



Badanie kinetyki enzymatycznej hydrolizy tanin

Ryszard Pohorecki, Magdalena Galwas-Zakrzewska

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Kinetic study of enzymatic hydrolysis of tannins

Summary

Tannins are present in many plant foods. Tannase (EC 3.1.1.20) catalyses hydrolysis of ester bonds in hydrolysable gallotannins releasing glucose and gallic acid. Enzyme was produced by *Penicillium chrysogenum* cultured in Czapek-Dox medium containing tannic acid. The tannic acid was used as a substrate in the enzymatic reactions. The product inhibits the enzymatic reaction. It was determined that inhibition was of the competitive type. The mathematical model (Eq. 7) and kinetic constants describing the process were determined: $K_M = 0,53 \cdot 10^{-4} [\text{mol}/\text{dm}^3]$, $R_M = 1,26 \cdot 10^{-3} [\text{mol}/\text{dm}^3 \cdot \text{min}]$, $K_P = 2,04 \cdot 10^{-4} [\text{mol}/\text{dm}^3]$. The results obtained from the model well agree with those obtained experimentally.

Key words:

tannase, tannic acid, gallic acid, *Penicillium chrysogenum*.

1. Wprowadzenie

Taniny stanowią zróżnicowaną grupę polimerów złożonych fenoli pochodzenia roślinnego. Jedną z dokładniejszych definicji tanin sformułowana przez Horvatha w 1981 r. brzmi: „Taniną jest każdy związek fenolowy o dostatecznie dużej masie cząsteczkowej oraz dostatecznej ilości grup hydroksylowych i innych (np. karboksylowych), aby mógł utworzyć wystarczająco silne kompleksy z białkami i innymi związkami wielkocząsteczkowymi w danych warunkach” [1,2]. Wchodząc w skład produktów spożywczych (takich jak wino, herbata) taniny nadają im gorzki

Adres do korespondencji

Ryszard Pohorecki,
Wydział Inżynierii
Chemicznej i Procesowej,
Politechnika Warszawska,
ul. Waryńskiego 1,
00-645 Warszawa.

biotechnologia

2 (57) 184–192 2002

i cierpki smak. Stwierdzono również, że poza obniżeniem walorów smakowych, limitują także dostępność białek spożywczych oraz w znacznym stopniu hamują działanie enzymów trawiennych [3].

Jednym ze sposobów eliminacji tanin jest ich degradacja na drodze enzymatycznej hydrolizy. Enzymem, który bierze udział w pierwszym etapie degradacji hydrolizowanych tanin jest tanaza (E.C. 3.1.1.20). Enzym ten należy do grupy hydrolaz i katalizuje reakcję hydrolizy wiązań estrowych występujących pomiędzy kwasem galusowym i cukrem oraz wiązań pomiędzy dwiema cząsteczkami kwasu galusowego występujących w gallotaninach i ellagitantinach. Tanaza została uznana przez Organizację do Spraw Żywności i Leków (United States Food and Drug Administration) za enzym bezpieczny, dzięki czemu może być stosowany w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym [2].

Obecność tanin w tkankach roślinnych skłoniła do poszukiwania producentów acylohydrolazy tanin w królestwie roślin. Niewielką aktywność tanazy wykryto w roślinach bogatych w taniny [4]. Rośliny stanowią jednak ubogie źródło enzymu. Producentów tanazy poszukiwano zatem wśród innych organizmów. Najlepszymi producentami tanazy okazały się mikroorganizmy. Tanazę mogą wytwarzać zarówno grzyby strzępkowe, drożdże, jak również bakterie [4].

Celem pracy było zbadanie i udokumentowanie procesu biodegradacji tanin na drodze enzymatycznej hydrolizy. Końcowym rezultatem było dopasowanie modelu kinetycznego reakcji enzymatycznej hydrolizy oraz na podstawie wyników doświadczeń wyznaczenie parametrów równania kinetycznego.

