

5. Mikrobiális poliszacharidok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

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

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



3

3

Reológiai alapok

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

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

Newtoni fluidum

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

4

Reológiai alaptípusok

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

5

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 7

7


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)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 8


8

A mikrobiális poliszacharidok bioszintézise

```

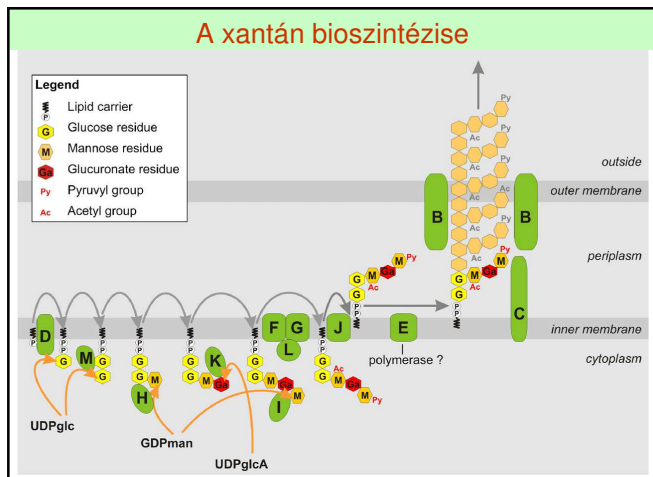
    graph TD
      Gal[galaktóz] --> Gal1P[gal-1-P]
      Glu[glükóz] --> Glu6P[glü-6-P]
      Fru[fruktóz] --> Fru6P[fru-6-P]
      Man[mannóz] --> Man6P[man-6-P]
      
      Fru6P <--> Glu6P
      Fru6P <--> Man6P
      
      Gal1P --> UDPGal[UDP-gal]
      Glu6P --> Glu1P[glü-1-P]
      Man6P --> Man1P[man-1-P]
      
      UDPGal <--> UDPGlu[UDP-glü]
      UDPGlu --> UDPGA[UDP-glükuronsav]
      
      Man1P --> GDPMan[GDP-man]
      GDPMan --> GDPFuc[GDP-fukóz]
      
      style UDPGA fill:none,stroke:none
      style GDPFuc fill:none,stroke:none
    
```

Templát: UDP, GDP



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 9

9



13

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 utópasztőrözése)

A xantán burrok miatt rossz az anyagátadás a környezettel → lassan növekszik, más törzsek könnyen túlnövik

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 14

14

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.

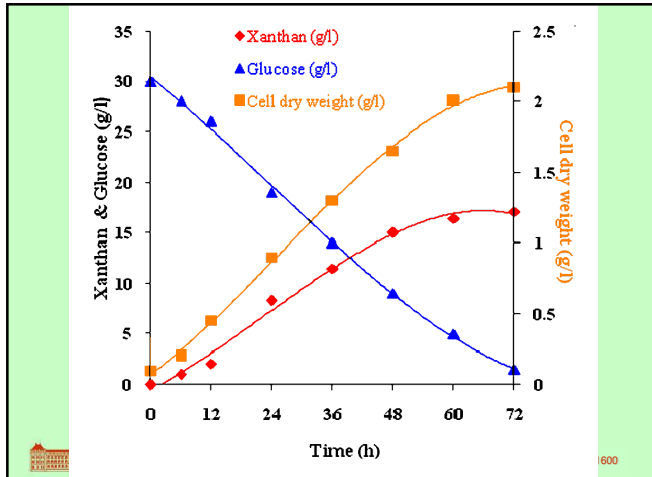
Fermentációs idő: 40-48 óra

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



16

Xantán fermentáció levegőztetése

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

Kis keverő, nagy fordulatszám

- High RPM
- Small ϕ Propeller
- High Shear
- Small Area of Influence

Nagy keverő, nagy nyomaték

- High Torque
- Large ϕ Impeller
- Large Area of Influence

Uniformity

17

Xantán fermentáció levegőztetése

Levegőztetés: A buborékok nehezen szállnak fel.
A viszkózus lé miatt rossz a tömegátadás, a tenyészet saját magát fojtja meg.

