

**UNIVERZA V LJUBLJANI**  
**BIOTEHNIŠKA FAKULTETA**  
**ŠTUDIJ ŽIVILSKE TEHNOLOGIJE**

PROIZVODNJA EKSTRACELULARNIH POLISAHARIDOV\*

**Mateja MIŠIČ, Miha MLAKAR, Mitja MOČNIK, Silvester PEČJAK**

(študentje tretjega letnika študija Živilske tehnologije)

asist. **Maja Paš**, dipl. inž. in prof. dr. **Peter Raspor** (mentorja)

**Ljubljana, 2000**

\*Seminarska naloga pri predmetu Biotehnologija

## **POVZETEK**

Produkcija ekstracelularnih polisaharidov je ena od novejših vej biotehnologije. Raziskave so se začele v štiridesetih letih in potekajo še danes. Med ekstracelularne polisaharide spadajo dekstran, ksantan, skleroglukan, celuloza, alginati in drugi. Prva in še vedno najpomembnejša sta dekstran in ksantan. Zanimivi so zaradi svojih reoloških lastnosti. Uporablja se jih veliko v živilski, farmacevtski, petrokemični industriji ter medicini. Proizvajajo jih predvsem bakterije, manj pa glive in kvasovke. Fermentacija poteka v zaprtih, submerznih kultivacijah v bioreaktorjih z odprtim mešanjem in dovajanjem zraka. Polisaharide sicer pridobivamo iz bolj znanih virov kot so alge in rastline. Mikrobní polisaharidi pa nam predstavljajo alternativno vejo pridobivanja pri kateri imamo večji nadzor nad produktom, saj lahko s genskim inženiringom posredno vplivamo na produkte in njihove reološke lastnosti.

## **SUMMARY**

Production of extracellular polysaccharides is one of the latest branches in biotechnology. Researches have started in 1940s. Most common extracellular polysaccharides are: dextran, xanthan, aliginat, scleroglucan and others. First two polymers are still in many respect the most successful. They are interesting because of their rheological properties and are used in food, pharmaceutical, oil field industry and medicine. All commercial polysaccharides are bacterial and less fungal and yeast. Microorganisms are cultivated in submerged, batch cultures. Adequate aeration and mixing have to be provided. Industrial usage of polysaccharides still relies on material obtained from plants and from marine algae. The production of microbial polysaccharides provides valid alternative, because we can influence, through genetic engineering, on the products and on their rheological properties.

## KAZALO

1. UVOD.....	4
2. ZGODOVINA BIOPROCESA.....	4
3. MIKROBIOLOŠKE IN BIOKEMIJSKE OSNOVE BIOPROCESA.....	5
3.1 ALGINATI.....	5
3.2 DEKSTRANI.....	8
3.3 KSANTAN.....	9
3.4 PULULAN.....	12
3.5 CELULOZA.....	13
4. BIOINŽENIRSKÉ OSNOVE BIOPROCESA.....	14
4.1 IZOLACIJA MIKROORGANIZMO ZA PRODUKCIJO POLISAHARIDOV....	14
4.2 MEDIJ IN KONDICIJA KULTUR.....	14
4.3 MOŽNOSTI V RAZVOJU VRST.....	16
4.4 FAKTORJI, KI OMEJUJEJO PRODUKT.....	16
4.5 LABORATORIJSKA IN INDUSTRIJSKA PRIPRAVA MIKROBNIH POLISAHARIDOV.....	17
5. EKOLOŠKI ASPEKT BIOPROCESA.....	19
6. UPORABA BIOPROIZVODOV V PROIZVODNJI HRANE.....	19
7. IMPLIKACIJE DRUGIH TEHNOLOGIJ IN IMPLIKACIJE NA DRUGE TEHNOLOGIJE.....	25
7.1 ALGINATI.....	25
7.2 DEKSTRANI.....	26
7.3 KSANTAN.....	27
7.4 PULULAN.....	27
7.5 CELULOZA.....	28
8. REFERENCE.....	29

## 1. UVOD

Polisaharide, ki se uporabljajo v industriji še vedno pridobivajo iz rastlin in morskih alg. Taki komercialni polisaharidi vključujejo: škrob, karaginan, arabski kavčuk, glikomanan, konjak in manan. Te snovi se uporabljajo v živilski, farmacevtski industriji, kot tudi za druge industrijske namene. Čeprav so to vredni komercialni produkti je njihova slaba stran, da nimajo zagotovljenih zalog in nihanja v kvaliteti. Samo škrob je takoj dosegljiv iz mnogih virov iz vseh koncev sveta. Vsaj teoretično pa je vse mogoče pridelovati iz obnovljivih virov. Vendar ni nujno, da imajo vsi polimeri iz rastlin oz. alg ali njihovi kemični derivati točno določene lastnosti po sprejemljivi ceni.

Dobro alternativo predstavlja mikrobiološka proizvodnja polisaharidov, ki imajo skoraj identične lastnosti in se jih lahko uporablja kot nadomestek starim oz. kot novi izboljšani produkti. Mikroorganizmi proizvajajo ogromne količine različnih polisaharidov, vendar je njihova dejanska proizvodnja omejena na relativno majhno število monosaharidov in drugih neogljkovih hidratov kot so: acetat, piruvat, sukcinat in fosfat. Čeprav je proizvodnja omejena, je obseg naravnih lastnosti, ki jih imajo ti polisaharidi resnično zelo velik. Nekateri mikrobiološki polisaharidi tvorijo visoko-viskozne vodne raztopine, drugi pa gele, podobne agarju. Mikrobiološka proizvodnja polimerov ne podlega slabim klimatskim pogojem, onesnaženju morja, vendar potrebuje cenene substrate, visoko tehnološko opremo, dobro izurjene ljudi in zadostno oskrbo z vodo in energijo. Produkti manj variirajo in proizvodnja je lahko bolj nadzorovana. Vse to pa je plod zadostnega raziskovanja in razvoja ne samo polisaharidov samih, pač pa tudi možnost njihove uporabe.

Še vedno obstaja relativno malo komercialno dostopnih mikrobnih polisaharidov, vendar število le-teh in tudi možnosti njihove uporabe hitro naraščajo. Nekateri so že dobro uveljavljeni v moderni biotehnologiji s precejšnjim trgom, drugi pa imajo potencialno možnost da se uveljavijo zaradi kemičnih in fizikalnih lastnosti. Trenutno komercialni produkt med mikrobnimi polisaharidi predstavlja ksantan, polisaharid *Xanthomonas campestris* pv. To je pripeljalo do še intenzivnejših raziskovanj v tej smeri in je samo še vprašanje časa kdaj se bo uporaba tako pridobljenih snovi še povečala in razširila. Ne smemo pa pozabiti, da so nekateri mikrobnimi polisaharidi že dobro sprejeti kot naravne komponente mnogih fermentiranih živil, uporabljajo pa se tudi pri čiščenju vod in odplak.

Možna sta dva pristopa pri iskanju potencialnih mikrobnih polisaharidov za določeno uporabo. Prva možnost je ta, da po tem ko smo že ugotovili določene uporabne fizikalno-kemične lastnosti nekega polisaharida le-te raziskujemo in testiramo naprej. Druga možnost pa je, da mi postavimo katere fizikalno-kemične lastnosti potrebujemo in glede na to raziskujemo in ugotavljamo primernost polimerov.

## 2. ZGODOVINA BIOPROCESA

Raziskave za produkcijo mikrobnih ekstracelularnih polisaharidov so se začele leta 1940 z razvojem dekstrana v zvezi s krvno plazmo. Raziskave so postale intenzivnejše leta 1950 z

razvojem ksantana. Od takrat naprej so bile mnoge raziskovalne skupine zaposlene z odkrivanjem in razvojem programov za proizvodnjo novih ekstracelularnih polisaharidov. Še vedno pa sta dekstran in ksantan v mnogih pogledih ostala najpomembnejša. Mikrobní ekstracelularni polisaharidi niso izpodrinili polisaharidov pridobljenih iz tradicionalnih virov kot so rastline in alge, ampak so se na trgu uveljavili kot samostojni proizvod.

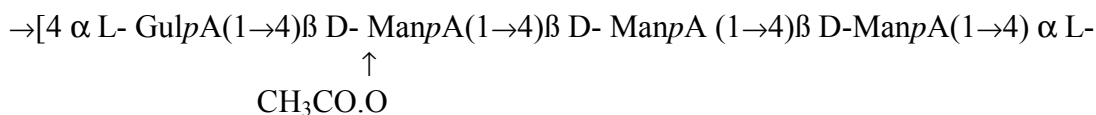
### 3. MIKROBIOLOŠKE IN BIOKEMIJSKE OSNOVE BIOPROCESA

#### 3.1 ALGINATI

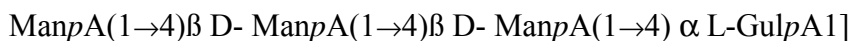
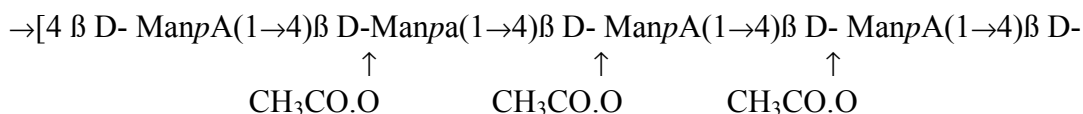
Alginati so skupina kislinskih polisaharidov izoliranih iz morskih rjavih alg kot so vrste *Laminaria* in *Macrocystis*. So linearni polimeri  $\beta$ -1,4-D-manuronske kisline in  $\alpha$ -1,4-L-guluronske kisline, ki vsebujejo homopolimerne sekvence D-manurata in L-gulurata (kateri sladkor je prisoten, je odvisno od biološkega izvora) ali dimerne sekvence. Locirani so v intercelularnem matriksu kot gel, ki vsebuje različne katione in predstavlja pomembnejšo strukturno komponento, več kot 40% suhe snovi.

Sinteza alginatom podobnih polimerov je bila najprej odkrita pri patogeni bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* (Linker and Jones, 1964, 1966), *P. fluorescens*, *P. putida*, *Azotobacter vinelandii* (Gorina and Spencer, 1960), *A. chroococcum* in drugih. Bakterijski alginati, ki so ravno tako linearni polimeri iregularnih struktur, ki vsebujejo D-manuronsko kislino in L-guluronsko kislino pa so v zadnjem času postali alternativa morskim alginatom. Bakterijski alginati imajo višjo maso kot polimeri alg. Molekulska masa alginatov iz alg je med 48000 in 186000 Da (Damon and Rose, 1950), vendar ekstrakcijske tehnike povzročajo degradacijo. Pri bakterijskih alginatih kot so produkti *P. fluorescens* so teže med 176000 in 500000 Da pri *P. aeruginosa* pa 120000 do 480000 Da. Njihovi primarni produkti so acetilirani homopolimeri poli-D-manuronske kisline. Ta je modificirana v kasnejši reakciji polimerizacije z ekstracelularnim encimom epimeraza polimanuronske kisline, ki spreminja nekatere neacetilirane D-manuronske ostanke v L-guluronsko kislino. Bakterijski alginati so sestavljeni iz dveh enakih uronskih kislin, kot alginati alg, vendar so za razliko visoko acetilirani. Acetilne skupine so prisotne posamezno na D-manuronskih ostankih polimerov.

*Azotobacter vinelandii*



*Pseudomonas fluorescens* ali *P. putida*



Bakterijski alginati so družina eksopolisaharidov, čeprav so podobne sestave, zelo variirajo v strukturi. Material dobljen iz *A.vinelandii* je najbolj podoben alginatom iz alg vendar vsebuje O-acetilne skupine.

*A.chroococcum* sintetizira dva polisaharida, eden od teh je acetiliran alginat z visoko vsebnostjo D-manuronske kisline. Tudi produkti, ki jih daje vrsta *Pseudomonas* imajo visoko vsebnost D-manuronske kisline, vendar pa zelo variirajo v stopnji acetiliranja. Zanimiv pojav pri produktih vrste *Pseudomonas* je, da ni prisotnih stičnih zaporedij L-guluronskih kislinskih ostankov kot pri *Azotobacter* alginatih in pri alginatih iz alg.

Alginati, ki jih izloča vrsta *Pseudomonas* so splošno nizke molekulske mase, relativno slabše acetilirani, visoko polidisperzni in so malo verjetno izkoristljivi.