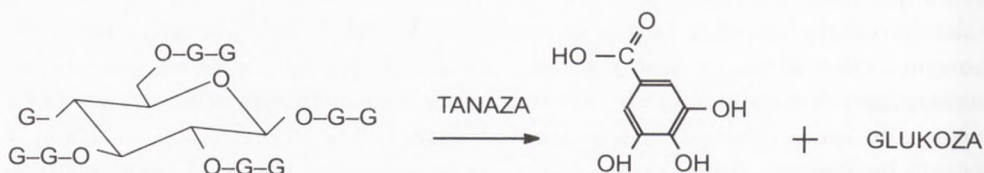
2. Materiały i metody badawcze

Enzym był wytwarzany przez szczep *Penicillium chrysogenum* otrzymany z Instytutu Technologii Mikrobiologicznej z Chandigaru (Indie). *Penicillium chrysogenum* hodowano na zmodyfikowanym podłożu Czapka-Dox z dodatkiem 3% kwasu taninowego. Hodowle prowadzono w bioreaktorze BIOSTAT® B przez 5 dni, przy pH 5,0, w temperaturze 28°C z ciągłym mieszaniem i napowietrzaniem. Tanazę z roztworu pochodowlanego wysalano siarczanem amonu. Enzym rozpuszczano w 0,01 M buforze octanowym o pH 5,0 i wykorzystywano do dalszych badań. Stężenie enzymu przeliczano na mg białka na ml.

Badania kinetyki reakcji hydrolizy prowadzono w reaktorze w temperaturze 30°C z ciągłym mieszaniem. Substrat stanowił kwas taninowy (Sigma-Aldrich) w 0,01 M buforze fosforanowym o pH 5,5. Przebieg hydrolizy śledzono na podstawie ilości powstałego kwasu galusowego oraz ubytku kwasu taninowego. W tym celu korzystano ze spektrofotometrycznej metody Bajpai [5] pozwalającej jednocześnie oznaczać stężenia kwasu galusowego i kwasu taninowego, oraz z pomiarów stężenia kwasu galusowego przy użyciu HPLC.

3. Badanie kinetyki reakcji hydrolizy

Reakcja enzymatycznej hydrolizy kwasu taninowego prowadzi do powstania kwasu galusowego i glukozy (rys. 1).



Rys. 1. Hydroliza kwasu taninowego, G – reszta kwasu galusowego, G-G – reszta kwasu m-digalusowego.

Badania kinetyki reakcji hydrolizy rozpoczęto od zbadania zależności szybkości reakcji od czasu. Szybkość reakcji r zdefiniowano jako szybkość zużycia kwasu taninowego, co zgodnie z równaniem (1) można zapisać

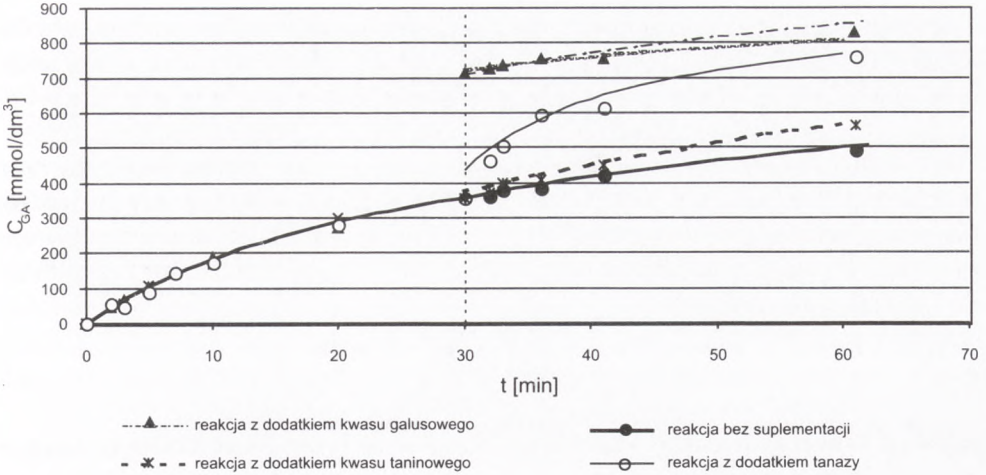
$$r = -\frac{dC_{TA}}{dt}, \quad (1)$$

gdzie r – szybkość reakcji ($\text{mol}/\text{dm}^3\text{min}$), C_{TA} – stężenie kwasu taninowego (mol/dm^3), t – czas [min].

