

5. Mikrobiális poliszacharidok



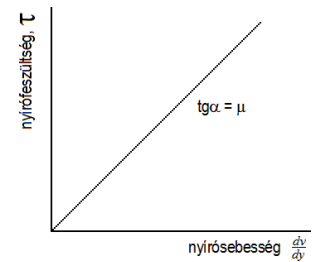
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Reológiai alapok

$$\text{viszkozitás} = \frac{\text{nyírófeszültség}}{\text{nyírósebesség}}$$

$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$



Newtoni fluidum



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Mikrobiális poliszacharidok

Az ipari léptékben termelt/használt poliszacharidok túlnyomó része növényi eredetű:

keményítő (többféleképpen módosítják is), cellulóz, pektin, agar-agar, inulin, guar gum

De egyes speciális célokra terjednek a mikrobiális poliszacharidok is:

- gélképzés
- speciális reológia (pseudoplasztikus, tixotróp, viszkoelasztikus oldatok)
- a növényi poliszacharidok helyettesítése

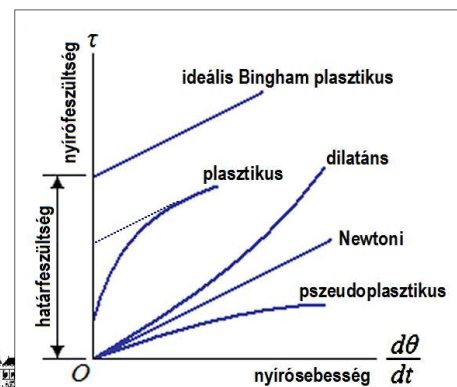


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

2

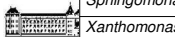
Reológiai alaptípusok



5

Ipari mikrobiális poliszacharidok

Termelő törzs	Poliszacharid
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Szukcinoglikán
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Szukcinoglikán
<i>Rhizobium meliloti</i>	Szukcinoglikán
<i>Halomonas eurihalina</i>	Leván
<i>Zymomonas mobilis</i>	Leván
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	Glükán
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dextrán
<i>Gluconacetobacter xylinum</i>	Cellulóz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alginát
<i>Pseudomonas putida</i>	Alginát
<i>Sphingomonas elodea</i>	Gellán
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Gellán
<i>Xanthomonas sp.</i>	Xantán



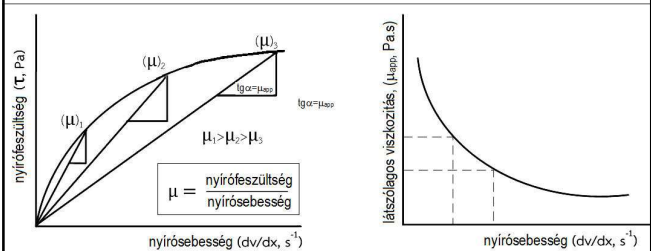
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

3

Pseudoplasztikus folyadék

kis nyíróerő – nagy viszkozitás;
nagy nyíróerő – kis viszkozitás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

6


Mikrobiális poliszacharidok

A poliszacharidok biológiai funkciója:

- Védelem kiszáradás ellen
- Rögzítés felületen
- Védelem fagocitózis, fágok ellen
- Tartalék tápanyag (xantán nem)
- Immunológiai determináns

Lokalizáció:

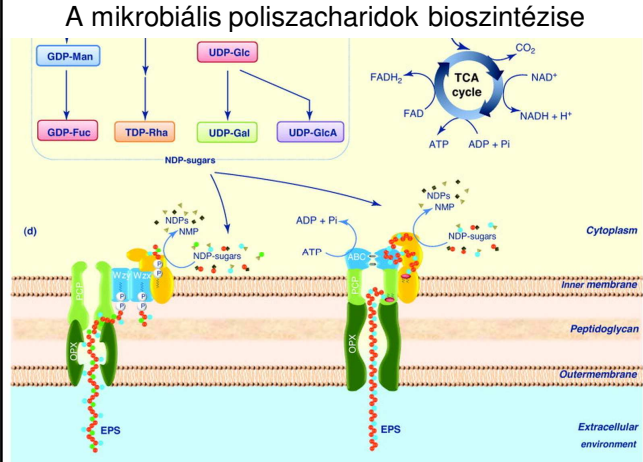
- extracelluláris (oldat, nyálka)
- sejtfalhoz kötve
- sejtmembránhoz kötve