Visoko acetilirani polisaharidi vrste *A.vinelandii* ali *P.aeruginosa* lahko vsebujejo nekaj D-manuronskih ostankov, ki lahko prenašajo O-acetilno na drugi in tretji ogljikov atom. Med 3-11% manuronskih ostankov v takih polisaharidih so nosilci acetiliranja na obeh ogljikovih atomih.

Bakterijske vrste, ki proizvajajo alginate vse vsebujejo alginatno liazo. To lahko vodi v opazno znižanje molekularne mase končnega produkta in možno je znižanje njihove potencialne vrednosti. Rešitev je našel Hacking, ki je dodal v medij proteaze za uničenje alginolne aktivnosti. Rezultat je bil produkt visoke viskoznosti.

Komercialno najpomembnejša karakteristika alginatov je njihova viskozna raztopina in zmogljivost tvorbe gela. Notranja viskoznost alginatov, ki omogoča povečanje viskoznosti v raztopini, je odvisna od polimerne molekulske mase. Tvorba gela nastane, zaradi njihove sposobnosti vezave velikega števila dvovalentnih ali večvalentnih kationov, predvsem kalcijevih in je pomembno, ker se uporablja v prehranskih in neprehranskih sistemih.

Vrsta *Azotobacter* so Gram-negativne bakterije, ki so sposobne vezati dušik v mediju, ki vsebuje organski vir ogljika.

Alginati nastajajo v celicah v obliki kapsule ali kot ekstracelularni polisaharidi, ko pride do sinteze v metabolično aktivnih vegetativnih celicah. Polisaharidi služijo kot zaščita pred mehanskimi stresii. Odgovorni so tudi za bakterijsko adhezivnost na površine (Casterton, 1987) in so difuzijski prenosniki kisika ali težkih kovin ali pa služijo kot ionsko izmenjevalni sistem, ki je povečano selektiven za kalcijeve ione. (Fyfe and Govan, 1983)

Metabolična pot alginatne biosinteze je bila preučena na rjavih algah. (Lynn and Massid, 1966; Madgwick, 1973) Sprva so mislili, da je pot biosinteze zasnovana na saharozi. Kasneje pa je bilo ugotovljeno, da je fruktoza-alginatno kislinska pot tista, ki se pojavlja pri bakterijah, ki pripadajo vrstam *Azotobacter* in *Pseudomonas* ter morskim rjavim algam.

## FRUKTOZA

↓ fruktokinaza

## FRUKTOZA-6-FOSFAT

↓ fosfomanozna izomeraza

## MANOZA-6-FOSFAT

↓ fosfomanomutaza

## MANOZA-1-FOSFAT

↓ GDP-manozna pirofosforilaza

## GDP-MANOZA

↓ GDP-manozna dehidrogenaza

## GDP-MANURONSKA KISLINA

↓ polimeraza

## POLIMANURONSKA KISLINA

↓ polimanuronsko kislinska C-5 epimeraza

## ALGINATNA KISLINA

Prisotnost dveh različnih epimerizacijskih mehanizmov odvisnih od koncentracije kalcijevih ionov nam nakaže možnost, da lahko najmanj dve različni epimerazi delujeta pri *Azotobacter vinelandii*.

Gen *algE* je bil prvi gen, ki je bil kloniran iz *A. vinelandii*. Ugotovljeno je bilo, da je odgovoren za sintezo manuronske C-5 epimeraze, ki je odvisna od kalcijevih ionov. (Ertesvag, 1994)

Analize tega proteina so pokazale, da je N-terminalni konec enak tistemu na čisti epimerazi izolirani iz *A. vinelandii*. Ta sekvenca je verjetno odgovorna za vezavo alginatov in za katalizo epimerizacijskih reakcij.

### 3.1.1 LIAZE

Alginatne liaze so bile najdene v morskih mehkužcih (Nakada and Sweeney, 1967) in v različnih morskih in nemorskih bakterijah. (Akagawa - Matsushita, 1992)

Vsi ti encimi pripadajo skupini polisaharidnih liaz, ki delujejo z enakim  $\beta$ -eliminacijskim mehanizmom. Nekateri so bili karakterizirani na podlagi specifičnosti substrata, lokacije, molekulske mase in ionske odvisnosti.

So endo- ali ekso-encimi, ki vodijo do različnih produktov, od monomerov v oligosaharide z različno stopnjo polimerizacije.

$\beta$ -eliminacijske reakcije katalizirane z alginatno liazo je podrobno opisal Gacesa (1987), ki je nakazal, da obe liaza in epimeraza delujeta s tristopenjskim mehanizmom.

### 3.1.2 ALGINAZE

Kar nekaj bakterij, ki proizvajajo alginat so sposobne proizvajati alginaze. Alginatne liaze so bile izolirane iz *A. vinelandii* (Kennedy, 1992), *A. chroococcum* (Haraguchi and Kodama, 1996), *P. fluorescens* in *P. putida* (Canti, 1994). Alginati izolirani iz *Azotobacter* in *Pseudomonas* kažejo nizko aktivnost proti naravno visoko acetiliranim bakterijskim polimerom, predvsem zaradi prisotnosti O-acetilnih skupin, ki močno omejijo učinkovitost degradacije. (Sutherland, 1995)

Encimi obeh vrst so endo-D-manuronatne liaze, ker so kazali naraščajočo aktivnost, ko so bili testirani proti algalnim alginatom z naraščajočo manuronsko kislinsko vsebnostjo.

## 3.2 DEKSTRANI

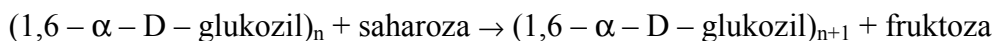
Kar nekaj mlečno kislinskih bakterij, najbolj poznan je *Leuconostoc mesenteroides*, proizvaja dekstrane. To so eksopolisaharidi sestavljeni samo iz  $\alpha$ -(1,6) povezanih D-glukozičnih ostankov.

Skoraj vsi mikrobní eksopolisaharidi so produkti intracelularne katabolne zamenjave substratov v intermediate, ki so nato anabolirani za tvorbo specifičnih prekurzorjev, kot so sladkorni nukleotidi in končno za tvorbo polimerov. Dekstran se od teh eksopolisaharidov razlikuje. Substrat ne vstopa v bakterijsko celico in je spremenjen ekstracelularno v razvejan  $\alpha$ -D-glukan, dekstran. Le saharoza je izkoristljiva kot substrat za to reakcijo.



Dekstrani so lahko pridobljeni iz celih celic v kulturi v procesu podobnem tistemu, ki se uporablja za ostale eksopolisaharide ali pa lahko izhajajo iz prostoceličnih preparatov encim kompleksa dekstransaharoze; dekstransaharoza je stabilna pri pH 5 – 6,5 in v celih celičnih kulturah je encimska aktivnost odvisna od prisotnosti kalcijevih ionov.

Encim glikoprotein sprosti fruktozo iz saharoze in prenese glukozne ostanke na reducirajoči konec rastoče dekstranske verige, na akceptorsko molekulo, ki je tudi vezana na encim.



Prosta energije glikozidne vezi v disaharidu je večja kot pri dekstranu, zato poteka reakcija od leve proti desni, pri tem pa pride do padca proste energije.

Med polimerizacijo, rastoča dekstranska veriga ostane čvrsto vezana na encim, stopnja polimerizacije narašča dokler akceptorska molekula ne loči polimerno verigo od encima.

Nižji oligomerni saharidi niso preveč učinkoviti kot akceptorji molekul, afiniteta do encima narašča z dolžino verige.

Industrijska produkcija dekstrana izven vzhodne Evrope poteka s serijsko fermentacijo s pomočjo *Leuconostoc mesenteroides*. Produkcija dekstrana zahteva dobro bakterijsko rast in optimalno encimsko produkcijo. Celična rast zahteva kompleksen medij z visoko vsebnostjo aminokislin in rastne faktorje z optimalno temperaturo 30°C, encimska produkcija pa je najboljša pri 23°C.

Proizvodnja dekstrana iz saharoze je odvisna od koncentracije substrata in ob določenih pogojih lahko dosežemo 42–46 % izkoristek. Fermentacijski medij vsebuje anorganske soli, koruzni medij (2 %) in do 10 % saharoze. Prisotnost elementov v sledovih (Mg, Fe) je zelo pomembna za zadovoljivo produkcijo dekstrana, produkcija ekstracelularnih dekstranov pa je optimalna ob prisotnosti 2,5 % kalcijevega klorida.

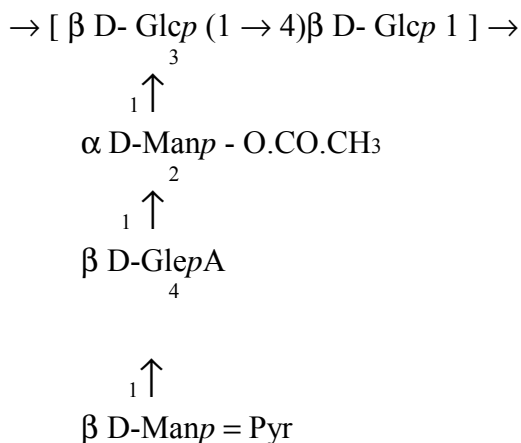
Produkcija dekstrana se od večine ostalih procesov za eksopolisaharidno produkcijo razlikuje v tem, da so tu pridobljeni stranski produkti uporabni. To predstavlja 75 % originalnega substrata, ki vsebuje fruktozo, manitol, in dekstran z nizko molekulsko maso.

### 3.3 KSANTAN

Ksantan je komercialno najbolj uspešen mikrobn ekstracelularni polisaharid. To kažejo tudi poročila o njegovi produkciji, ki presega dvajset tisoč ton letno. Komercialno pridobivanje poteka v močno prezračenih fermentatorjih z nenehnim mešanjem in z uporabo bakterije *Xanthomonas campestris*, ki je sposobna konvertirati od 50% do 70% substratnega ogljika v željen produkt ksantan. (Sinskey, 1986) Njegova molska masa se giblje od 1.200.000 g/mol do 1.800.000 g/mol. Kemično strukturo ksantana si lahko razlagamo na dva načina:

- kot ponavljajoč pentasaharid
  - kot verigo celuloze, ki služi kot osnovna veriga nanjo pa je na vsako drugo molekulo glukoze pripeta stranska veriga - trisaharid
- Stransko verigo sestavljata dva ostanka molekule manoze, med katerima leži ostanek molekule

glukoronske kisline.



Notranji manozni ostanek je ponavadi acetiliran, na zunanji pa je vezan piruvat. Večina komercialnih ksantanov je 100% acetiliranih in njihov končni manozni ostanek je v 30%-ih - 50%-ih piruvatiziran. Povedati je tudi treba, da so svojo tržno nišo našli tudi 100% (Sutherland, 1990) piruvatizirani ksantani (Wernau, 1978). Na acetiliranost in piruvatiziranost vpliva katerih sev smo uporabili za fermentacijo, nutrienti in fermentacijski pogoji. Eden od mutantov *Xanthomonas campestris* celo proizvaja ksantan, ki ima zelo malo piruvata, notranja molekula manoze pa je kar dvakrat acilirana.

Znanstveniki napovedujejo, da je možno, da bo proizvodnja ksantana potekala tudi po alternativni poti, kot pripenjanje stranskih verig polisaharidov na osnovno verigo celuloze, katero bo proizvedel mikroorganizem *Acetobacter xylinum*.

Reološke lastnosti ksantana so predvsem predpisane njegovi orientaciji v raztopinah. Z vodo namreč, stranska veriga - trisaharid, tvori konformacijo dvojnega heliksa, le-tega pa celuloza stabilizira s tvorbo nekovalentnih vezi.

Na bakterijo *Xanthomonas campestris* je bilo narejenih kar nekaj genskih raziskav, s katerimi so ugotovili celotno biosintezo ksantana. Z genskim inženiringom so znanstveniki uspeli narediti mutante, kateri so sposobni proizvajati politrimere ali politetramere. Pri politetramerah se pojavlja enaka struktura kot pri ksantanu, vendar brez zunanje molekule manoze. Pri politrimerah pa ne manjka samo zunanja molekula manoze, ampak tudi ostanek glukuronske kisline. Prvo omenjene imajo manjšo viskoznost kot ksantan, vendar še vedno v raztopinah tvorijo konformacijo dvojnega heliksa. Politrimere pa kažejo celo nekoliko večjo viskoznost.