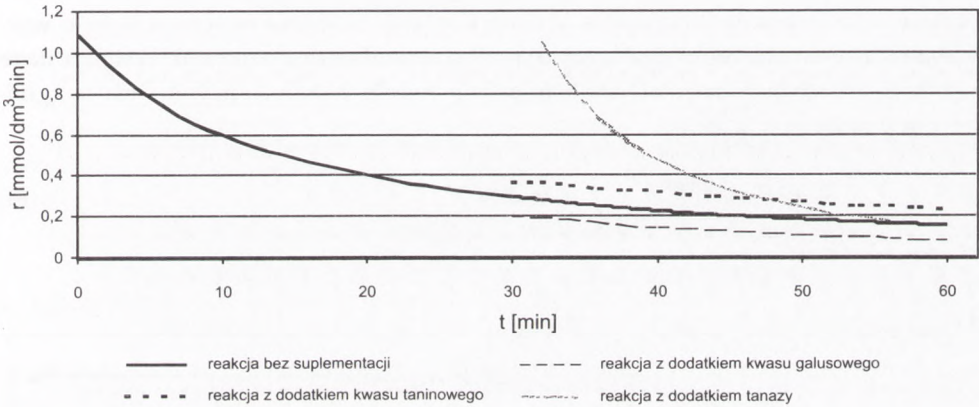
Przy identycznych warunkach początkowych poprowadzono cztery serie badań reakcji hydrolizy. Po trzydziestu minutach w pierwszej serii do mieszaniny reakcyjnej dodawano roztwór substratu, do drugiej roztwór zawierający określone stężenie produktu, a do trzeciej preparat enzymatyczny. Czwartą reakcją była prowadzona bez żadnych dodatków. Przez cały czas prowadzenia doświadczenia dokonywano pomiarów stężenia substratu TA i produktu GA. Wyniki w postaci zależności stężenia kwasu galusowego od czasu przedstawiono na rysunku 2.

Zmiany szybkości reakcji w zależności od czasu uzyskane w poszczególnych seriach badań przedstawiono na rysunku 3.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dodanie enzymu spowodowało początkowo znaczny wzrost szybkości przyrostu stężenia kwasu galusowego. W drugim przypadku dodatek substratu tylko nieznacznie zwiększył szybkość. W trzeciej serii pomiarów szybkość przyrostu stężenia kwasu galusowego po dodaniu tego produktu spadła w porównaniu z szybkością reakcji prowadzonej bez jakichkolwiek dodatków. Fakt ten dowodzi występowania inhibicji produktem jakim jest kwas galusowy.



Rys. 2. Zmiana stężenia kwasu galusowego w czasie.



Rys. 3. Zmiana szybkości reakcji w czasie.

4. Wyznaczenie stałych kinetycznych

Do opisu przebiegu reakcji enzymatycznej hydrolizy kwasu taninowego wykorzystano klasyczny opis kinetyki Michaelisa-Menten, w którym szybkość reakcji r zdefiniowana jako szybkość zaniku substratu określona jest wzorem

$$r = -\frac{dC_{TA}}{dt} = \frac{R_M C_{TA}}{K_M + C_{TA}}, \quad (2)$$

gdzie r – szybkość reakcji, K_M – stała Michaelisa-Menten, R_M – maksymalna szybkość reakcji, C_{TA} – stężenie kwasu taninowego.

