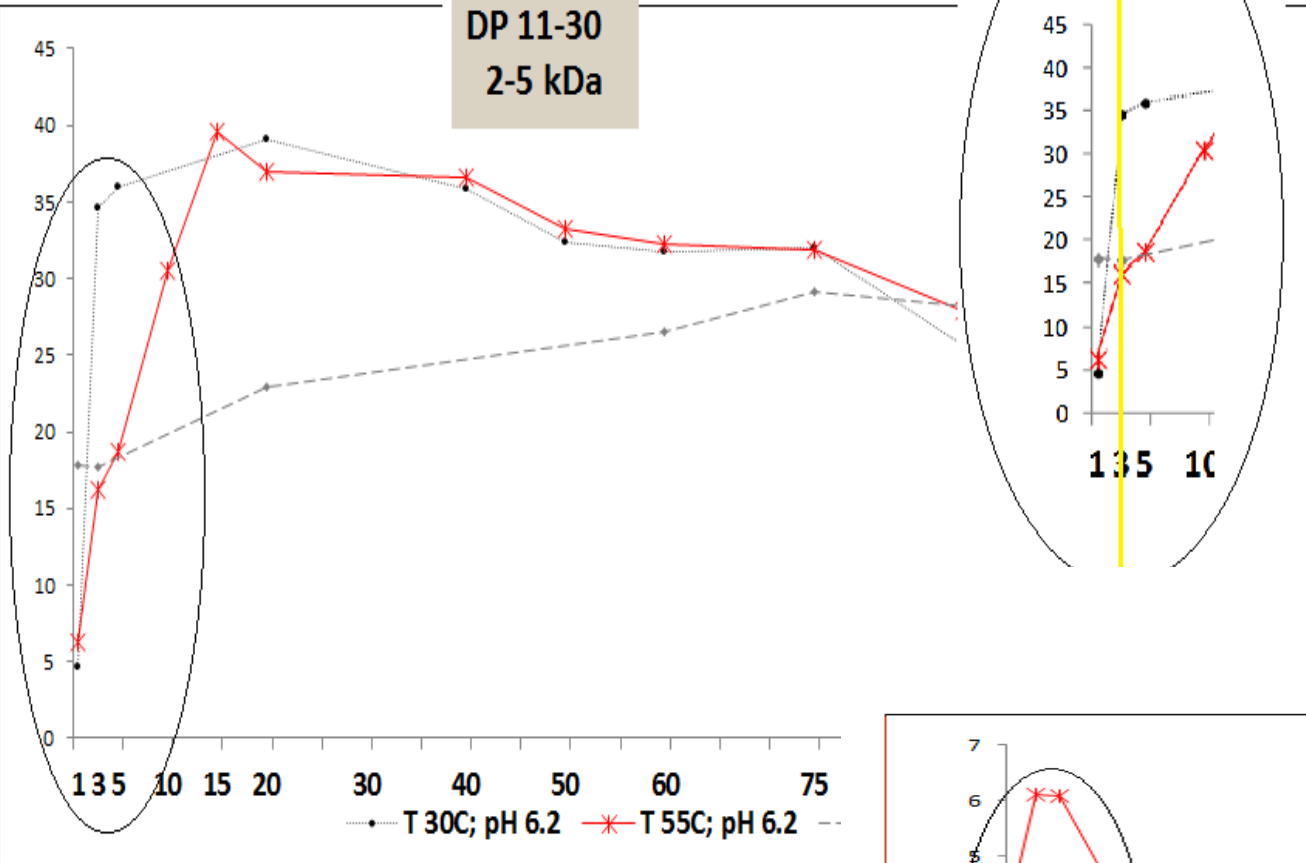
**Dawka stosowana w przemyśle: 1-10 ppm
8-10 min**

**Teoretyczna dawka dekstranazy o aktywności
6 000 DU/ml: 1 ml /1000 mg dekstranu w
soku surowym**

Przyrost oligosacharydów

- o DP 11-DP 50
- 3 - 5 minut

DP 11-30
2-5 kDa





Stosowanie dekstranazy

- **Stosowanie dekstarnazy powinno być ustalone indywidualnie dla każdego zakładu i dla aktywności posiadanej dekstranazy, uwzględniając warunki stosowania w danej cukrowni.**
- **Optymalizacja dawki powinna uwzględniać zawartość dekstranu w soku i aktywność posiadanej dekstranazy**



Wyznaczanie aktywności dekstranazy



**Na 28 Kongresie ICUMSA w 2012 r. w Cambridge,
zapropnowana została miareczkowa metoda do
wyznaczania aktywności dekstranazy,
wyrażonej w DU/ml (DU - z angielskiego „dextranase unit”).**



Jedna jednostka aktywności dekstranazy (1 DU) - to ilość enzymu, która hydrolizuje wzorcowy roztwór dekstranu T2000, produkując cukry redukujące odpowiadające sile redukcji 1 mikromola ($1 \mu\text{mol}$) tiosiarczanu sodu w czasie jednej minuty w następujących warunkach:

temperatury - $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i pH - 5.8



Zasada metody opiera się na pomiarze zawartości sumy cukrów redukujących (izomaltooligosacharydów), powstałych w wyniku hydrolizy dekstranu. Zawartość cukrów redukujących oznacza się metodą Hanes`a.



Procedura analityczna:

- przygotowanie wzorcowego roztworu dekstranu T2000
- skorygowanie pH
- dodatek dekstranazy
- inkubacja w temperaturze 37°C
- dezaktywacja enzymu we wrzącej łaźni wodnej
- miareczkowanie roztworem tiosiarczanu sodu w obecności skrobi (jako wskaźnika)
- obliczenie aktywność dekstranazy z podanego wzoru



Dziękuję za uwagę



aneta.antczak@p.lodz.pl