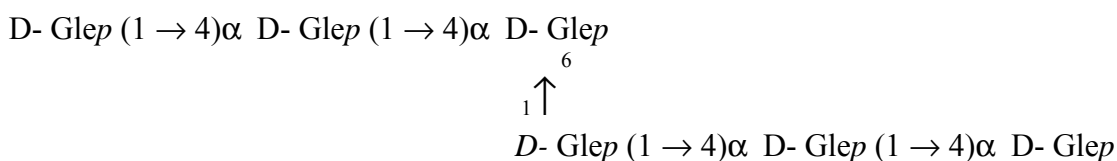
Biosinteza se začne z akumulacijo vseh petih saharidov (Ielpi, Couso and Dankert, 1981 and Ielpi, 1981). Predno se saharidi medsebojno povežejo mora priti do aktivacije saharidov. Aktivacija poteče z uridinodifosfatom. Ta reakcija poteče s pomočjo petih glikoziltransferaznih encimov. Ko je enkrat saharid aktiviran, pride v stik z naslednjim saharidom. Takrat se odcepi uridinodifosfat in saharida se povežeta. S povezavo počasi dobimo pentasaharide, kateri so pripravljeni na povezavo z acetatom in piruvatom. Najprej poteče acetiliranje s specifičnim encimom acetilaza in nato sledi povezava s piruvatom, katero katalizira encim katalaza (Hassler and Doherty, 1990). Nato šele pentasaharidi kondenzirajo v rastočo verigo ksantana.

Po številu korakov in po številu specifičnih encimov, ki so vpleteni v biosintezo ksantana, je jasno, da katerokoli fiziološko vlogo že ima za mikroorganizem v celici, ne služi le kot shramba energije. To trditev podpira tudi dejstvo, da *Xanthomonas campestris* ne proizvaja sistema encimov, kateri bi lahko rehidroliziral ksantan, kar pa ne velja za druge mikrobne ekstracelularne polisaharide, kot sta pululan (McNeil and Kristiansen, 1987) in skleroglukan (Wernau, 1985).

### 3.4 PULULAN

Pululan je homopolimera sestavljena iz glukoze, ki se med seboj z  $\alpha$  1,4 vezmi pretežno povezujejo v maltotrioze in v majhno število maltotetroze. Te se medseboj povezujejo preko  $\alpha$  1,6 vezi. Pululan proizvaja mikroorganizem *Aureobasidium pululans*, ki ima zelo zapleten življenjski krog. Vendar pa je *Aureobasidium pululans* zelo hvaležen model za proučevanje, saj lahko z natančnim izborom seva in s tesnim nadzorom okolja močno vplivamo na obliko celic v koloniji (ali je oblika kvasna ali pa vlaknata). Tako posredno vplivamo tudi na reološke lastnosti juhe, v kateri poteka kultivacija. Kot je že zgoraj omenjeno ima lahko naš mikroorganizem več oblik in le kvasna je tista, ki je sposobna proizvajati pululan (Seviour and Kristiansen and Harvey, 1983 and Heald and Kristiansen, 1985).

## STRUKTURNA FORMULA



Molska masa pululana doseže po 72 urah kultivacije maksimum, ki znaša 2.000.000 g/mol. Kasneje pa začne molska masa upadati in po 96 urah doseže 100.000 g/mol (McNeil and Kristiansen, 1987). To bi lahko bila posledica delovanja encimov endoamilaz, ki naj bi bili prisotni v fermentacijski juhi. Do danes tega encima še niso uspeli izolirati. Na molekulsko težo vpliva tudi to, kakšen fosfatni vir je uporabljen. Fosfatni vir vpliva tudi na končno koncentracijo pululana in na njegov pridelek. V poskusih je bila najvišja koncentracija pululana pogosto povezana z najnižjo navidezno viskoznostjo fermentacijske brozge (Ajayi, 1987). Viskoznost brozge je odvisna od morfologije celic in sicer, več je kvasovkam podobne oblike, manj viskozna je juha, in več je vlaknatih celic, večja je viskoznost juhe. Zato je bilo ugotovljeno, da so reološke lastnosti juhe v večini odvisne od morfologije celic. Na količino proizvoda pa vpliva tudi pH vrednost, katere optimum je od 4,5 do 5,5.

Posebno pozornost so posvečali viru dušika. Sedaj je jasno, da povzroči signal za začetek sinteze ekstracelularnih polisaharidov, izčrpanje dušika. Običajno je dušik dodan kot  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in sinteza ekstracelularnih polisaharidov se prične, ko amonijev ion izgine iz medija. To so opazili pri proučevanju produkcije več različnih polisaharidov in spoznali, da je ta signal posebno značilen za polisaharide, ki služijo kot shramba ogljika. Menijo, da amonijev ion uveljavi svoj vpliv (inhibira) pri sintezi encimskih proteinov za sintezo ekstracelularnih polisaharidov (Bulmer, Catley and Kelly, 1987). Veliko znanstvenikov je proučevalo, zakaj od časa do časa ne pride do popolne uporabe dušika. Ugotovili so, da je v fazi fermentacije, v kateri pride do izginotja dušika, topnost kisika skoraj nič. Tako postane mikroorganizem subjekt dveh limitnih pogojev. Čeprav so efekte limitnega dušika dobro proučili, pa ni bilo izvedenih veliko raziskav v zvezi z nizko koncentracijo kisika. In čeprav poznamo efekte obeh limitnih pogojev, kadar nastopata vsak zase, pa do sedaj še ne vemo, kakšen vpliv imata skupaj na naš mikroorganizem. Znanstvenika McNeil in Kristiansen sta proučevala efekt zmanjšanja kisika in sta zato sistem namirno močno obogatila s kisikom (McNeil and Kristiansen, 1986), vendar njun sistem ni dal kaj znatno boljših rezultatov v produkciji pululana.

Proučeni so bili tudi elementi v sledovih: železo, cink, baker, kalcij, molibden, kobalt, jod in bromidijev ion (Reeslev, Nielsen and Yorgensen, 1990). Prisotnost železovega in cinkovega iona vodi k zmanjšanju kvasovkam podobnih celic in posledično k zmanjšanju produkta.

Kljub temu, da je pululan opisan kot sekundarni metabolit, ga večina kinetično-produkcijskih analiz opisuje, ali kot v celoti povezanega z rastjo kulture, ali pa kot produkt s srednjo kinetiko, ampak v povezavi z zelo malo ne rastnimi pojmi (Lacroix, Le Duy, Noil and Choplin, 1985 and Kristiansen, Charley, Seviour, Harvey, Habeeb and Smith, 1982).

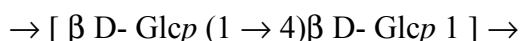
Pridobivanje pululana iz supernatanta zahteva razrečitev fermentacijske brozge, da zmanjšamo viskoznost medija in omogočimo filtracijo. Temu sledi obdelava z aktivnim ogljem, da odstranimo pigmentacijo.

### 3.5 CELULOZA

Celuloza je najbolj razširjen polisaharid na Zemlji. Je ena izmed glavnih sestavin celične stene in ima pomembno vlogo pri strukturi rastlin. Celulozo pa ne proizvajajo samo rastline, ampak tudi nekaj mikroorganizmov.

Celulozo lahko proizvaja več speciesov *Acetobacter* vendar se v industrijske namene uporablja predvsem *Acetobacter xylinum*. *Acetobacter* izloča celulozo kot ekstracelularne mikrofibrile, ki se hitro združijo in se na površju akumulirajo v opno. To se zgodi v plitvih nestresajočih kulturah. Druga možnost te iste kulture je v potopljenih kulturah, kjer stopnja aeracije močno vpliva na količino pridelka. Kot vir ogljika je primerna melasa (vsebuje od 55% do 60% saharoze) ali koruzna vodka (corn steep liquor). Dosti manj primerna je glukoza, saj jo mikroorganizem konvertira v glukonsko kislino. Le-ta lahko drastično spremeni pH vrednost. Zaželeno je, da se vsaj 20% substrata konvertira v polisaharid.

#### STRUKTURNI FORMULA



## 4. BIOINŽENIRSKÉ OSNOVE BIOPROCESA

### 4.1 IZOLACIJA MIKROORGANIZMOV ZA PRODUKCIJO POLISAHARIDOV

Mikroorganizmi, ki proizvajajo ekso polisaharide, živijo v naravi v zelo različnih tipih okolja. Lahko jih najdemo v zemlji, sladki, slani vodi, povezani z rastlinami oz. hrano in celo kot produkti arhej v mediju z visoko vsebnostjo soli, visoko temperaturo oz. v alkanem mediju. Mnogi človeški oz. živalski patogeni so sposobni tvoriti polisaharide. Ker predstavljajo potencialno tveganje industrijam, jih za te namene ne bodo uporabljali, čeprav pa ne smemo pozabiti, jim lahko vsaj v teoriji, spremenimo njihov biosintetski sistem tako, da postanejo ne-patogeni in celo koristni. Vendar je verjetnost da bodo postali komercialno zanimivi dokaj mala. Majhno število polisaharidov patogenih mikrobov se uporablja kot komponente cepiv, to so na primer polisaharidi *Streptococcus pneumoniae* in *Haemophilus influenzae*.

Čeprav mikrobe, ki proizvajajo polisaharide lahko najdemo v tako različnih okoljih, je pomanjkanje znanja o fiziologiji vrste in prenašanju proizvodnje v večje obsege, močno zmanjšalo število potencialnih novih produktov. Kelco Division, ki ima veliko uspeha pri odkrivanju bakterijskih kultur, ki proizvajajo polisaharide z novimi lastnostmi je objavil celo vrsto novih polimerov. Čeprav je bilo sprva mišljeno, da ti polimeri izvirajo iz različnih vrst bakterij, so bili pred kratkim označeni kot izolati vrste *Sphingomonas paucimobilis*. (Polloc, 1993)

### 4.2 MEDIJ IN KONDICIJA KULTUR

Še vedno ne poznamo selektivnega medija, ki bi ga lahko specifično uporabljali za izolacijo mikrobov, ki proizvajajo polisaharide, vendar se optimalnim pogojem za rast in razvoj le-teh lahko dobro približamo z znanjem, ki smo ga dobili s preučevanjem ostalih mikroorganizmov. Večina gojišč, ki jih uporabljamo za gojitev takih mikrobov, ima visoko vsebnost ogljika.

Če je namen izolirati vrste iz narave, kot je na primer voda, zemlja ali rastlinsko tkivo, potem je najbolje uporabiti medij kot ga prikazuje naslednja tabela:

Spojina	medij 1	medij 2
Hidrolizat kazeina-a	1,0	0,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,0	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0	0,3
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	0,1
NaCl	1,0	0,1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	0,02
CaCl <sub>2</sub>	0,02	0,001
FeSO <sub>4</sub>	0,001	0,0001
Kvasni ekstrakt-b	1,0	0,1
Glukoza-c	20,0	10,0

Tabela 1: Tabela, ki prikazuje razmerja ogljika/dušika [g/L]

a - H<sub>4</sub>Cl ali NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> se lahko uporabita namesto hidrolizata kazeina

- b – kvasni ekstrakt za zagotovitev rastnih faktorjev
- c – glukozo lahko nadomestijo saharoza ali glicerol za posamezne vrste

Te komponente omogočajo rast mnogim vrstam bakterij, ki proizvajajo polisaharide. Tudi nižja vsebnost organskega dušika in koncentracija soli, ki sta prikazana v mediju 2, sta zaželeni za nekatere mikroorganizme.

Kot vir ogljika se običajno uporablja glukoza v koncentraciji 2 – 5% (w/v). To je najbolj zaželen vir ogljika za mnoge mikroorganizme, hkrati pa je tudi lahko dostopna, cena pa variira glede na čistost le-te. Za nekatere mikrobe sta glukoza in saharoza enakovredna vira ogljika, vendar so nekateri mnogo bolj občutljivi na vire ogljika. Poznane so tudi bakterije za proizvodnjo polisaharidov, ki imajo to lastnost, da lahko rastejo na drugih virih ogljika, kot je na primer metanol. V industrijski proizvodnji mikrobnih polisaharidov je vir ogljika kompleksen in je običajno pridobljen kot stranski produkt v industriji za predelavo rastlin. (Miller and Churchill, 1986)

Večina mikroorganizmov za proizvodnjo polisaharidov je inkubirana pri temperaturi 30°C, čeprav je inkubacija pri suboptimalnih pogojih največkrat boljša za proizvodnjo polisaharidov. Zato bi bila ekonomska prednost v uporabi termofilnih mikroorganizmov z večjo odpornostjo na višjo temperaturo, saj bi prihranili pri dragem sistemu za hlajenje.