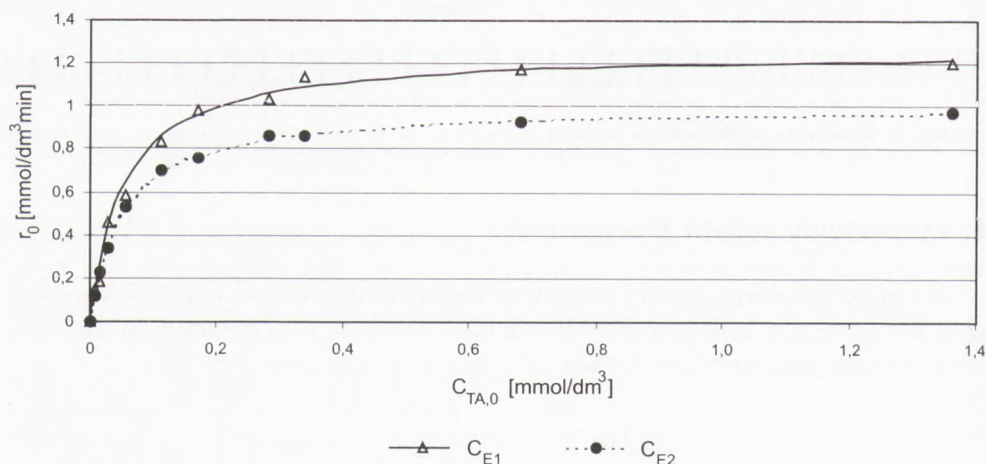
Biorąc pod uwagę występowanie w czasie reakcji inhibicji produktem, w celu wyliczenia stałych kinetycznych K_M i R_M wyznaczono zależności początkowej szybkości reakcji od początkowego stężenia substratu. Założono, że w warunkach początkowych wpływ powstającego produktu na szybkość reakcji jest pomijany. Początkową szybkość reakcji wyznaczano na podstawie pomiaru stężeń substratu oraz produktu w mieszaninie reakcyjnej po czasie $t_1 = 0,5$ i $t_2 = 1,0$ minuty prowadzenia reakcji. Proces był prowadzony przy znanym stężeniu początkowym substratu i enzymu. Prędkość początkową przy stężeniu początkowym substratu C_{TA} obliczono zgodnie z równaniem

$$r_0 = \frac{C_{TA,1} - C_{TA,2}}{t_2 - t_1}, \quad (3)$$

gdzie r_0 – początkowa szybkość reakcji, $C_{TA,1}$ – stężenie TA po czasie t_1 , $C_{TA,2}$ – stężenie TA po czasie t_2 .

Na rysunku 4 przedstawiono wyznaczone początkowe szybkości reakcji w funkcji początkowego stężenia kwasu tanninowego $C_{TA,0}$. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 30°C i pH o wartości 5,0-5,5. Stężenie enzymu C_{E1} było wyższe od stężenia enzymu C_{E2} ($C_{E2} = 0,8 \cdot C_{E1}$). Przedstawione na tym rysunku dane wskazują, że szybkość reakcji jest proporcjonalna do stężenia enzymu. Jest to zgodne z równaniem:

$$R_M = k_2 C_E. \quad (4)$$



Rys. 4. Zależność początkowej szybkości reakcji r_0 od początkowego stężenia kwasu tanninowego $C_{TA,0}$ dla różnych stężeń enzymu C_E .

Ponieważ stężenie enzymu określano na podstawie stężenia białka w mieszaninie reakcyjnej, w celu wyznaczenia stałej R_M zdecydowano jej wartość podawać w przeliczeniu na 100 mg białka.

Krzywa zależności szybkości reakcji r od stężenia kwasu taninowego C_{TA} zgodnie z równaniem M-M ma charakter hiperboli. Wyznaczenie rzeczywistych wartości R_M i K_M w sposób graficzny może być bardzo niedokładne i dlatego też nie korzystano z tej metody. Zrezygnowano również z wyznaczania parametrów kinetycznych metodami Lineweavera-Burka czy Woolfa. Pierwsza z metod nie gwarantuje zadowalającej dokładności, zwłaszcza w zakresie najmniejszych stężeń, gdzie błąd pomiaru może być stosunkowo największy. W drugiej z metod na wynik estymacji wpływają głównie wartości wyznaczone przy dużych stężeniach substratu.