keverő ford. szám. (1/min)	100 cP (g O ₂ /lh)	1000 cP (g O ₂ /lh)	10,000 cP (g O ₂ /lh)	3% xantán (g O ₂ /lh)
400	0.5	0.4	0.3	0.2
600	1.0	0.8	0.6	0.4
800	1.8	1.4	0.9	0.6
1000	2.5	1.8	1.0	0.7
1200	3.5	2.0	1.0	0.8
1400	4.0	2.0	1.0	0.8
1600	4.5	2.0	1.0	0.8

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

Xantán felhasználása

60 % Élelmiszeripar:
cukorkamáz, saláta-dresszing, fagylalt, 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

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 kőtörmelék ülepedését.





21

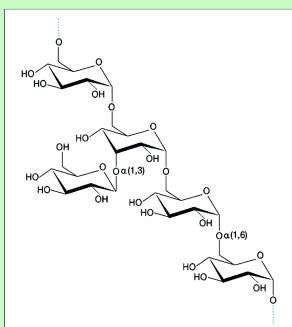
Dextrán

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.



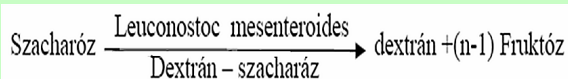
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

22

Dextrán előállítása

Bioszintézise:



Egylépéses biokonverzió: transzglykozilálás (ld. BIM)

Irreverzibilis reakció: ~100% konverzió

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

Cukorgyárakban: léfertőződés - dugulások



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

23

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. funiculosum*)
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

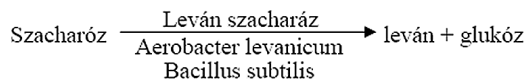


25

Leván

Fruktóz polimer (2-6 fruktozid kötés).

Bioszintézis: analóg a dextránnal: transzglykozilálás



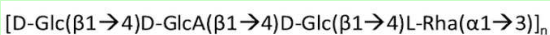
- Sokféle törzs termeli
- Konverzió: ~62%
- Felhasználás: oldata viszkózus, de newtoni
 - élelmiszeripar
 - gyógyszeripar
 - kozmetikai és festékipar (gumiarábikum helyett)



26

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.

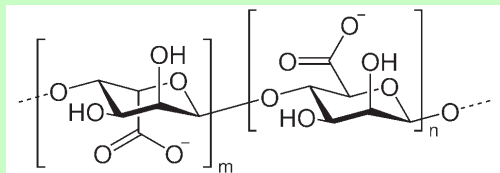


27

„Helyettesítő” mikrobiális poliszacharidok Alginát

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

Mannuronsav $\beta(1-4)$ és α -guluronsav polimer, homopolimer blokkok váltják egymást \rightarrow erősen anionos jellegű (vö. pektin)



28

Alginát

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

Kationköötő, kationcserélő, Ca^{2+} 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



29

Mikrobiális cellulóz

Szerkezetileg azonos a növényi cellulózzal, $\beta(1,4)$ -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.



30

A ciklodextrinek bioszintézise

Egylépéses biokonverzió ciklodextrin-glikozil-transferázzal (CGTáz)

A

B

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

34

A ciklodextrinek bioszintézise

Szubsztrát: lineáris dextrinek (elfolyósított keményítő), többféle termék keletkezik párhuzamosan. A reakció egyensúlyi, a termékek egymásba átalakulnak.
 Termékinhibíció: a keletkező CD gátolja az enzimet.