Efekt, zaradi spremembe v sestavi rastnega medija je pokazan na primeru proizvodnje ksantana. (Souw and Demain, 1979) Pokazano je da je saharoza kot vir ogljika sicer boljša kot glukoza vendar zelo malo, vendar je pri koncentraciji saharoze nad 4% bil izkupiček reducirán, medtem ko se to ni pojavilo pri glukozí. Prisotnost piruvata, sukcinata, ali  $\alpha$ -ketoglutarata je imela stimulirajoči učinek na proizvod samo pri substratu s saharozo.

Količina produkta je odvisna tudi od stopnje oksidacije vira ogljika. Če je oksidacijska stopnja večja ali manjša, kot je pri heksozi je produkcija manjša. (Linton, 1987) Pri tem se sprošča več toplote in zato je potrebno bioreaktor primerno hladiti.

Večina substratov primernih za kultivacijo gliv vsebuje precej ogljikovih hidratov. (Booth, 1971) Izolacija pa zahteva poseben medij z dodatkom inhibitorjev za rast bakterij.

Za industrijsko proizvodnjo polisaharidov se uporabljajo najcenejši substrati, kot so koruzni sok, tropine, encimski ali kislinski hidrolizati škroba, ki še zadostujejo za proizvodnjo konstantne količine in kvalitete produkta. Nekateri izmed teh substratov vsebujejo rastne faktorje in aminokislíne, ki jih mikroorganizmi potrebujejo. Voda, ki je uporabljena pri industrijski proizvodnji ni destilirana, kot je to v laboratorijih, temveč je to voda iz vodovoda. Zato je stalno potrebno spremljati lastnosti vode in uravnavati pH. V industriji pH uravnavajo z dodatki kisline ali baze, medtem ko v laboratorijih v ta namen uporabljajo pufre.

Primarne raziskave o vplivu hranljiv na produkcijo polisaharidov potekajo v tresočih steklenicah, vendar pa so mnogo bolj primerni mešalni bioreaktorji, ker so tu razmere mnogo boljše, predvsem kar se tiče aeracije. V steklenicah s časom narašča tudi viskoznost, kar pa povzroča da imajo mikroorganizmi na voljo vedno manj kisika, ker je prezračevanje otežkočeno. Tudi pH je veliko lažje uravnavati v bioreaktorju, kar je zelo pomembno za normalno rast mikrobov. Pomemben je tudi način mešanja. Pri nekaterih

kulturah gliv, gojenih v bioreaktorju z Rusthonovo turbino je doprinos manjši zaradi le-te, kajti tako mešanje ima inhibitorni učinek zaradi velikega striga, v primerjavi s posodami, kjer se mešanje odvija s pomočjo dvigovanja zraka.

#### 4.3 MOŽNOSTI V RAZVOJU VRST:

V produkciji exopolisaharidov obstaja mnogo postopkov, pri katerih se genski inženiring lahko izkaže za koristnega. Uporablja se prenos genov s katerim bi bilo mogoče vsaj v teoriji razviti popolnoma novo strukturo polisaharida. V praksi je bilo narejeno manj. Korak naprej je bil narejen v poenostavitvi ponavljajočih enot strukture polisaharida, in sicer z redukcijo dolžine stranskih verig polimera. Take molekule res kažejo drugačen reološke lastnosti, vendar je izkoristek bistveno manjši, kot pri gensko nespremenjenih mikroorganizmih. Večji izkoristek na industrijskem področju prinese boljše konstrukcija bioreaktorja in spremembe v sestavi substrata. Izkoristek povečamo tudi z odstranitvijo genov za produkcijo neželenih encimov in rezervnih polimerov. Produkcija polisaharida je kompleksen proces, ki vključuje mnoge encime, od katerih so eni pomembni za sintezo polisaharidov, drugi pa sintezo ali metabolizem drugih komponent v celici.

#### 4.4 FAKTORJI KI OMEJUJEJO PRODUKT

##### 4.4.1 NEŽELJENI PRODUKTI

Številni mikroorganizmi proizvajajo več kot le en polisaharid oziroma tvorijo druge polimere kot so glikogen ali poli- $\beta$ -hidroksibutirinska kislina. Tako eno kot drugo precej zmanjšuje količino proizvoda. To poveča izgubo vira ogljika in stroške procesa, zato znanost teži k razvoju mikroorganizmov, ki bi proizvajali samo en, določen polisaharid. Tako na primer *X. Campestris* proizvaja ekstracelularni encim, celulazo in to pripelje do neželenih učinkov. Zato je boljše uporabljati mutante, ki celulaze niso zmožni proizvajati oziroma uporaba blage toplotne obdelave za inaktivacijo encima, med izolacijskimi postopki ob zaključku proizvodnih bioprosesov. Podobne težave se pojavijo med podaljšano inkubacijo *Aureobasidium pullulans*, pri kateri je produkt manjši skoraj zagotovo zaradi prisotnosti uničujočih encimov. Še vedno ni znano ali je mogoče gene za tvorbo tega encima odstraniti ali ne. Če mikroorganizem proizvaja več kot en polisaharid je včasih potrebno onemogočiti proizvodnjo enega, ker je drugače nemogoče ločiti posamezen produkt iz suspenzije obeh. Tak primer kaže vrsta *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, ki je prvotno proizvajala kurdlan in sukcinoglikan, njeni mutanti pa samo kurdlan in zato je ta mutant uporabljen za proizvodnjo le-tega. (Amemura, 1977)

##### 4.4.2 REPRESORJI

Nespremenjeni mikroorganizmi za proizvodnjo polisaharidov imajo še eno pomanjkljivost. V mnogih sistemih je sinteza represirana in zato so produkti manjši. (Govan, 1981)

##### 4.4.3 SPREJEM HRANIL



Na količino proizvoda vpliva način in učinkovitost sprejemanja hranil. Lahko se vrši z aktivnim transportom oziroma mehanizmom za translokacijo. Sprejem ogljika je največja omejitev pri proizvodnji polisaharidov in večja učinkovitost bi vodila k večjim produktom.

#### **4.4.4 ZAKLJUČNI PROCESI**

Eden največjih problemov pri produkciji eksopolisaharidov predstavlja ločevanje biomase od visoko viskoznega ali slabo topnega produkta. Z genskim inženiringom je mogoče spremeniti površino celic na ta način, da se poveča hidrofobnost, celice se zlepijo skupaj in na ta način se mikroorganizmi lažje ločijo do polisaharidov.

### **4.5 LABORATORIJSKA IN INDUSTRIJSKA PRIPRAVA MIKROBNIH POLISAHARIDOV**

Mikroorganizme za proizvodnjo eksopolisaharidov lahko gojimo na trdnem, v tekočem gojišču, v odprtem ali zaprtem procesu.

#### **4.5.1 ZAPRTI SISTEM**

Zaprta sistem se uporablja za industrijsko proizvodnjo polisaharidov, hkrati pa je to tudi metoda, s pomočjo katere določamo kondicijo kulture, optimiziramo sestavo gojišča in pH. Te raziskave običajno potekajo v tresočih stekleničkah, za katere pa vemo, da jih je težko uspešno prezračevati in tudi pH se močno spreminja. Struktura gojišča se konstantno spreminja z rastjo, merimo pa lahko le spreminjajoče parametre. Nadaljnje raziskave potekajo na nekoliko večjih napravah – mešalnih bioreaktorjih majhnega volumna. Le-ti imajo vgrajene elektrode za stalno merjenje pH, Eh, imajo mešalo in napravo za vzorčenje. Nato raziskovanje preidejo na pilotne naprave, ki dajejo informacije o konverziji substrata, količini in kvaliteti proizvedenega polisaharida. Končno pa lahko preidemo na bioreaktorje velikega volumna za industrijsko proizvodnjo. Ti bioreaktorji imajo volumen 10 - 200m<sup>3</sup>, fermentacija pri bakterijah poteka 48-72h in v tem času je izkoristek 60-70%.

#### **4.5.2 ODPRTI SISTEM**

Za študij proizvodnje polisaharidov ima odprti sistem mnoge prednosti pred ostalimi. Rast lahko nadzorujemo z dodajanjem samo enega hranila, medtem ko so ostale komponente konstantne in se ne spreminjajo tako kot pri zaprtem. S pomočjo inštrumentov kontinuirno merimo rastne parametre, pretok zraka, hitrost mešanja. S pomočjo teh študij ugotovimo vplive različnih substratov in omejujočih hranil. (Davidson, 1978)

Seveda pa tudi pri odprtih sistemih ne gre brez težav. V odprtem sistemu se hitreje selekcionirajo mutanti, ki uničujejo želene karakteristike proizvajanega polisaharida. Čeprav ima odprti sistem velik potencial, ga vseeno ne uporabljajo v industriji zaradi težkega vzdrževanja sterilnosti in pojava mutantov.

#### **4.5.3 INDUSTRIJSKA PROIZVODNJA POLISAHARIDOV**

Pri vsaki proizvodnji polisaharidov se hidrodinamika bioprocesne brozge spreminja s časom. Zato mora biti prisotno primerno zračenje in mešanje, da ne pride do mrtvih con. Pri tem pa igra pomembno vlogo konstrukcija bioreaktorja. Zagotoviti moramo zračenje,

mešanje, dober prenos mase in toplote. Zaradi velike viskoznosti, ki jo dosežejo bioprocenčne brozge, se bolj uporablja mešanje z mešali, kot pa mešanje s pomočjo dvigovanja zraka.

Reologija mikrobnih polisaharidov je kompleksna. Polimeri kot sta pululan in ksantan kažejo psevdoplastičnost, nekateri alginati pa so tiskotropni.

#### 4.5.4 IZOLACIJA PRODUKTA

Zaključni, izolacijski procesi predstavljajo znaten delež cene proizvodnje polisaharidov. Prisotnost bakterijskih celic je neželena in odstranitev le-teh iz viskozne brozge predstavlja težavo. V laboratoriju to izvedemo s centrifugiranjem ali ultracentrifugiranjem, nevezan material z nizko molekulsko maso pa lahko odstranimo tudi z dializo ali v koloni z ionskimi izmenjevalci. Eksopolisaharide potem oborimo iz raztopine z dodatkom polarnih topil, kot so etanol, aceton ali izopropanol. V industrijskih postopkih pa moramo izrabiti drugačne metode čiščenja. Namen je koncentrirati produkt v stabilno obliko, primerno za transport in pripravljeno za uporabo. S temi postopki ne smemo zmanjšati kvalitete in uničiti moramo neželene encimske aktivnosti. Bistvena je odstranitev celic iz bioprocenčne brozge, oboritev polisaharida, odstranitev vode, sušenje, mletje in pakiranje.

Da ohranimo kvaliteto moramo pri postopkih paziti na določene faktorje. Uporaba visoke temperature za pasterizacijo povzroči razkroj nekaterih polisaharidov in poveča viskoznost. Filtracijo za odstranitev celic lahko pospešimo z razredčevanjem ali povišano temperaturo. Viskoznost zmanjšamo tudi z dodatkom soli in s tem olajšamo filtracijo.

#### 4.5.5 KONCENTRATI BROZGE

Večina stroškov v zaključnih procesih se nanaša na čiščenje in izolacijo polisaharidov, torej imajo ekonomsko prednost tisti proizvodi, ki so bili koncentrirani direktno iz brozge. Taki produkti se tudi lažje topijo in dosežena viskoznost raztopine je večja kot viskoznost raztopine iz prahu. Koncentrati vsebujejo 8-12% suhega polisaharida, kateremu so dodani določeni agensi za preprečevanje kvara.

#### 4.5.6 PRIMERI PROIZVODNJE POSAMEZNIH POLISAHARIDOV:

##### **Celuloza:**

Celulozo sintetizirajo mnoge *Acetobacter spp.* Vzgajamo jih kot submerzno kulturo. Zelo je pomembna konstrukcija bioreaktorja in stopnja zračenja, za optimalno proizvodnjo. Za substrate se uporablja cenene snovi kot so melasa s 55-60% saharoze in koruzni sok. Oba sta primernejša od glukoze. Proizvodnja poteka v mešalnih bioreaktorjih z nizko strižno silo.

##### **Dekstran:**

Proizvodnja dekstrana zahteva dobro bakterijsko rast in optimalno produkcijo encima. Substrat vsebuje anorganske soli, koruzni sok (2%) in do 10% saharoze. Konverzija saharoze v dekstran je odvisna od koncentracije substrata in pogojev, izkoristek pa se giblje med 42-46%. Bioreaktorske posode imajo volumen okoli 6000m<sup>3</sup>. Fermentacija poteka pri 25°C, pH pa se giblje med 6,5-7 in 4, zaradi tvorbe mlečne kisline. Brozgo mešamo in jo prezračujemo, viskoznost pa se stalno povečuje. Ob koncu se vrši depolimerizacija s

hidrolizo s HCl pri 100 - 105°C, pri tem pa se viskoznost zmanjšuje. Na koncu filtriramo, dekstrane pa oborimo z etanolom ali metanolom pri določeni temperaturi.