W celu wyznaczenia parametrów kinetycznych w równaniu Michaelisa-Menten wykorzystano program obliczeniowy Mathcad 2000 Professional. W efekcie uzyskano następujące wartości maksymalnej szybkości i stałej Michaelisa-Menten:

$$K_M = 0,53 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3},$$

$$R_M = 1,26 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3 \text{min}}.$$

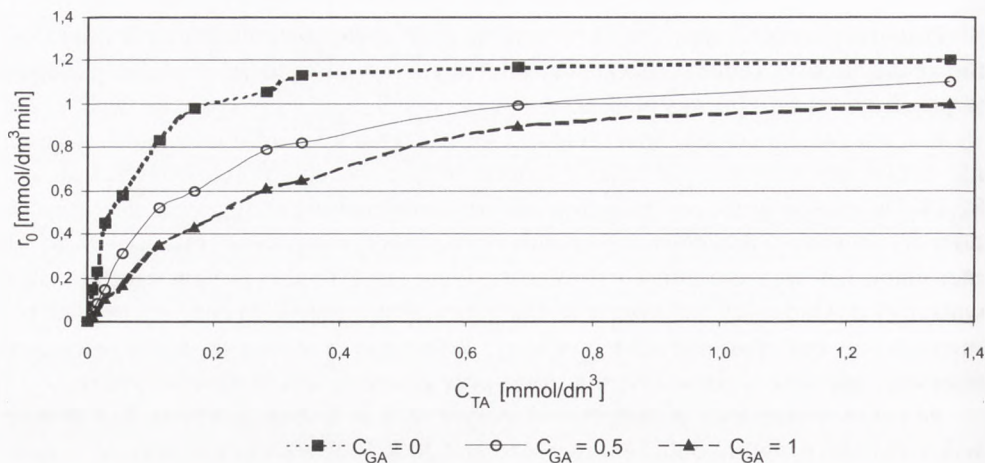
Są to wartości porównywalne z wartościami cytowanymi [4] dla reakcji hydrolizy kwasu taninowego przez tanazę wytwarzaną przez inne mikroorganizmy. W przypadku tanazy wytwarzanej przez *Aspergillus niger* $K_M = 0,48 \cdot 10^{-4} \text{mol/dm}^3$.

5. Określenie typu inhibicji

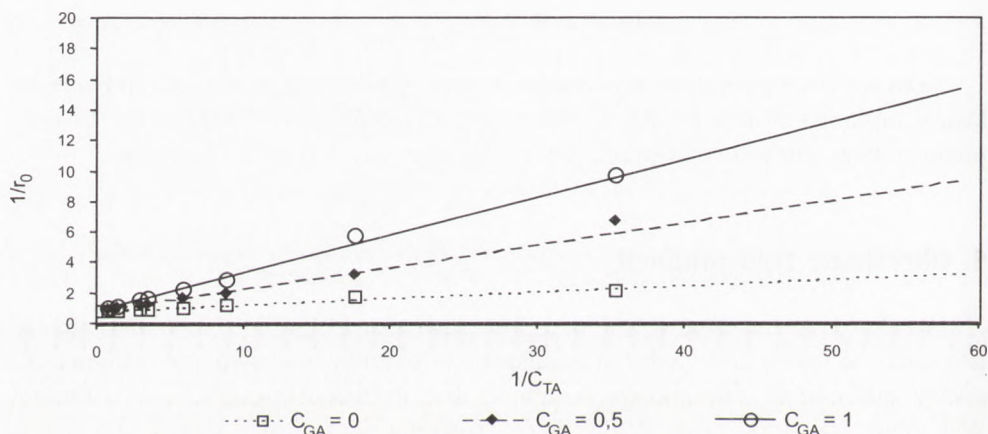
W celu określenia typu występującej w czasie procesu inhibicji produktem przeprowadzono szereg doświadczeń dodając do mieszaniny reakcyjnej określone ilości kwasu galusowego. Początkowe stężenie substratu wynosiło od 0,01 do 10 mmol. Wykonano trzy serie prób. W pierwszej, stężenie początkowe kwasu galusowego wynosiło 1%, w drugiej – 0,5%. Trzecią próbę przeprowadzono bez dodawania inhibitora. Wyznaczone początkowe szybkości reakcji w zależności od stężenia substratu przedstawiono na rysunku 5.

W celu określenia typu występującej inhibicji skorzystano z metod Lineweavera-Burka, Woolfa i Hofsteego. Wykres Lineweavera-Burka przedstawiono na rysunku 6.

Na podstawie wszystkich przedstawionych wykresów dowiedziono, że inhibicja występująca w czasie reakcji hydrolizy jest inhibicją typu współzawodniczącego. Oznacza to, że produkt konkuruje z substratem i blokuje enzym łącząc się z jego



Rys. 5. Zestawienie zależności początkowej szybkości reakcji do stężenia substratu przy różnych stężeniach inhibitora.