7

7

A mikrobiális poliszacharidok bioszintézise



10

10


Exopoliszacharidok szerkezete

Homopolimerek: egyféle monomerből épülnek fel

- dextrán (glükóz)
- leván (fruktóz)
- kurdlán (glükóz)
- pullulán (glükóz)
- szkleroglükán (glükóz)

Heteropolimerek: ismétlődő egységei többféle molekulából tevődnek össze

- xantán (glükóz, mannóz, glükuronsav, ecetsav, piruvát)
- gellán (glükóz, glükuronsav, ramnóz)
- alginátok (guluronsav, mannuronsav)




8

8

Poliszacharidok fermentációja

Közös jellemzők:

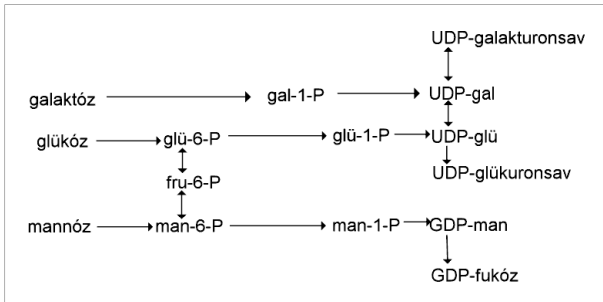
Tápközeg: normál, C-forrás: glükóz, speciálisan szacharóz (dextrán, leván)
 bőséges C-ellátás kell (C/N arány > 10)
 pH=6-7,5 (baktériumok), sav keletkezik – szabályozás lúggal
 Levegőztetés: igen intenzív, mert a viszkozus közegben nehéz megfelelő anyagátadást elérni → különleges keverők
 Downstream műveletek:
 szerves oldószeres kicsapás: metanol, etanol, aceton, propanolok
 (porlasztva) szárítás




11

11

A mikrobiális poliszacharidok bioszintézise



Templát: UDP, GDP




9

9

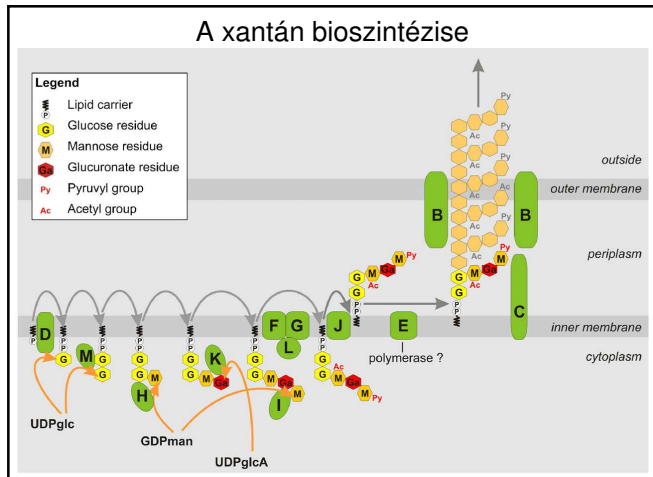
Xantán

Szerkezete:

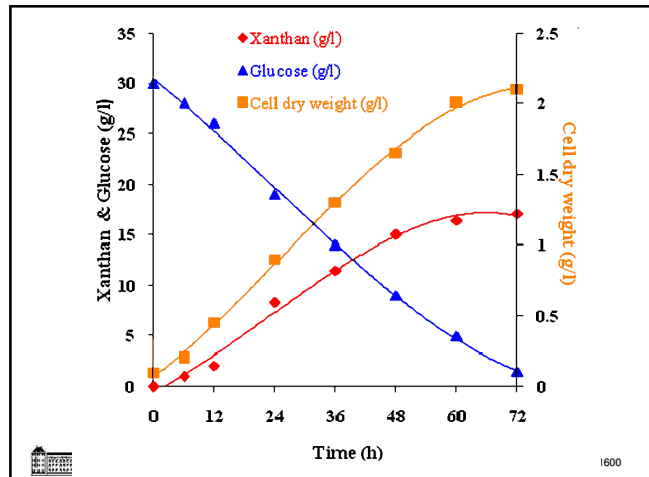
$$\begin{matrix} \rightarrow 4\text{-glükóz-}\beta (1 \rightarrow 4)\text{-glükóz}\beta (1 \rightarrow 3) \\ \uparrow \\ 1\alpha \\ \text{mannóz-}\beta (1 \rightarrow 4)\text{-glükuronsav-}\beta (1 \rightarrow 2)\text{-mannóz-OAc} \\ \text{(ketal)} \quad \text{(észter)} \\ \text{Me} \quad \text{COOH} \end{matrix}$$


12

12



13



16

Xantán gyártás

Gyártás: ~100.000 t/év (erősen ingadozik)

Törzs: *Xanthomonas campestris* – növénypatogén (káposzta, gyümölcsfák) – a technológiából nem kerülhet ki élő sejt (kimenő levegő szűrése, lé utópasztórozése)

A xantán burok miatt rossz az anyagátadás a környezettel → lassan növekszik, más törzsek könnyen túl nőnek

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 14

14

Xantán fermentáció levegőztetése

Levegőztetés: a pseudoplasztikus lé miatt rossz a tömegátadás, speciális, nagy átmérőjű keverők, ne legyenek holt terek.

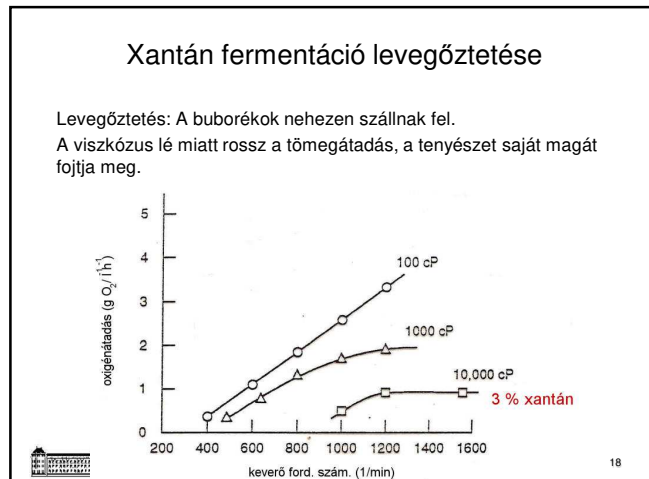
17

Xantán fermentáció

C-forrás: glükóz (4-5 %),
 N-forrás: komplex, szerves anyagok (0,05 - 0,1%)
 Magas C/N arány, – N limit
 Hőmérséklet: 28-31 °C
 pH: 7 ± 0,3 , a képződő savakat közömbösíteni kell, pH = 5 körül a termelés már lelassul.
 Fermentációs idő: 40-48 óra
 Konverzió: 68-70 %, azaz 25-30 g/l
 A (látszólagos) viszkozitás 10-30.000 cP (= milliPa.s) -ig emelkedhet

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 15

15



18

A xantán feldolgozása

Hőkezelés: 80-100 °C-on pasztörözés, a mikrobák előlése

Kicsapás: valamelyik alkohollal (metanol – izopropanol)

Elválasztás: centrifugával

Szárítás: max. 50°C-on, tálcás vagy vákuum szárító

Őrlés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

19

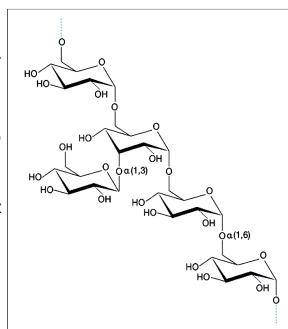
Dextrán

Szerkezete: elágazó láncú glükóz polimer.

A kötések túlnyomó része $\alpha(1-6)$, mellette kb. 5% $\alpha(1-3)$.

A lánc elején egyetlen fruktóz van.