**Ksantan:**

Ksantan je eksopolisaharid *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Je eden glavnih komercialnih polimerov. Na leto ga proizvedejo >20.000 ton. Proizvodnja poteka v močno prezračenih mešalnih bioreaktorjih. Skozi celoten bioproces natančno spremljajo sestavo gojišča, saj je to pomembno za končno kvaliteto produkta. Potem poteče pasterizacija, ki pobije bakterije, nato pa sledi izolacija z alkoholom ali izopropanolom. Raztopina ksantana je močno psevdoplastična.

**Pululan:**

Pululan je ekstracelularni polisaharid *Aureobasidium pullulans*. V industrijski proizvodnji pululana se uporablja veliko razmerje ogljik/dušik, saharoza pa predstavlja vir ogljika. Alternativa temu je rast v mediju, ki temelji na fruktozi in pri tem dobimo produkte z visoko molekulsko maso. Izolacija polisaharida brez celic zahteva razredčitev za zmanjšanje viskoznosti, da je filtracija lažja. Za filtracijo pa so prisotni še postopki za odstranitev pigmenta. Molekulska masa produkta zavisi od fizikalnih pogojev med bioprocesom in tudi od vrste bakterije.

## 5. EKOLOŠKI ASPEKT BIOPROCESA

Proizvodnja ekstracelularnih polisaharidov predstavlja veliko obremenitev okolju, predvsem z vprašanjem odpadnih vod in vnosom energije v okolje:

- Sam proces potrebuje vodo kot sestavni del substrata in kot sredstvo za hlajenje. Gorivo je potrebno za proizvodnjo pare in sterilizacijo, električna energija pa za mešanje in črpanje zraka in tekočin.
- Pri izolaciji produkta zopet potrebujemo električno energijo za črpanje, filtracijo, centrifugiranje bioprocesne brozge in mletje suhega produkta. Gorivo pa v tej fazi potrebujemo za pasterizacijo in sušenje.
- Končno pa sta voda in gorivo potrebna tudi na koncu za čiščenje bioprocesne opreme.

Večje količine vode porabimo tudi ob koncu bioprocesa, med izolacijo produkta in sicer zaradi redčenja visoko viskozne bioprocesne brozge. Drugi problem predstavlja tudi biomasa na koncu bioprocesa. V zadnjem času potekajo raziskave o možnosti uporabe biomase kot sredstva za čiščenje težkih kovin iz vod.

## 6. UPORABA BIOPROIZVODOV V PROIZVODNJI HRANE

Dolgoveržni polimeri z visoko molekularno težo, ki se v vodi raztopijo ali razpršijo, dajejo raztopini želirne ali zgoščevalne lastnosti in prav zato so nujno orodje za formulacijo prehranskih izdelkov. Taki polimeri se uporabljajo tudi za sekundarne efekte,

kamor spada emulzifikacija, stabilizacija emulzij, kontrola kristalizacije, inhibicija sinereze, formacija mreže oziroma prevleke...

Večino polisaharidov, ki jih običajno uporablja prehrabena industrija, pridobivamo s kultivacijo rastlin (npr. škrob in galaktomanane) ali iz morskega rastlinja (npr. agar, alginat in karaginane). Pektin pridobivamo iz rastlinskega odpadnega materiala prehrabeno predelovalnih industrij (npr. ekstrakcija sokov in proizvodnja mošta). Za proizvodnjo prehranskih polisaharidov, kot so npr. ksantan, gelan, dekstran in številni drugi, pa se uporablja mikrobná fermentacija, zato spadajo med t.i. mikrobné polisaharide. Ti polisaharidi se veliko uporabljajo v prehrabeni industriji, in sicer v oljarnah, farmaciji in kozmetiki. V nekaterih od teh uporab lahko nadomestijo splošno rabljene polimere. V tem primeru morajo biti cenejši ali imeti boljše lastnosti. Dobro je vedeti, da mikrobní produkti, kot je ksantan, stanejo šest do deset funtov na kilogram v primerjavi z alginatom, ki stane štiri do šest funtov na kilogram, ali z guar-jem, ki pa stane le eden do dva funta na kilogram (Linton, 1991). Funkcionalne lastnosti teh polimerov so odvisne od njihovih unikatnih kemijskih struktur in prav te se lahko spreminjajo z metodami ekstrakcije, starostjo, virom in tipom rastlin ali tkiv alg.

Uporaba polisaharidov v prehrani verjetno znaša komaj pod desetimi procenti uporabe vseh tipov polisaharidov. V živilih sta od vseh polisaharidov najbolj uporabljena škrob in modificiran škrob, vendar so vključene tudi vrste ostalih polisaharidov. Polisaharide dodajamo hrani, da zagotovijo ustrezne lastnosti med predelovanjem in videz, ki bo ugajal potrošniku. Njihova vloga je zelo pomembna, saj delujejo kot sredstva za zgoščevanje ali želiranje, uporabljajo pa se tudi zaradi njihovih koloidnih lastnosti.

Tabela 1: Lastnosti polisaharidov, ki se uporabljajo v prehrani

<b>Funkcija</b>	<b>Uporaba</b>	<b>Funkcija</b>	<b>Uporaba</b>
Lepljivost, sprejemljivost	Sladkorni oblivi in glazure	Stabilizator pene	Pivo
Želirno sredstvo	Želeji, sadni kolači	Čiščenje	Vino, pivo
Vežalno sredstvo	Hrana za ljubljénke	Inhibitorji (tvorba ledenih kristalov)	Zmrznjena hrana, pilule, sirupi
Premazi	V slaščičarstvu	Stabilizatorji	Sladoled
Emulgiranje	Omake za solato	Sredstvo za zgoščevanje	Džemi, omake, džemi, sokovi, sirupi

Izmed vseh polisaharidov se najbolj uporablja škrob prav zaradi njegove nizke cene in združljivosti z mnogimi sestavinami hrane. V zmrznjenih in odtajanih živilih so polisaharidi vključeni v nadzor tvorbe ledenih kristalov. Preden pa se odločimo za uporabo nekega polisaharida v hrani, moramo upoštevati naslednje faktorje:

- Tip aplikacije
- Viskoznost ali zmrzovanje
- Občutek v ustih
- Videz
- Sposobnost emulzifikacije
- Kompatibilnost z ostalimi sestavinami hrane

- Sinergistične in druge efekte
- Stabilnost do fizikalnih in bioloških faktorjev pod pogoji, ki jih nameravamo uporabiti
- Cena
- Sprejemljivost oziroma zadovoljivost (legalna, potrošniška in druge)
- Kakovost (brez vonja, okusa, trdna kvaliteta,...)

Poleg tega, da so polisaharidi vključeni v prehrano za človeško potrošnjo, pa se uporabljajo tudi v prehrani za domače živali, še posebno v pripravkih, ki delujejo kot zgoščevalci. Če so polisaharidi vključeni v človeško ali živalsko živilo, morajo biti združljivi s solmi, pH-jem in drugimi komponentami, ki jih najdemo v prehrani. V tem oziru je ksantan zelo zadovoljiv.

Ksantan je eden izmed mikrobnih polisaharidov, saj ga pridobivamo iz mikroorganizma *Xanthomonas campestris*. Po številnih raziskavah so leta 1969 odobrili uporabo ksantana v proizvodnji hrane (Baird, 1983). Ksantan je rumenkasto obarvan prašek, ki se zlahka raztaplja v vroči ali mrzli vodi. Tako že pri nizkih koncentracijah ksantana dobimo zelo viskozno raztopino. Raztopine, v katerih pa so prisotne še majhne količine elektrolitov, imajo odlično termično stabilnost. Pod določenimi pogoji pa viskoznost ksantana ostane stabilna tudi v bazah in kislinah. Njegova stabilnost in kompatibilnost pa se kaže tudi v prisotnosti visokih koncentracij soli (npr. v 15 % raztopini natrijevega klorida ali 25 % raztopini kalcijevega klorida). Najbolj nenavadna lastnost ksantana je reaktivnost z galaktomanani, kot so lepljive substance rožičevega semena in lepljive substance guar-ja. Kombinacija ksantana in lepljivih substanc rožičevega semena daje pri nizkih koncentracijah (manj kot 0,1 %) v raztopini povečano sinergistično viskoznost, medtem ko se pri višjih koncentracijah lepljivih substanc (večjih kot 0,2 %) oblikuje koheziven, termoreverzibilen gel. Sicer pa se ksantan veliko uporablja prav zaradi njegovih fizikalnih lastnosti. V nekaterih živilih kaže ksantan zelo dobre lastnosti, in sicer hiter izpust arome, dober občutek v ustih in kompatibilnost z drugimi sestavinami hrane vključno s proteini, lipidi in polisaharidi. Veliko živil že vsebuje polisaharide, kot je škrob in pektin, proteine in lipide in zato je zelo pomembno, da je vsak dodan polimer, kot je npr. ksantan, z njimi totalno kompatibilen. Nekatera živila, kot so solatni prelivi in jogurti, imajo nizek pH, zato morajo biti katerikoli polisaharidi, ki so vključeni v to hrano, kislinsko stabilni. Ksantan je stabilen v širokem območju pH vrednosti in zato je zelo primeren za tako uporabo. Polisaharidi, kot je ksantan, so lahko vključeni v različne tipe živil (sokove, sirupe, konzervirano in zmrznjeno hrano, suhe mešanice,...). Ksantan je v nizkih koncentracijah lahko prisoten tudi v sokovih in drugih pijačah. Prav pri teh produktih je glavna vloga mikrobnega polisaharida bodisi suspendirati sadno pulpo bodisi ohraniti peno na vrhu pijače. Prav zaradi njegovih unikatnih lastnosti se ksantan lahko uporablja ne le v prehrani, ampak tudi farmacevtski, kmetijski in naftni industriji.

Tako kakor ksantan tudi gellan spada med ekstracelularne mikrobnne polisaharide, saj ga pridobivamo z aerobno submerzno fermentacijo bakterije *Pseudomonas elodea*. Gellan so prvič odobrili za uporabo v prehrani na Japonskem leta 1988, v omejenem spektru pa tudi v ZDA leta 1990. Proizvodna združba Kelco išče odobritev za uporabo gellana v prehrani, vključno s slaščičarskimi in mlečnimi izdelki (Morris, 1990 and Dziezag, 1990). Gellan namreč funkcioniira kot želirno sredstvo in prav zato se lahko veliko uporablja v proizvodnji hrane. V majhnih količinah (pri stopnji 0,2 %) daje pri povišani temperaturi vodno raztopino z nizko viskoznostjo, toda gele tvori šele po hlajenju. Za želiranje je potrebna tudi prisotnost različnih kationov, kot so kalcij, magnezij, kalij in natrij. Čvrstost

gela je odvisna od prisotnosti različnih kationov, in sicer je privlačnost divalentnih ionov, kot sta magnezij in kalcij, večja kot pri enovalentnih ionih. Tako dobimo optimalno čvrstost gela pri nižjih koncentracijah divalentnih ionov, medtem ko za tako čvrstost gela potrebujemo višje koncentracije monovalentnih ionov. Nizko acilirana oblika gellana ima veliko funkcij, in sicer kot sredstvo za želiranje, stabiliziranje, suspendiranje in strukturiranje, lahko pa se uporablja tudi v kombinaciji z drugimi hidrokoloidi v hrani. Deaciliran polimer pa je netopen v mrzli vodi zaradi nizkih koncentracij divalentnih ionov, zato v raztopino dodajamo sekvestrante, kot je natrijev citrat, ki polimeru povrnejo hidracijo in topnost. Krhki geli gellana dajejo zelo dobro aromo in so stabilni v širokem pH območju. Krhkost gela pa se lahko zmanjša z dodatkom mešanice ksantana in lepljive substance rožičevega semena. Dobra čvrstost, stabilnost in čistost gela zagotavlja osnovo za številne potencialne uporabe gellana v proizvodnji hrane, kar lahko vidimo v naslednji tabeli:

Tabela 2: Potencialne uporabe gellana v proizvodnji hrane

Tip hrane	Produkti	Običajna uporaba polisaharida
Slaščičarski izdelki	Želeji, nadevi, marshmallows	Pektin, škrob, agar, ksantan
Mlečni izdelki	Sladoledi, mlečni napitki, namazi	Karaginan, alginat, guar
Sladkorni oblivi, glazure	Pekarski sladkorni oblivi, glazure za torte	Agar, pektin, ksantan/guar, škrob
Geli	Deserti, hladetine ali žolce	Alginat, agar, karaginan
Želeji, džemi	Nizkokalorični džemi, nadevi	Alginat, pektin, karaginan
Sestavljena hrana	Sestavljeni in teksturni izdelki	Alginat, karaginan

Eni izmed ekstracelularnih polisaharidov so tudi ciklodekstrini, ki jih pridobivamo v industriji z delovanjem encima ciklodekstrin glukoziltransferaze iz mikroorganizma *Bacillus macerans* na škrobu. Ciklodekstrini imajo v proizvodnji hrane številne uporabe. Le ti lahko preprečijo oksidacijo vitaminov, arom in eteričnih olj. Kompleks iz samega mentola je dejansko brez vonja. Če pa so prisotni ciklodekstrini, se v ustih prav zaradi njih sprosti močan vonj mentola, ki se obdrži dalj časa, kot bi se sicer. Samo grenkobo v citrusnih sokovih lahko prikrijemo s ciklodekstrini, medtem ko se zelene arome in okusi ohranijo. Z uporabo ciklodekstrinov bi na tak način lahko prikrili tudi neželjene arome v nekaterih mesnih izdelkih (Szejtli, 1988). S prisotnostjo ciklodekstrinov je možno zmanjšati količino aromatičnih olj, ki so dodane žvečilnemu gumiju tudi do 50 %.

