

5. Mikrobiális poliszacharidok



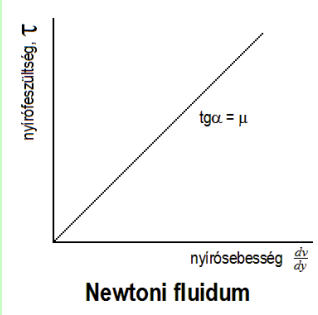
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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:

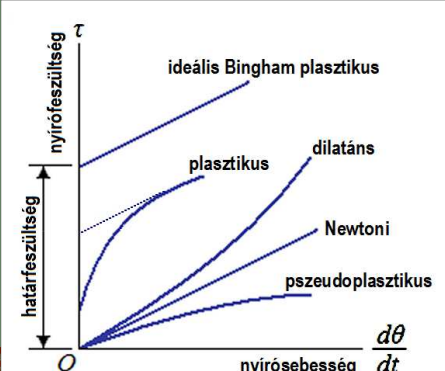
- gélképzés
- speciális reológia (pseudoplasztikus, tixotróp, viszkoelasztikus oldatok)
- a növényi poliszacharidok helyettesítése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2


Reológiai alaptípusok



határfeszültség

nyírófeszültség

nyírósebesség $\frac{d\theta}{dt}$




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Ipari mikrobiális poliszacharidok

Termelő törzs	Poliszacharid
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Szukcinoglikán
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Szukcinoglikán
<i>Rhizobium melliloti</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

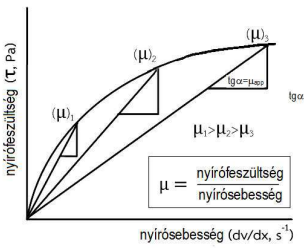
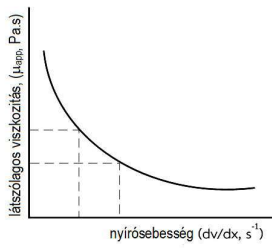


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


3

Pseudoplasztikus folyadék

kis nyíróerő – nagy viszkozitás;
nagy nyíróerő – kis viszkozitás

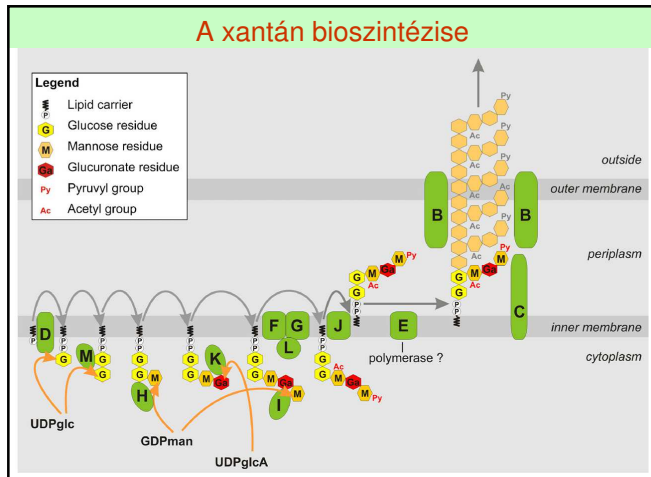



$\mu = \frac{\text{nyírófeszültség}}{\text{nyírósebesség}}$

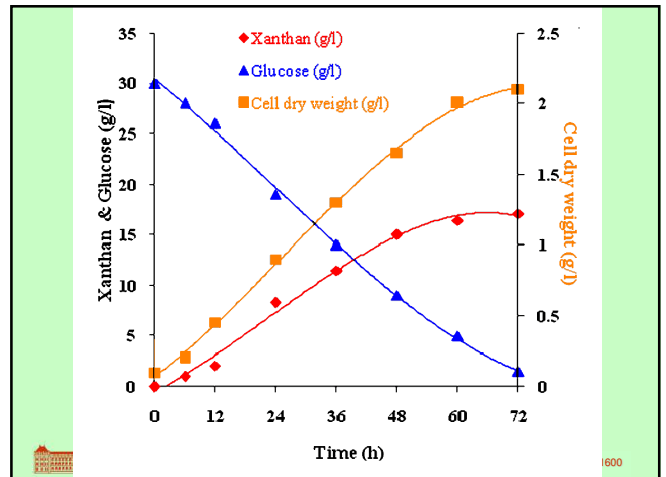


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6



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 utópasztőrözése)

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

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.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 17

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

Xantán fermentáció levegőztetése

Levegőztetés: A buborékok nehezen szállnak fel.
 A viszkózus lé miatt rossz a tömegátadás, a tenyésztet 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	0.5	0.5	0.5
600	1.0	0.8	0.8	0.8
800	1.8	1.2	1.0	1.0
1000	2.5	1.5	1.0	1.0
1200	3.5	1.8	1.0	1.0
1400	4.0	1.8	1.0	1.0
1600	4.5	1.8	1.0	1.0

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 18

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

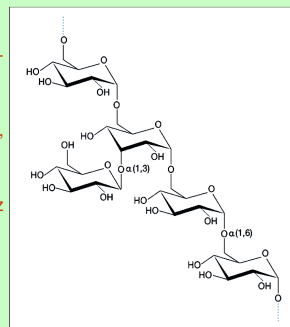
Dextrán

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



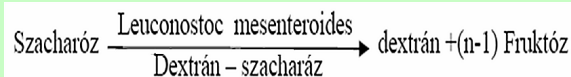
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

20

Dextrán előállítása

Bioszintézise:



Egylépéses biokonverzió: transzglykizálás (ld. BIM)

Irreverzibilis reakció: ~100% konverzió

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

Cukorgyárakban: léfertőződés - dugulások



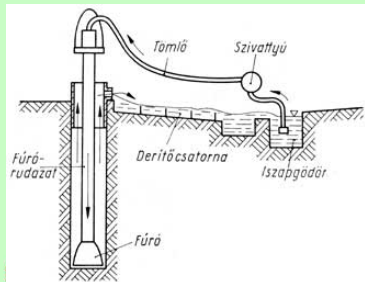
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 kötőanyagok ülepedését.