Viszkózus, de nem gélesedik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

22

Xantán felhasználása

60 % Élelmiszeripar:

cukorkamáz, saláta-dresszing, fagyalt, jam, szósz:
viszkozitás növelő

15 % fogpaszta, emulziós festékek (cseppenésmentes festék),
textilipar

15 % olajipar: fúrásnál másodlagos olajkinyerés (víz helyett),
fúróöblítő folyadék



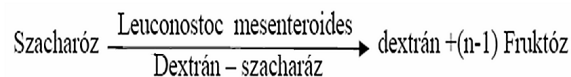
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

20

Dextrán előállítása

Bioszintézise:



Egylépéses biokonverzió: transzglykizálás (ld. BIM)

Irreverzibilis reakció: ~100% konverzió

Lehetne az enzimet tiszta formában kinyerni (extracelluláris), de a fermentáléban végrehajtani gazdaságosabb.

Cukorgyárakban: léfertőződés - dugulások



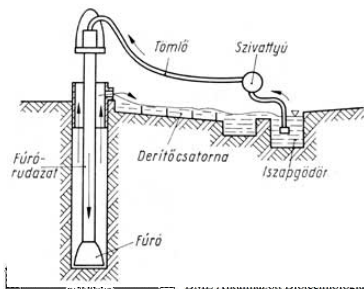
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

23

Xantán felhasználása

Fúróöblítő folyadék: olajfúrásnál a fúrófej körül erős nyírás érvényesül – kicsi a viszkozitás, jó a hűtés. A felszálló áramlásban kicsi a nyírás - nagy a viszkozitás, lassítja a kötőtermék üledését.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

Dextrán fermentációja

BIOGAL technológia:

- *L. mesenteroides* – tejsavbaktérium, anaerob
- előbb a sejtiszorítás, aztán a konverzió
- tápoldat: 10-20% szacharóz + 2% CSL + foszfát
- levegőztetés nem kell, csak keverés
- pH szabályozás: 5,0-5,2 a képződő tejsavat közömbösíteni kell
- 0,5 g/l baktérium ~80 g/l dextránt (átlagos móltömeg: ~500.000) termel
- Kinyerés: kicsapás alkoholokkal, szűrés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

24

Dextrán felhasználása

Vérplazma pótlásra: csak a 40-70.000 Daltonos frakció felel meg, ezért hidrolízissel aprítani kell:

- sósavas hidrolízis 100 °C-on, vagy
- enzimes hidrolízis: dextranáz (*P. funiculosus*)
azután:

frakcionált kicsapás alkoholokkal:

kis molekulatömegű, 40 kDa és 60-70 kDa frakciók → vérplazma pótlók

nagy molekulatömegű frakció → vissza a hidrolízisbe

Sephadex gélek (gélkromatográfia): térhálósított dextrán



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

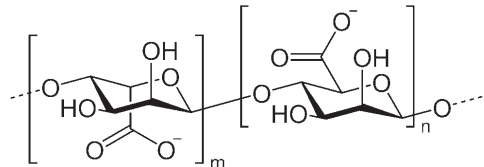
25

25

„Helyettesítő” mikrobiális poliszacharidok Algínát

Barnamoszatok sejtfalában fordul elő (*Laminaria* fajok, *Macrocystis pirifera*), innen nyerték ki, de ma fermentálják is (*Azotobacter vinelandii*, *Ps. aeruginosa*).

Mannuronsav β(1-4) és α-guluronsav polimer, homopolimer blokkok váltják egymást → erősen anionos jellegű (vö. pektin)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

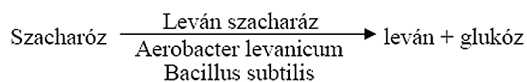
28

28

Leván

Fruktóz polimer (2-6 fruktozid kötés).

Bioszintézis: analóg a dextránnal: transzglykozilálás



- Sokféle törzs termeli
- Konverzió: ~62%
- Felhasználás: oldata viszkózus, de newtoni
 - élelmiszeripar
 - gyógyszeripar
 - kozmetikai és festékipar (gumiarábikum helyett)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

26

Algínát

Viszkózus, gumiszerű anyag, vízben nem oldódik, de sok vizet köt meg.