Tako žvečilni gumi, združen z zmletim pepermint-ciklodekstrinskim kompleksom, zagotavlja trajnejši in intenzivnejši okus. Japonci in Madžari so najavili še veliko drugih lastnosti ciklodekstrinov, in sicer vključno z emulzifikacijo, stabilizacijo pene in sredstvom za konzerviranje (Szejtli, 1988). Pred kratkim je bilo dokazano, da se  $\beta$ -ciklodekstrini lahko uporabljajo za odstranitev holesterola iz mleka, masla in jajc. Maslo z malo holesterola vsebuje približno šestkrat manj holesterola kot naravno maslo (Anon, 1991).

Tudi galaktomanani spadajo med ekstracelularne polisaharide, ki jih delimo na lepljive substance rožičevega semena in lepljive substance guar-ja. Individualno jih pridobivamo iz semen *Ceratonia siliqua* in *Cyamposis tetragonoloba* (Dea, 1975). Lepljive substance rožičevega semena tvorijo stabilne in močne gele, če se uporabljajo v kombinaciji s polisaharidi, kot je agaroz in kapa-karaginan. Lepljive substance guar-ja ne kažejo teh pomembnih funkcionalnih lastnosti, ki so zelo uporabne v prehrabeni industriji in prav zaradi tega nima tako visoke tržne vrednosti kot lepljive substance rožičevega semena. Lepljive substance guar-ja ne želirajo in se uporabljajo predvsem kot tvorci viskoznosti, stabilizatorji in povezovalci vode v produktih kot so deserti, sladoledi, omake, juhe, preliv, hrana za ljubljence, pekarski izdelki... Lepljive substance rožičevega semena so netopne v mrzli vodi in jih moramo segreti, da se raztopijo. Maksimalno viskoznost dosežemo, če to lepljivo substanco segrejemo na 95 stopinj Celzija in nato ohladimo. Lepljive substance rožičevega semena tvorijo gele pod pogoji nizke vodne aktivnosti, tako kakor pri visokih koncentracijah sladkorja, ki jih najdemo v produktih, kot so konzervirana hrana in zmrznjeni deserti (Dea, 1977). Poleg tega pa se ta lepljiva substanca uporablja še kot stabilizator v sladoledih, predelanem siru in v nekaterih mesnih izdelkih. Ima pa tudi to lastnost, da v kombinaciji z drugimi hidrokoloidi tvori gele.

Pomembno vlogo pri proizvodnji hrane igra tudi pektin, ki ga navadno pridobivamo iz lupin citrusov ali jabolčne pulpe. Pektin funkcionira kot sredstvo za želiranje, zgoščevanje in suspendiranje v prisotnosti kislin in sladkorjev pri pH 3,3-3,5. Približno 1 % pektina pomeni čvrst žele, ki naj ne bi povzročal sinereze. Visoko metoksirani pektini se uporabljajo za proizvodnjo konzervirane hrane, džemov, želejev, slaščičarskih izdelkov in dehidriranih pijač. Nizko metoksirane pektine pridobivamo največ s kemijsko deesterifikacijo in za tvorbo gelov rabijo le kontrolirano količino kalcijevih ionov pri pH od 2,9 do 7,0. Čeprav nizko metoksirani pektin tvori močne kalcijeve gele, je proces težko kontrolirati in prav zato ga malokrat uporabljamo.

Za razliko od pektina spada pullulan med mikrobnne polisaharide, saj ga pridobivamo iz mikroorganizma *Aureobasidium pullulans*. Mnogi polisaharidi, vključno s pullulanom, so sposobni tvoriti čvrste, upogljive kožice ali mreže po tem, ko se posušijo. To lastnost lahko izkoriščamo za tvorbo ovire pri migraciji vode ali maščobe v kompleksnih produktih kot so pečene pogače z nadevi. Prav zaradi njihove inherentne hidrofilne narave, polisaharidi raje naredijo učinkovite maščobne bariere kot pa vodne. Posamezni polisaharidi se lahko uporabljajo kot neprepustne prevleke za kisik z namenom podaljšanja življenja sadja in zelenjave na policah. Tudi pullulan bi se lahko uporabljal za tvorbo čvrste, neprepustne prevleke za kisik, toda ne vemo, ali se pullulan v ta namen sploh uporablja v praksi (Yuen, 1974). Kot nam je znano, se pullulan uporablja za tvorbo filma, ki je topen v vodi, odporen na olje in slabo prepušča kisik. Ta nov pakirni material zadrži okus in armo ter ohranja svež izgled hrane. Raztopine tega polimera se lahko uporabljajo še za oblikovanje prevlek brez vonja in okusa direktno na živila.

Nekaj mlečno kislinskih bakterij, izmed katerih je najbolj znana *Leuconostoc mesenteroides*, proizvaja dekstrane. Dekstrani ne igrajo pomembne vloge pri uporabi v prehrani, čeprav verjetno delujejo pri zgoščevanju fermentiranih mlečnih izdelkih, kot je jogurt. *Lactobacillus hilgardii*, sestavina starter kulture za kefir in fermentirane mlečne napitke, proizvaja polisaharid, ki tvori gel (Pidoux, 1990 and Pidoux, 1988). Kemične analize so pokazale, da je to dekstran z zelo kratkimi verigami alfa-1,3-D-glukoze, ki tvori

strukture v obliki traku, katere so se zmožne navzkrižno povezati med procesom želiranja (Morris, 1990 and Pidoux, 1988 and Pidoux, 1990).

Kurdlan, ki tudi spada med ekstracelularne mikrobne polisaharide, pridobivajo na Japonskem s fermentacijo *Alcaligenes faecalis* ali *myxogenes*. Ta polisaharid ima nenavadne lastnosti topnosti in želiranja. Topnost v vodi je odvisna od molekularne teže. Kurdlan s stopnjo polimerizacije pod 30 oziroma 45 je topen v vodi, medtem ko je kurdlan z višjo molekularno težo netopen. Tipičen kurdlan ima stopnjo polimerizacije od 155 do 455, kar je odvisno od pogojev fermentacije. Ta material se razprši v mrzli vodi in s tem daje motno koloidno raztopino. Ko segrejemo raztopino kurdla, postane čista pri približno 54 stopinj Celzija in tvori šibke gele pri 60 do 65 stopinj Celzija, trdne pa pri 75 do 80 stopinj Celzija. Geli, ki so formirani pri višjih temperaturah, so gibljivi in se ne topijo do 160 stopinj Celzija. Ti geli so stabilni med pH-jem 3 in 9, vendar so nagnjeni h krčenju in sinerezi. Na Japonskem kurdlan najbolj uporabljajo v slaščičarstvu. Kurdlan pa se uporablja še za izboljševanje teksture različnih izdelkov kot so tofu in ribje paštete, uporaben pa je še za zadrževanje vode, rekonstrukcijo in oblikovanje predelane hrane.

Najbolj uporabljena oblika alginata je v vodi topna natrijeva sol, čeprav so druge soli, kot so kalcij, kalij, amonijev alginat in derivat estra propilen glikol alginat, razpoložljive v trgovinah in so priporočene za uporabo v hrani. V prehrambeni industriji se alginati v veliki meri uporabljajo kot aditivi, ki so zmožni povišati viskoznost, stabilizirati, emulgirati in želirati vodne raztopine (Moe, 1995 and Sime, 1990). Najbolj pomembna uporaba je najbrž v proizvodnji sladoleda, kjer se uporabljajo ti polimeri za preprečevanje kristalizacije in krčenja, da dobimo homogen produkt. Alginati pa se uporabljajo tudi v gorčici, gorčičnih omakah, solatnih prelivih, kjer imata natrijev alginat in propilen glikol alginat to funkcijo, da stabilizirata produkt, da ne razpade. Alginati lahko stabilizirajo in zgostijo vodno fazo v oljnih emulzijah. Ta lastnost alginata se uporablja pri izdelovanju majoneze. Zaradi njihove nizke kalorične vrednosti se ti polimeri lahko uporabljajo kot dejavniki povečevanja pri oblikovanju hipokaloričnih produktov, kot so majoneza in namazi z malo maščobe. Lastnosti alginatov, kot so zgoščevanje, stabiliziranje in emulgiranje, se lahko uporabljajo tudi za izboljševanje različnih pijač, in sicer za mešane sadne pijače, medtem ko pri proizvodnji piva dodatek propilen glikol alginata služi za povečanje količine pene. Alginate odlikuje še ena dobra lastnost, in sicer so zmožni oblikovati termoreverzibilne gele, ki so toplotno stabilni. Prav zaradi te lastnosti se alginati uporabljajo še v pekarskih izdelkih, džemih, marmeladah, desertih, mlečnih izdelkih in tudi v konzervirani hrani za domače ljubljence. V hrani, kjer je prisotna kislina in znatne količine mnogovalentnih ionov, mora biti uporaba polisaharidov, kot je alginat, omejena zaradi zgoščevanja ali formacije gela. Druge zanimive aplikacije alginatov v proizvodnji hrane so pri produkciji strukturiranih mesnih izdelkov in izboljšanju teksture zmlete ribje paštete (Ahmed, 1983 and Rockower, 1983). Sveže meso lahko tretiramo s škropljenjem ali potopitvijo v raztopino natrijevega alginata, nakar sledi še želiranje s kalcijevim kloridom in na ta način dobimo zaščitno površino, ki jo kasneje lahko odstranimo z delovanjem polifosfatnih raztopin (Earle, 1968, 1970). Farmacevtske industrije navadno uporabljajo zelo prečiščene oblike alginatov in alginskih kislin kot stabilizatorje v raztopinah in za razkroj trdnih substanc (Hagstam, 1985). Alginati se veliko uporabljajo tudi v drugih industrijah, in sicer v tekstilni industriji, proizvodnji keramike, prodaji konzerv (Lapsin and Pricl, 1995). Nasplošno mora biti alginat, ki ga uporabljamo v hrani, pridobljen iz vira tradicionalnih morskih alg, toda tehnično bi bilo mogoče nadomestiti tak produkt z materialom bakterijskega izvora.



Karaginani so sulfatni linearni polisaharidi, ki jih pridobivamo iz rdečega morskega rastlinja. Uporabljajo se v prehrabeni industriji, saj delujejo kot sredstva za želiranje, zgoščevanje in stabiliziranje (FDA, 1992). Pred kratkim so se začeli uporabljati tudi v mesni industriji za zmanjšanje količine maščobe v teh izdelkih. Nekateri mesni izdelki vsebujejo običajno okrog 20 do 30 % maščobe (USDA, 1991). Zaradi tega je v mesni industriji zelo pomembno, da zmanjšajo količino maščob v njihovih izdelkih in tako lahko ponudijo okusne mesne izdelke, ki zadovoljijo zahteve potrošnikov. Maščobe seveda niso zdrave, vendar so v mesnih izdelkih zelo pomembne, saj mesu zagotavljajo sočnost, boljšo aromo in mehkejšo teksturo. Prav zaradi tega je očitno, da zmanjšanje maščob lahko povzroči poslabšanje organoleptičnih lastnosti izdelkov. Sicer pa je meso kompleks mišičnega tkiva, vezivnega tkiva, maščobe in vode. Med proizvodnjo se med vsemi temi komponentami dogajajo številne interakcije, ki so odgovorne za funkcionalne lastnosti mesa. Sicer pa karaginani v mesnih izdelkih oblikujejo gel in zadržujejo vodo.