α-Cyclodextrin

β-Cyclodextrin

γ-Cyclodextrin

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

35

35

A ciklodextrinek bioszintézise

α - amidázzal hidrolizált (burgonya) keményítő

→ ciklodextrin-glikozil-transferáz (CGT-áz)

→ (lineáris és) gyűrűs dextrinek

→ CD izolálás

Egylépéses biokonverzió: ciklodextrin-glikozil-transferázzal (CGTáz)
 Több törzs is termeli, pl.:

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

A gyártáshoz általában izolált, oldott enzimet használnak.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

36

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

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 többit 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

Irányított gyártások: β -CD előállítás

Hidrolízis: 33%-os keményítő, folyósítás α -amilázzal, 80°C-on, 1h, pH=7.2, Ca^{2+} 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

Irányított gyártások: α -CD előállítás

Komplexáló vegyület: dekanol (vízgőzzel eltávolítható)

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

→ nehéz kristályosítani

Hozam: ~50%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

40

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 szenes tisztítás

Hozam: ~2%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

41

41

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%

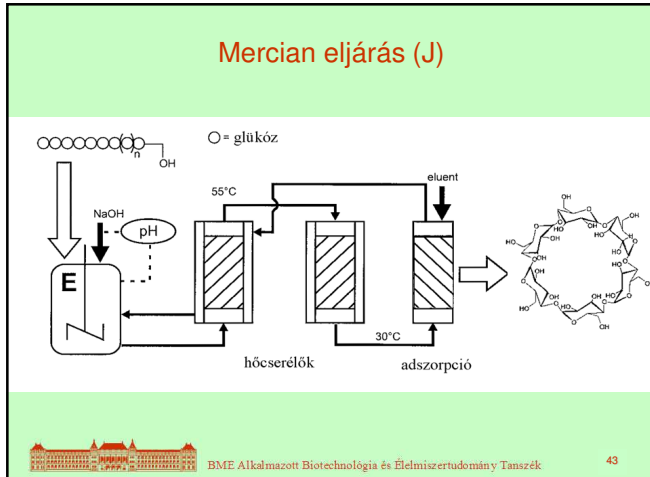
β megkötés: ciklohexán-propánamid-n-kapronsav ligandon



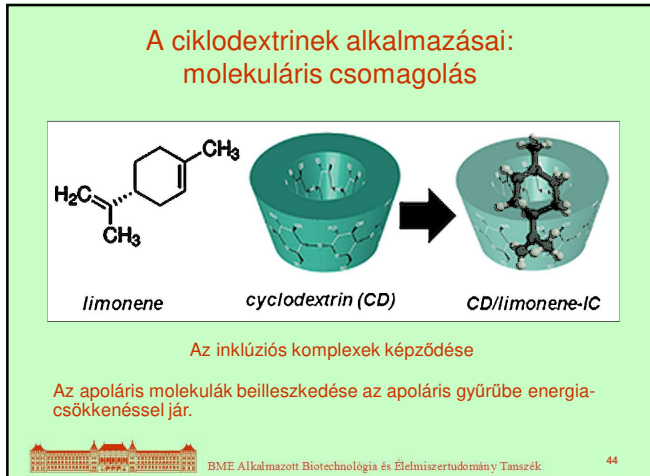
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

42

42



43



44

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

Ciklodextrinek alkalmazása

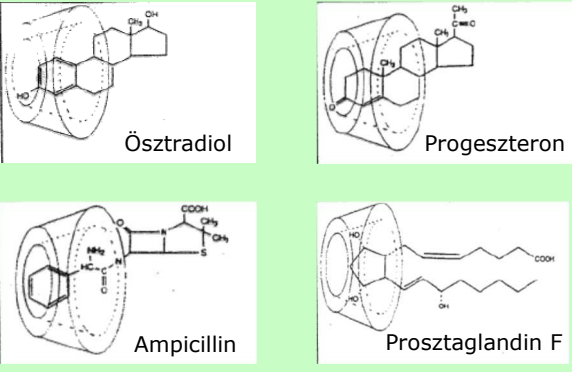
Gyógyszerek formulázása:

- 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



Ösztradiol
Progesteron

Ampicillin
Prostaglandin F



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 47

47