Kationkötő, kationcserélő, Ca²⁺ ionokkal gélt képez (sejtek bezárása)
Felhasználása:

- élelmiszerekben sűrítőanyagként, stabilizálószerként, zselésítő anyagként, valamint emulgeálószerként használják E400 néven.
- a gyógyszeriparban széles körben alkalmazzák
- égési sérülések esetén elősegíti a sérült rész gyógyulását
- fémmérgezés esetén fémionok megkötésére használják



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

29

Gellán

Ismétlődő tetraszacharidokból áll, szerkezete: glükóz-glükuronsav-glükóz-ramnóz, ecetsav és glicerinsav csoportokkal.



Tulajdonságai a xantánra hasonlítanak.

Agar helyett táptalaj gélesítésére is használható.

Élelmiszeriparban kemény és átlátszó géleket, bevonatokat lehet vele készíteni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

27

Mikrobiális cellulóz

Szerkezetileg azonos a növényi cellulózzal, β-(1,4)-glükopiranoz de nem kapcsolódik hozzá hemicellulóz, pektin és lignin.

Nagy tisztaságú, kristályos szerkezetű, erősebb gélt képez és nagyobb a vízkötő kapacitása, mint a növényinek.

Élelmiszeripari és orvosi alkalmazása igen széleskörű.

Az *A. xylinum* törzsszel termelik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

30

Heparin

Többféleképpen szulfonált mukopoliszacharid, Ca-só formájában hozzák forgalomba.

Antikoaguláns = Véralvadásgátló

Az állati (emberi) szervezet termeli eredetileg szervextrakcióval gyártották.

Helyette: *E. coli*-val termelnek kondroitin szulfátot, majd ebből emlős sejtekkel hozzák létre a heparint.

31

A ciklodextrinek bioszintézise

Egylépéses biokonverzió ciklodextrin-glikozil-transzferázzal (CGTáz)

34

Ciklodextrinek (CD, Schardinger dextrinek)

32

A ciklodextrinek bioszintézise

Subsztrát: lineáris dextrinek (elfolyósított keményítő), többféle termék keletkezik párhuzamosan. A reakció egyensúlyi, a termékek egymásba átalakulnak.

Termékinhibíció: a keletkező CD gátolja az enzimet.

35

A ciklodextrinek méretei

α -, β -, γ -ciklodextrinek: 6,7,8 glükóz egység

A gyűrű belső része enyhén apoláros, megfelelő partnerrel zárvány-molekulát képez.

33

A ciklodextrinek bioszintézise

α -amilázzal hidrolizált (burgonya) keményítő $\xrightarrow{\text{ciklodextrin-glikozil-transzferáz (CGT-áz)}}$ (lineáris és) gyűrűs dextrinek \longrightarrow CD izolálás

Egylépéses biokonverzió: ciklodextrin-glikozil-transzferázzal (CGTáz)

Több törzs is termeli, pl.:

1. *Bacillus macerans*
2. Alkalofil bakt. № 38-2
3. *Klebsiella pneumoniae* (patogén) klónozták *B. subtilis*-be.
4. *Bacillus circulans*

A gyártáshoz általában izolált, oldott enzimet használnak.

36

A ciklodextrinek előállítása

Mindig többféle CD keveréke keletkezik + lineáris melléktermékek. A cél viszont tiszta termék.

Az α -, β -, γ -CD arány szabályozása:

- > a mikrobától is függ: 1.,3. kezdetben α -t termel
2. kezdetben β -t termel
- > oldószer adagolás: zárványkomplex keletkezik, ez eltolja az egyensúlyt
- > Mercian eljárás, szelektív adszorpció



37

Irányított gyártások: α -CD előállítás

Komplexáló vegyület: dekanol (vízgőzzel eltávolítható)

Csak α -CD képződik: jól oldódik (140 mg/ml),

→ nehéz kristályosítani

Hozam: ~50%



40

Oldószeres gyártások

Megfelelő méretű apoláris molekulával csak az egyik CD képez zárvány vegyületet, ez többnyire ki is csapódik. Az enzim az egyensúly helyreállítására ezt a frakciót termeli, a többi is átalakítja.