V živilih se od vseh polisaharidov najbolj uporablja škrob prav zaradi njegove nizke cene in združljivosti z mnogimi sestavinami hrane. Predstavlja najpomembnejšo rezervno hrano pri svežem sadju in vrtninah, zato ga tudi pridobivamo s kultivacijo različnih rastlin. Nahaja se v obliki škobnih zrn, ki se razlikuje glede na poreklo rastlinskega materiala. Sestavlja ga amiloza in amilopektin, katerih vsebnost je konstantna, in sicer 15-25 % amiloze in 75-85 % amilopektina. Naraven škrob trpi zaradi inherentnih pomankljivosti, ki so neustrezne za veliko prehranskih izdelkov in prehransko predelovalnih postopkov. Naprimer, naraven škrob je v glavnem neprimeren za proizvodnjo izdelkov v slaščičarstvu. Slaščičarji uporabljajo kemično pripravljen tekoč škrob za proizvodnjo želeja pri običajnih temperaturah kuhanja. Škrob, ki lahko močno želira in z visoko vsebnostjo amiloze, je pred kratkim postal razpoložljiv iz posebno gojenih rastlinskih vrst. Ena od slabosti tega škroba, da potrebujejo visoko atmosferske temperature kuhanja, da dosežejo disperzijo. Nerazvejan koruzni škrob daje sladoledu kremasto strukturo in izboljšuje zaznavo arome in okusa v tistih izdelkih, ki trpijo za pomanjkanjem sočnosti, arome, okusa, kakovosti in občutka v ustih. Glavne lastnosti nerazvejanega škroba (nizka viskoznost, izboljšanje karakteristik želiranja, mimikrija maščobe in izboljšanje arome) so pokazale, da so zelo dragocene v številnih prehranskih izdelkih. Nerazvejan koruzni škrob daje sladoledu kremasto strukturo in izboljšuje zaznavo arome in okusa v tistih produktih, ki navadno trpijo za pomanjkanjem sočnosti, arome, okusa in kakovosti. Glavne lastnosti škroba (nizka viskoznost, izboljšana karakteristika želiranja, mimikrija maščobe in izboljšanje arome) so pokazale, da so zelo pomembne v številnih prehranskih izdelkih. Veliko produktov hidrolize škroba tvori gele s številnimi lastnostmi, ki so podobne tistim v maščobi. Zmožnost produktov hidrolize škroba je ta, da lahko prekrije nekaj teksturnih lastnosti maščob. Razvoj encimsko modificiranega škroba je v zadnjem času v središču pozornosti prav zaradi njegovih organoleptičnih lastnosti in nizke kalorične vrednosti.

Nova odkritja v encimski in fermentacijski tehnologiji na kontroliran način povečujejo število možnosti za spreminjanje strukture in funkcij polisaharidov. Ni dvoma, da nov razvoj v biotehnologiji ne bo prinesel nekaj tehnoloških rešitev, ki kljubujejo prehrabeni industriji. Tako bodo odkrili nove sestavine, ki se bodo lahko zoperstavili moderni tehniki v proizvodnji hrane (UHT, mikrovalovanje,...) in ki bodo lahko ustrezno funkcionirali pri oblikovanju novih produktov. Uspeh pri proizvodnji hrane in njenih sestavin v biotehnologiji pa bo navsezadnje odvisen od odobritve potrošnikov.

## 7. IMPLIKACIJE DRUGIH TEHNOLOGIJ IN IMPLIKACIJE NA DRUGE TEHNOLOGIJE

### 7.1 ALGINATI

Alginati so komercialno zanimivi, ker predstavljajo široko vrsto uporabnosti kot stabilizatorji, zgoščevalci, ki so v obliki gela ali tanke prevleke v različnih industrijskih področjih. Farmacevtska industrija pogosto uporablja visoko očiščene oblike alginatov in alginatnih kislin kot stabilizatorje v raztopinah, uporablja se njihovo sposobnost disperznosti trdnih substanc ter tudi kot vezalce in razkrojevalce v tabletah.

Kalcij in kalcij/natrijeva vlakna alginatov se uporabljajo v proizvodnji kirurških niti in obližev za rane (Picquadio and Nelson, 1992). Alginatne obliže damo na rano in izločki iz rane se absorbirajo na obliž, stvari se zaščitni film po površini, ki omogoča optimalno vlažnost za celjenje rane.

Alginatne kisline in trdne soli alginatov znižujejo frekvenco ezofagealnega refluksa brez uporabe naravno prisotnih želodčnih kislin in encimov želodca in so zato uporabni kot aktivne komponente v farmacevtskih produktih, ki preprečujejo gastroezofagealne napake.

Alginati predstavljajo tudi antitumorno in imunogeno aktivnost, oboje zaradi prisotnosti  $\beta$ -(1,4) uronske kisline (Espvik, 1993).

Poleg farmacevtske industrije se alginat uporablja tudi v tekstilni industriji, proizvodnji keramike, obdelavi voda in drugje (Lapasin and Price, 1995).

### 7.2 DEKSTRANI

Industrijski destran je polimer z visoko molekulsko maso (4 do  $5 \times 10^7$ ) in se uporablja za proizvodnjo gelsko filtracijskih produktov in za krvne razredčevalce.

Dekstrani z nizko molekulsko maso ( $75.000 \pm 25.000$ ) Da se uporabljajo v farmacevtske namene kot razredčevalci krvi (nadomestek krvne plazme). Produkte z nizko molekulsko maso se odvzame iz cirkulacije zaradi njihove terapevtske vrednosti, medtem ko produkti s preveliko molekulsko maso vplivajo na koagulacijo krvi.

Raztopine, ki vsebujejo 6 % dekstrana (Dekstran 70) so viskozne in se koloidno-ozmotsko obnašajo in so zelo podobne tistim v človeški krvni plazmi. Ker se dekstrani ne razgradijo v prisotnosti amilaz v človeškem telesu, je možnost poškodb ledvic manjša kot z ostalimi substituentami plazme.

Dekstrani imajo veliko sposobnost absorpcije, zato se pogosto uporabljajo kot podlaga za kremo ali zdravila, na katera vežejo na primer železo, kar potrebujejo med zdravljenjem anemije pri ljudeh in živalih. Za ta namen se uporablja kompleks pripravljen iz 5 % železa in 20 % dekstrana.

Dekstran z molekulsko maso 40.000 Da (Dekstran 40) je bil tudi uporabljen kot sredstvo proti strjevanju v preventivne namene pri visoko riskantni kirurgiji.

Druga značilnost vodne raztopine dekstrana je sposobnost tvorbe dvofaznega sistema, ki je kombiniran z raztopino polimerov, kot je na primer polietilen glikol. To se lahko uporablja pri čiščenju različnih bioloških makromolekul.

Glavna tehnična uporaba dekstrana je v obliki kemijskega produkta Sephadex. Ta produkt v obliki gela se široko uporablja za separacijo proteinov, plazma proteinov (albumin) krvnih faktorjev in imunoglobulinov. Kasneje je bil razvit tudi Sefadex osnovan na anion in kationski izmenjavi materiala za ionsko izmenjevalno separacijo bioloških makromolekul. To je bilo doseženo z vezavo funkcionalnih skupin z eterskimi povezavami na glukozne ostanke dekstrana.

Še en derivat dekstrana je dekstran sulfat, pridobljen z esterifikacijo nevtralnih polisaharidov z molekulsko maso  $5 \cdot 10^5$  s klorosulfonsko kislino. Produkt je polielektroid z cca. 17 % žvepla (povprečno 2,3 sulfonske skupine na vsakem glukoznem ostanku). Eno od možnosti uporabe dekstran sulfata je kot potencialna substituenta za heparin in antikoagulantno terapijo.

Vsi dekstrani in njihovi derivati so relativno visoko pomembni in zahtevajo natančno izveden postopek pridobivanja.

### 7.3 KSANTAN

Ksantan je svoje mesto dobil predvsem v prehrambeni industriji že leta 1969, ko je bil dovoljen za uporabo v živilski industriji. Razširjen je tudi v CEOR »chemically enhanced oil recovery« industriji - to je pridobivanje olja s kemično obogateno vodo (Holzwarth, 1985 and Cadmus and Slodky, 1985). Tu gre predvsem za to, da ksantan močno poveča viskoznost vode, katero nato uporabljajo za izpodrivanje olja ujetega v podzemeljskih rezervarjih. Tu je ksantan zelo dober v primerjavi s svojimi rivali. V kombinaciji z vodo, raztopina ostane viskozna ne glede na ekstremne pH vrednosti, prisotnost soli v vodi, vročino in mikroorganizme. Zaradi visoke stopnje psevdoplastičnosti je ksantan našel svoje mesto tudi pri vrtnanju v blato na naftnih poljih (Holzwarth, 1985).

### 7.4 PULULAN

Veliko virov je pokazalo na širino področij, kjer bi bil pululan lahko v uporabi, vendar se v praksi ni obnesel najboljše (Le Due, Choplin, Zaic and Luong, 1988). Zato je lahko krivo, da kjer bi pululan lahko prišel v uporabo, bi moral izpodriniti druge polisaharide, ki so sedaj v uporabi. Le-ti so pridelani z relativno dosti nižjimi stroški. Zato so za pululan najbolj odprta področja, kjer še ni drugih rivalskih polisaharidov.

Dva področja sta pritegnila posebno pozornost. V prvem lahko pululan služi kot prepreka pred kisikom, saj kisik zelo težko predira popolnoma linearno molekulo pululana. Drugo področje pa je uporaba pululana kot materiala za stisnjeno modeliranje (izdelke stisnjene v kalup, šablono) predmetov ali v nitke zvit material, ki se ga uporablja kot nadomestilo za petrokemijske derivate (Paul, Morin and Monsan, 1986 and Griffin and Magor, 1986). Pululan v kombinaciji s polietilenom naredi film, ki daje odlično rezistenco na vodo in kisik (Yuen, 1974 and Paul, Morin and Monsan, 1986). Pri kalupiranih objektih, pa daje pululan togost tem telesom, da ohranijo svojo obliko. Pululan ima enako togost in moč kot

njegov konkurent pri modeliranih snoveh - polistiren.

Brez dodatka polietilena je pululan zelo topen v vodi, s katero tvori viskozne raztopine. Te raztopine so stabilne v prisotnosti večine kationov in hkrati ne tvorijo gela. Za pripravo raztopine ne potrebujemo gretja in je celo obstojna več ur na 100 °C ob prisotnosti visoke koncentracije klorovodikove kisline. Tako lahko pululan tvori tudi filme, kateri so vodotopni, vendar rezistentni na olja in kisik.

Pululan se uporablja tudi za določene encimske aktivnosti nekaterih encimov (izoamilaze, pululanaze...). Uporabljajo ga tudi za umeritev HPLC za v vodi topne polimere. Pululan ima potencialno možnost, da bo nekoč v uporabi tudi kot prepreka za maščobe.

## 7.5 CELULOZA

Bakterialna celuloza je tako imenovana celuloza prve oblike. To pomeni, da je ta celuloza čista, brez primesi ostalih komponent kot so lignin in drugih podobnih neceluloznih substanc. Bakterialna celuloza ima več potencialnih namenov uporabe. Uporablja se lahko v farmacevtski industriji kot začasno nadomestilo kože pri opeklinah, pri kroničnih boleznih kože ali pri kakršnikoli izgubi kožnega tkiva. Celuloza, kot kožni nadomestek, ima veliko vodno kapaciteto in je zmožna prepuščati kisik. Na ta način stimulira obnovo kože in hkrati preprečuje njeno infekcijo. Mikrobno celulozo se uporablja tudi kot osnova v zelo občutljivih akustičnih membranah, kjer so glukonske verige paralelno orientirane in tvorijo zelo močno raztegljive opne. Uporablja se tudi kot vezivo za keramične pudre in minerale.

Manj čista celuloza se lahko uporablja kot vezivo in premazi v rudarski industriji, vendar je to relativno drag material v primerjavi z ostalimi polisaharidi, ki se že uporabljajo v rudarstvu.