Élelmiszer

21

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 alkohollal, 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

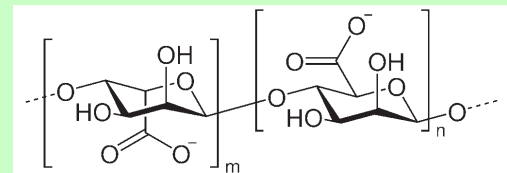


25

„Helyettesítő” mikrobiális poliszacharidok Alginát

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)

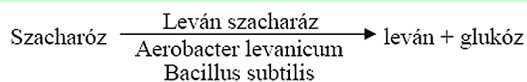


28

Leván

Fruktóz polimer (2-6 fruktozid kötés).

Bioszintézis: analóg a dextránnal: transzglykózilálás



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



26

Alginát

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

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

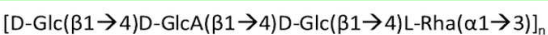
- élelmiszerekben sűrítőanyagként, stabilizálószerként, zselésítő anyagként, valamint emulgeálószerként használják E400 néven.
- a gyógyszeriparban széles körben alkalmazzák
- égési sérülések esetén elősegíti a sérült rész gyógyulását
- fémmérgezés esetén fémionok megkötésére használják



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.



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.



30

Heparin

Többféleképpen szulfonált mukopoliszacharid, Ca-só formájában hozzák forgalomba.

Antikoaguláns = Véralvadásgátló

Az állati (emberi) szervezet termeli eredetileg szerv-extrakcióval gyártották.

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 31

31

A ciklodextrinek bioszintézise

Egylépéses biokonverzió ciklodextrin-glikozil-transzferázzal (CGTáz)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 34

34

Ciklodextrinek (CD, Schardinger dextrinek)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 32

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.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 35

35

A ciklodextrinek méretei

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

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 33

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.

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



Irányított gyártások: α -CD előállítás

Komplexáló vegyület: dekanol (vízgőzzel eltávolítható)

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

→ nehéz kristályosítani

Hozam: ~50%



37

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 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

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, 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

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)

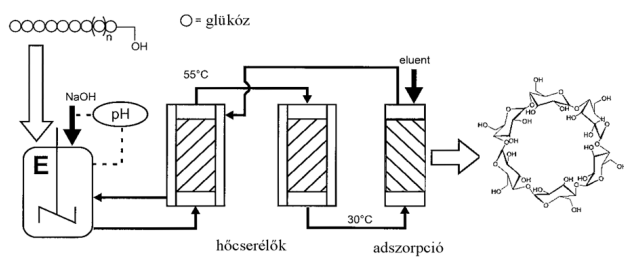
α megkötés: kitozán hordozón sztearinsav ligand, szelektivitás: >95%

β megkötés: ciklohexán-propánamid-n-kapronsav ligandon



42

Mercian eljárás (J)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

43

Ciklodextrinek alkalmazása

Gyógyszerek formulázása:

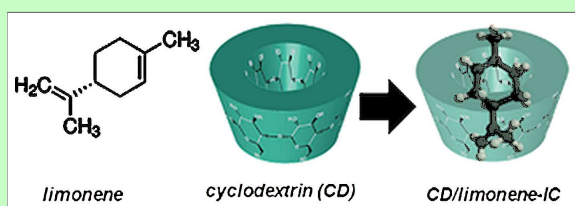
- Oldhatóság nő (felszívódás): vízben nem oldható vegyületek is adhatók injekciókban
- A hozzáférhetőség nő
- Stabilizál: kevésbé párolog, véd az oxidálás ellen, a hőstabilitás nő
- Irritáló hatás csökken (indometacin)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

46

46

A ciklodextrinek alkalmazásai: molekuláris csomagolás



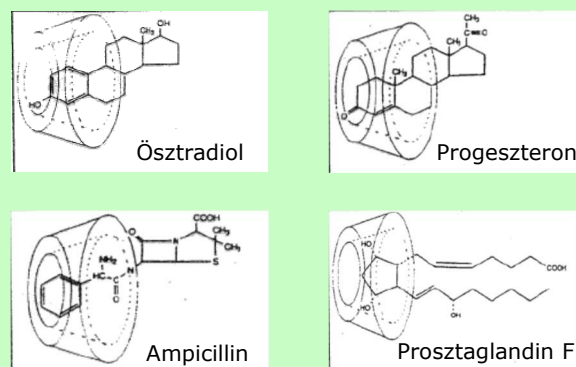
Az inklúziós komplexek képződése

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

44



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

47

Ciklodextrinek alkalmazása

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

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