α -CD	1-dekanol	ciklohexán	etanol
β -CD	triklór-etilén	toluol	
γ -CD	brómbenzol	α -naftol	ciklohexadekán-8-alkén-1-on

Az adduktból az oldószer vákuum/vízgőzdesztillációval űzhető ki. A hozam gyenge, 50% alatti.



38

γ -CD előállítás

A β -CD gyártás mellékterméke

Konverzió CGT-ázzal

Komplexáló szer: metil-etilketon - α -naftol keverék

Vízben oldhatatlan komplex, mely metanolban feloldódik

loncsere, aktív szén tisztítás

Hozam: ~2%



41

Irányított gyártások: β -CD előállítás

Hidrolízis: 33%-os keményítő, folyósítás α -amilázzal, 80°C-on, 1h, pH=7.2, Ca²⁺ kell

Enzim inaktiválás: 100-120 °C-on 30 percig

Biokonverzió: CGT-áz enzim, 50 °C, 100-105 h, keverés

Komplexáló vegyület: toluol

A komplex szűrése, vákuum/vízgőz desztilláció (toluol eltávolítása), kristályosítás.



39

Mercian eljárás (J)

Bacillus circulans enzim, vizes oldatban:

pH=6, T=55 °C, 8,3 % elfolyósított keményítő

α , β és γ keverék képződik, hozam: α - 22,3%, β - 10,8%, γ - 5,1%

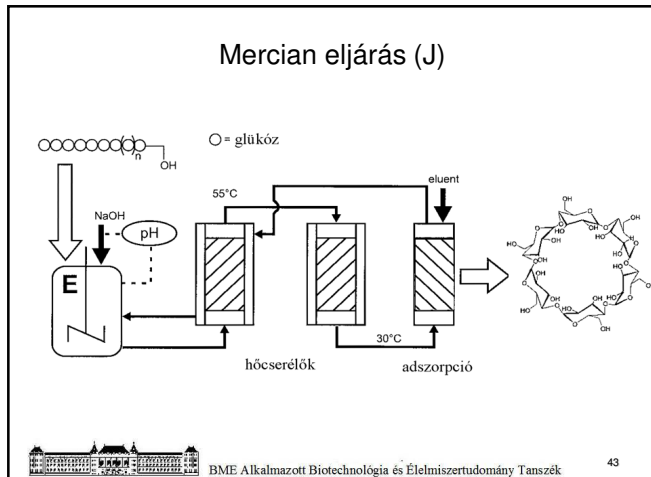
Elválasztás szelektív adszorpcióval (folyamatos recirkuláció, hűtés 30 °C-ra, majd vissza 55 °C-ra)

α megkötés: kitozán hordozón sztearinsav ligand, szelektivitás: >95%

β megkötés: ciklohexán-propánamid-n-kapronsav ligandon



42



43

Ciklodextrinek alkalmazása

Gyógyszerek formulázása:

- Oldhatóság nő (felszívódás): vízben nem oldható vegyületek is adhatók injekciókban
- A hozzáférhetőség nő
- Stabilizál: kevésbé párolog, véd az oxidálás ellen, a hőstabilitás nő
- Irritáló hatás csökken (indometacin)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 46

46

A ciklodextrinek alkalmazásai: molekuláris csomagolás

limonene

cyclodextrin (CD)

CD/limonene-IC

Az inklúziós komplexek képződése

Az apoláris molekulák beilleszkedése az apoláris gyűrűbe energia-csökkenéssel jár.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 44

44

Ösztradiol

Progesteron

Ampicillin

Prostaglandin F

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 47

47

Ciklodextrinek alkalmazása

Élelmiszerekben és kozmetikumokban: aromák, illóolajok, illatanyagok bezárása. Szagmentes hagyma és fokhagymaolaj.

Biotechnológia: apoláris anyagok bevitele vizes közegbe (fermentlébe)

- Zsírsavak bevitele *Mycobacterium* számára
- Hidrokortizon bevitele prednizolon gyártáshoz
- Lanatozid C komplexálása digoxin előállításához

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 45

45