Celuloza prve oblike, bi se lahko uporabljala kot osnova za druge polisaharide, kjer bi služila kot osnovna veriga, nanjo pa bi se pripenjale stranske verige. Navsezadnje pa bi mikrobna celuloza lahko v veliki meri nadomestila sedanji glavni vir celuloze - gozdove.

## 8. REFERENCE

1. Sutherland, I., W., 1990. *Biotechnology of Microbial Exopolisaccharides*, Cambridge University Press, Cambridge,
2. Clementi F. 1997. Alginate Production by *Azotobacter Vinelandii*. Critical reviews in biotechnology, 17(4):327-361
3. Roller, S., Dea, M., I., C., Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods, Critical reviews in biotechnology, 12(3):261-277
4. Raspor, P., 1996. Biotehnologija, Ljubljana, BIA d.o.o., str.347-633
5. McNeil, B., Harvey, L., M., 1993. Viscous fermentatio products. Critical reviews in Biotechnology, 13(4): 275-304
6. Wernau, W.C., Fermentation methods for the production for polysaccharides, Dev. Ind. Microbiol., 26, 263, 1985.
7. Holzwarth, G., Xanthan and scleroglucan: structure and use in enhanced oil recovery, Dev. Ind. Microbiol., 26, 271, 1985
8. Ramos, S., Garcia-acha, I., A vegetative cycle of pullularia pullulans, Trans. Br. Mycol. Soc., 64, 129, 1975
9. Amemura, A., Hisumatsu, M., Harada, T., 1977. Spontaneous mutation of polysaccharide production in *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, Appl. Env. Microbiol. 34, 617-620
10. Booth, C., 1971. *Methods in Microbiology*, Vol. 4, Accademic Press, New York.
11. Davidson, J., W., 1978. Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture, FEBS Lett. 3, 347-349.
12. Govan, J., R., W., Fyfe, J., Jerman, T., R., 1981. Isolation of alginate producing mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*, J., Gen., Microbiol., 125, 217-220
13. Miller, T., L., Churchill, B., W., 1986. Substrates for large-scale fermentation, in: *Mabual of Industriall Microbiology/Biotechnology*, 122-136, Washington
14. Smith, J., H., Pace, G., 1982. Recovery of microbial polysaccharides, J., Chem., Tech., Biotechnol., 32, 119-129
15. Linton, J. D., Ash, S. G., Huybrechts, L. (1991), Microbial polysaccharides, in: *Biomaterials* (Byrom, D., Ed.), pp. 216-261. London: Macmillan.
16. Baird, J. K., Sandford, P. A., and Cottrell, I. W., Industrial applications of some new microbial polysaccharides, *Biotechnology*, 1, 778, 1983).
17. Morris, V. J., Biotechnically produced carbohydrates with functional properties for use in food systems, *Food Biotechnol.*, 4(1), 45, 1990.
18. Dziezak, J. D., Gellan gum receives FDA approval, *Food Technol.*, November, 88, 1990.

19. Szejtli, J., Cyclodextrin Technology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1988.
20. Anon., Cholesterol removal with CDs, Cyclodextrin News, 5(9), 127, 1991.
21. Dea, I.C.M. and Morrison, A., Chemistry and interactions of seed galactomannans, Adv. Carb. Chem. Biochem., 31, 241, 1975.
22. Dea, I.C.M., Morris, E. R., Rees, D. A., Welsh, E. J., Barnes, H. A., and Price, J., Association of like and unlike polysaccharides: mechanisms and specificity of galactomannan, interacting bacterial polysaccharides and related systems, Carbohydr. Res., 57, 249, 1977.
23. Yuen, S., Pullulan and its applications, Process Biochem., November, 7, 1974.
24. Pidoux, M., Brillouet, J. M., and Quemener, B., Characterisation of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains, Biotechnol. Letts., 10(6), 415, 1988.
25. Pidoux, M., De Ruiter, G. A., Brooker, B. E., Colquhoun, I. J., and Morris, V. J., Microscopic and chemical studies of a gelling polysaccharide from *Lactobacillus hilgardii*, Carb. Polymers, 13, 351, 1990.
26. Dea, I.C.M., Polysaccharide conformation in solutions and gels, in Food Carbohydrates, Lineback, D. R., and Inglett, G. E., Eds., AVI, Westport, 1982, 420.
27. Moe, S. T., Draget, K. I., Skjak-Braek, G., and Smidsrod, O. 1995. Alginates. In: Food Polysaccharides and Their Applications. pp. 245-286, Stephen, A. M., Ed., Marcel Dekker, New York.
28. Sime, W. J., 1990. Alginates. In: Food Gels, pp. 53-78. Harris, P., Ed., Elsevier.
29. Ahmed, E. M., Cornell, J. A., Tomaszewski, F. B., and Deng, J. C., 1983. Effect of salt, tripolyphosphate and sodium alginate on the texture and flavour of fish patties prepared from minced sheephead. J. Food Sci. 48: 1078-1080.
30. Rockower, R. K., Deng, J.C., Otwell, W. S., and Cornell, J. A. 1983. Effect of soy-flour, soy protein concentrate and sodium alginate on the textural attributes of minced fish patties. J. Food. Sci. 48: 1048-1052.
31. Earle, R. D., 1968. Preserving of Food Products. U. S. Patent 3,395,024; Chem. Abstr. 64: 13296e
32. Earle, R. D., 1970. Removing Algin Food Coating. U. S. Patent 3,493,398; Chem. Abstr. 73: 2844
33. Lapasin, R. and Pricl, S. 1995b. Industrial applications of polysaccharides. In: Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications, pp. 134-161, Blackie Academic & Professional, London.
34. Hagstam, H. 1985. Alginates and heartburn-evaluation of a medicine with a mechanical mode of action. In: Gums and Stabilizers for the Food Industry 3. pp. 363-370. Phillips, G. O., Wedlock, D. j., and Williams, P. A., Eds., Elsevier Applied Science Publishers, London.
35. FDA, Carrageenan, 21 CFR 172.620, 60, 1992.
36. USDA, Policy memo 121: Labeling of low fat ground beef and low fat hamburger containing added ingredients, Food Safety and Inspection Service, Washington, D.C., 1991.
37. Conti, E., Flaibani, A., O'Regan, M., and Sutherland, I., W., 1994. Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: Production and properties. Microbiology 140: 1125-1132

38. Costerton, W. J., Cheng, K. J., Gessy, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., and Marrie, T. J. 1978. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 435-436
39. Ertesvag, H., Doseth, B., Larsen, B., Skjak-Braek, G., and Valla, S. 1994. Cloning and expression of an *Azotobacter* mannuronan C-5 epimerase gene. *J. Bacteriol.* 176 (10): 2846-2853
40. Espevik, T., Otterlei, M., Skjak-Braek, G., Ryan, L., Wright, S. D., and Sundan, A. 1993. The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers *Eur. J. Immunol.* 23: 255-261
41. Fyfe, J. A. And Govan: J. R. W. 1993. Synthesis, regulation and biological function of bacterial alginate. In: *progress in Industrial Microbiol.* Vol. 18, pp. 45-83, Bushell, M. E., Ed., Elsevier Amsterdam
42. Haraguchi, K. And Kodama, T. 1996. Purification and properties of poly ( $\beta$ -D-mannuronate) lyase from *Azotobacter chroococcum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 576-581
43. Kennedy, L., McDowell, K., and Sutherland, I. W. 1992. Alginases from *Azotobacter* species. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2465-2471
44. Lapasin, R. And Pricl, S. 1995. Industrial applications of polysaccharides. In: *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*, pp. 134-161, Blackie Academic & Profesional, London
45. Linker, A. And Jones, R. S. 1964. A polysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas* microorganism. *Nature* 204: 187-188
46. Linker, A. And Jones, R. S. 1966. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from a *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* 241: 3845-3851
47. Lynn, T. Y. And Hassid, W. Z. 1966. Isolation of guanosine diphosphate uronic acids from a marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva. *Je. Biol. Chem.* 241: 3282-3293
48. Nakada, H., and Sweeny, P. C. 1967. Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreases. *J. Biol. Chem.* 242: 845-851
49. Pickuadio, D., and Nelson, D. B. 1992. Alginates. A new dressing alternative. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 18: 992-998
50. Sutherland, I. W. 1995. Polysaccharides lyases. *FEMS Microbiol. Rew.* 16: 323-347
51. Ajayi, O. O., Investigation of Rheological Properties and Fermentation Parameters for *Aureobasidium pullulans*, Ph. D. thesis, Strathclyde Univerity, 1987
52. Wernau, W. C., Fermentation methods for the production of polysaccharides, *Dev. Ind. Microbiol.*, 26, 263, 1985.
53. McNeil, B. And Kristiansen, B., Fermentation studies using a novel loop reactor, in *Proc. 2<sup>nd</sup> Bioreactor Research Symposium*, National Engineering Laboratory, East Kilbride, 1986, 1.
54. Sutherland, I. W., Microbial polysaccharides, in *Proc. 5<sup>th</sup> Eur. Congr. Biotechnol.*, Christiansen, C., Munch, L., Villadsen, J., Eds., Munksgaard Lit., Copenhagen, 1990, 1040.
55. Holzwarth, G., Xanthan and Scleroglucan: structure and use in enhanced oil recovery, *Dev. Ind. Microbiol.*, 26, 271, 1985.
56. Hassler, R. A. and Doherty, D. H., Genetic engineering of polysaccharide structure: production variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*, *Biotechnol. Prog.*, 6, 182, 1990.
57. McNeil, B. and Kristiansen, B., The effect of impeller speed on the pullulan fermentation, *Biotechnol. Letts.*, 9, 101, 1987.

58. Yuen, S., Pullulan and its new applications, Hayashibara Biochem. Labs. Inc., Okayama, Japan, 1974.
59. Cadmus, M. C. and Slodki, M. E., Enzymic breakage of xanthan gum solution viscosity in the presence of salts, Dev. Ind. Microbiol., 26, 287, 1985.
60. Sinskey, A., James, S., Eason, D., and Rha, C., Biopolymers and modified polysaccharides in Biotechnology in Food Processing, Harlander, S. K. and Labuza, R. P., Eds., Noyes publishing Co., New Jersey, 1986, 1973.
61. Paul, F., Morin, A., and Monsan, P., Microbial polysaccharides with actual potential for industrial applications, Biotechnol. Adv., 4, 245, 1986.
62. Wernau, W. C., Process for Producing *Xanthomonas* Hydrophilic Colloid, U.S. Pat. 4, 119, 546, 1978.
63. Ielpi, L., Couso, R., and Dankert, M., Lipid linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum, FEBS Letts., 130, 253, 1981.
64. Ielpi, L., Xanthan gum biosynthesis: pyruvic and acetal residues, Biochem. Biophys. Res. Commun., 102, 1400, 1981.
65. Le Duy, A., Choplin, L., Zaic, J. E., and Luong, J. H. T., Pullulan, in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2<sup>nd</sup> ed., Mark, H. F. and Bikales, N. M., Eds., John, Wiley & Sons, New York, 1988, 650.
66. Seviour, R. J., Kristiansen, B., and Harvey, L. M., A note on the morphology of *Aureobasidium pullulans*, Trans. Br. Mycol. Soc., 82, 26, 1983.
67. Heald, P. J. and Kristiansen, B., Synthesis of polysaccharide by yeast-like forms of *Aureobasidium pullulans*, Biotechnol. Bioeng., 27, 1516, 1985.
68. Lacroix, C., Le Duy, A., Noel, G., and Choplin, L., Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium, Biotechnol., Bioeng., 27, 202, 1985.
69. Bulmer, M. A., Catley, B. J., and Kelly, P. J., The effect of ammonium ions and pH on the elaboration of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan by *Aureobasidium pullulans*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 363, 1978.
70. Reeslev, M., Nielsen, J. C., and Jorgensen, B. B., Nutritional dependent dimorphism in the exopolysaccharide producing deuteromycete *Aurebasidium pullulans*, in Proc. 5<sup>th</sup> Eur. Congr. Biotechnol., Christiansen, C. et al., Eds., Munksgaard Int., Copenhagen, 1990, 1053.
71. Kristiansen, B., Charley, R. C., Seviour, B., Harvey, L., Habeeb, S., and Smith, J. E., Overproduction of metabolites by filamentous fungi, in Production of Microbial Products, Krumphantza, V., Sikyta, B., and Vanek, Z., Eds., Academic Press, New York, 1982.
72. Griffin, M. and Magor, A. M., Possible use of microorganisms in the manufacture of plastic and sintetic fibres, in Biotechnology and Genetic Engineering Rewievs, Vol. 4, Rusell, G., Ed., Intercept, U.K., 1986, 263.