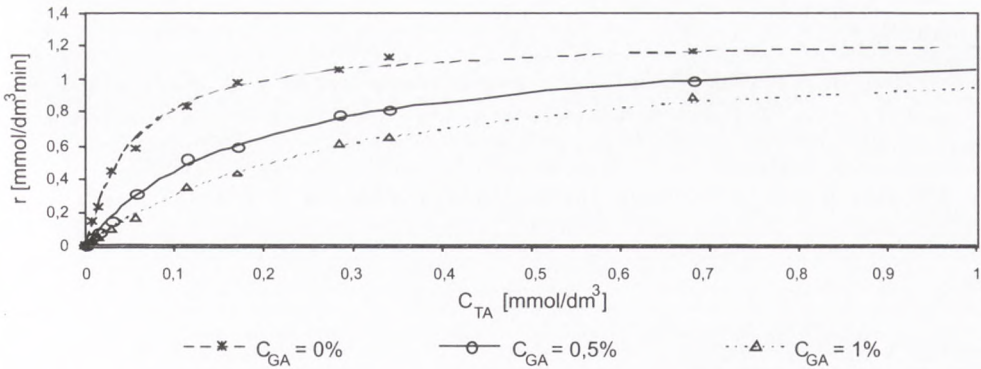


Rys. 6. Określenie typu inhibicji metodą Lineweavera-Burka.

centrum aktywnym. Równanie kinetyczne będące modyfikacją modelu Michaelisa-Menten dla modelu z inhibicją współzawodniczącą produktem ma postać

$$r = -\frac{dC_{TA}}{dt} = \frac{R_M C_{TA}}{K_M \left(1 + \frac{C_{GA}}{K_I} \right) + C_{TA}}, \quad (5)$$

gdzie K_I – stała inhibicji, C_{GA} – stężenie kwasu galusowego będącego inhibitorem.



Rys. 7. Porównanie wyników doświadczalnych oznaczonych punktami z wynikami modelowymi przedstawionymi jako krzywe zależności szybkości reakcji od początkowego stężenia substratu.

Korzystając z programu obliczeniowego Mathcad 2000 Professional na podstawie otrzymanych wyników i dla wyliczonych wcześniej stałej Michaelisa-Menten K_M i maksymalnej szybkości R_M wyznaczono stałą inhibicji K_I , która wynosi

$$K_I = 2,04 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}.$$

Na podstawie wyznaczonego równania kinetycznego i po określeniu stałych kinetycznych porównano wyniki doświadczalne z krzywymi modelowymi. Porównanie to zostało przedstawione na rysunku 7.

Przedstawione na rysunku dane świadczą o dobrej zgodności danych doświadczalnych z przyjętym modelem kinetycznym. Równanie kinetyczne opisujące przebieg enzymatycznej hydrolizy kwasu taninowego ma postać:

$$r = \frac{1,26 \cdot 10^{-3} C_{TA}}{0,53 \cdot 10^{-4} \left(1 + \frac{C_{GA}}{2,04 \cdot 10^{-3}} \right) + C_{TA}}. \quad (7)$$

6. Podsumowanie

Przedstawiono wyniki badań procesu biodegradacji tanin na drodze enzymatycznej hydrolizy. Stwierdzono, że przebieg reakcji enzymatycznej hydrolizy kwasu taninowego katalizowanej przez tanazę można opisać kinetyką Michaelisa-Menten z inhibicją współzawodniczącą oraz wyznaczono parametry równania w prezentowanym modelu kinetycznym.

Literatura

1. Mueller-Harvey I., (2000), *Animal Feed Science and Technology*, 91, 3-20.
2. Tannin home page, (1999), www.abc.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin, Cornell University.
3. Chung K-T., Wei Ch-I., Johnson M. G., (1998), *Trends in Food Science and Technology*, 9, 168-175.
4. Lekha P. K., Lonsane B. K., (1997), *Advances in Applied Microbiology*, 44, 215-260.
5. Bajpai B., Patil S., (1997), *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 612-614.