Tejsavbaktériumok által termelt poliszacharidok bioszintézise, felhasználási lehetőségei

Tárgyszavak: exopoliszacharid; tejsavbaktérium; élelmiszer-adalék; bioszintézis.

A tejsavbaktériumok által sejten kívül, extracellulárisan termelt exopoliszacharidokról (EPS) izolálásuk után hamarosan kiderült, hogy javítják az erjesztett tejtermékek, így a joghurt állagát, sima, lágy, krémszerű jellegét, azaz mindazon tulajdonságait, amelyeket hozzáadott zsírral, fehérjével vagy stabilizálóként pektinnel, keményítővel, zselatinnal valósítanak meg. E nem kívánt kalória- és költségnövelő adalékokat tehát előnyösen helyettesíthetik a tejsavbaktériumok termelte EPS-ek. A vegyületcsoportról, amely kb. egy évtizede intenzív kutatások tárgyát képezi, kimutatták, hogy az emésztőrendszerben hosszan tartózkodva, elősegíti probiotikus baktériumok megtelepedését, továbbá valószínűsítették az immunrendszert stimuláló, koleszterinszint-csökkentő, rákkeltő hatását.

Az EPS-ek felépítése

Az EPS-ek cukrokból – glükóz, galaktóz és ramnóz – és származékaikból álló, hosszú, elágazó láncú poliszacharidok, amelyek a hozzájuk hasonló szerkezetű, ún. kapszuláris poliszaccharidokkal ellentétben, nem tapadnak állandóan a baktériumsejt felszínéhez. A $4 \cdot 10^4$–$6 \cdot 10^6$ molekulatömegű tejsav-EPS-ek két szerkezeti csoportja közül

– a homopoliszacharidokat egyetlen monoszacharid, D-glükóz vagy D-fruktóz alkotja,
– a heteropoliszacharidok ismétlődő, három-nyolc tagú oligoszacharid-egységei kevéssé hasonlítanak egymáshoz.

Koncentráció és viszkozitás

Ezideig nem sikerült összefüggést definiálni az EPS-koncentráció és a viszkozitás között, pedig ennek nagy stratégiai jelentősége volna a funkcionálisan legkedvezőbb és az élelmiszerhez keverve előre jelezhető viselkedés

szempontjából. Néhány alapvető kapcsolat azonban igazolható: az oldat (keverék) akkor viszkózus, ha nagy az EPS-koncentráció és a fajlagos térfogat, ehhez pedig alegységek hosszú láncára (nagy molekulatömegre) és merev láncra van szükség. Kimutatták, hogy pl. a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*ban található, $\beta(1\rightarrow4)$ típusú, ún. gerinckötés merevebb láncokat eredményez, mint a $\beta(1\rightarrow3)$ vagy az $\alpha(1\rightarrow4)$ kapcsolódás.

EPS-bioszintézis tejsavbaktériumokban

Az EPS-termelődés anabolikus és a cukorlebontás katabolikus vonalát összekötő fő közbenső termék a glükóz-6-foszfát, amelyben az anyagcsere C-fluxusa kettéválik, egyfelől a glükolízistermékek, biomassza- és ATP-képződés, másfelől cukor-nukleotidok és az EPS-prekurzorok szintézise irányában. A cukoranyagcsere e két útvonalának szétválásában fontos szerepe van a foszfogluteomutáznak, a glükóz-6-foszfát glükóz-1-foszfáttá való átalakulását katalizáló enzimnek. A glükóz-6-foszfát a cukor-nukleotidok képződésének elágazási pontja, a cukor-nukleotidokból pedig a sejtben a poliszacharidok hosszú sorának szintézise indul ki A szintézis befejező részében, az ismétlődő monoszacharid-egységek „összegyűjtésében” speciális enzimek vesznek részt.

Az EPS-szintézist kódoló gének a plazmidban (pl. a *Lactobacillus casei* esetében) vagy kromoszómában találhatók, mint valamennyi termofil tejsavbaktériumnál. *Streptomyces thermophilus*ban genetikai központként kimutattak egy 15,25 kb-os régiót, amely 13, az EPS-szintézist kódoló gént irányít, *Lactobacillus delbruckii* ssp. *bulgaricusban* pedig egy 14 génből álló, 18 kb-os DNS-régiót. A tömörülés génjei egyfelé irányulnak és egyetlen mRNS-sé íródnak át. Funkcionális szekvenciáik a sejtfelszínen poliszacharidokat szintetizáló Gram-pozitív baktériumokban ugyancsak lánchosszúság-meghatározó rendezőelvet, az ismétlődő egységek ugyanolyan bioszintézisét és polimerizálódását követik.

A tejsavbaktériumok EPS-termelésének fokozása

Az élelmiszer-adalékolás céljára történő fermentálásos EPS-termelés gazdaságos mértéke 10–15 g/l, a szakirodalom alapján eddig elért legnagyobb koncentráció 2,767 g/l (*Lactobacillus rhamnosus* egy törzsében), és ez kb. az a maximum, amit a tejsavbaktériumok celluláris energiája lehetővé tesz. Az EPS-túltermeléshez értékesíteni kell az ezen organizmusok különféle vegyületek (nem poliszacharidok) termelésére való genetikai és metabolikus képességeinek felhasználásával szerzett tapasztalatokat. A karbonfluxus útvonalának speciális termékek előállítását célzó megváltoztatására kidolgoztak

- egyszeri vagy
- többszörös beavatkozásokat, valamint
- az egész metabolikus pályát átalakító stratégiákat.

A tejsavbaktériumok anyagcseréjének alapvető jellemzője a karbon-fluxusból a laktáttá alakuló fő ág. Ezért feltételezték, hogy amennyiben az EPS-termelést kapcsolni lehet a sejtszaporodáshoz, akkor a növekedést közismerten gátló laktát képződésének csökkentése által fokozódna az EPS-szintézis. Ezt a stratégiát már 1999-ben sikerrel alkalmazták holland kutatók anyagcsere-végtermékek, köztük alanin túltermelésére a *Bacillus sphaericus* alanindehidrogenázt kódoló génjének túlexpressziójával *Lactobacillus lactis* LDH-hiányos törzsében.

Hasonlóan eredményes volt a módszer etanol, acetoin, mannitol, 2,3-bután-diol, szukcinát és piruvát előállítására, olykor *Lactobacillus plantarum* törzs segítségével, amelyben mind a D-LDH, mind az L-LDH expresszióját legyengítették. Amennyiben ezt a stratégiát kívánják felhasználni nagyobb EPS-hozamok elérésére, további szabályozó mechanizmussal meg kell akadályozni, hogy túl sok szénből keletkezzenek nem kívánt metabolitok piruváton keresztül.

Az LDH-hiányos mutánsokon alapuló megközelítés esetében mérlegelni kell a sejt redoxi egyensúlyára gyakorolt hatást. Ezen kívül a laktáttermelés jelentős csökkentése visszaszorítja a glükolízist és az ATP-képződést. Az energiaátvivő ATP-re pedig egyaránt szükség van a cukornukleotidok bioszintéziséhez, polimerizációhoz, és az EPS-ek sejten kívüli „exportjához” kevesebb energia áll rendelkezésre.

Az EPS-termelés a polimer bioszintézisének szintjén elsősorban az ebben szereplő glükoziltranszferáz aktivitásának növelésével is fokozható. Példa erre az a csekély mértékű EPS-többlettermelés, amelyet az említett enzim génjének túlexpressziójával értek el *L. lactis*ban, *L. delbrueckii*ben, *S. thermophilus*ban és *L. helveticus*ban.

Elképzelhető a teljes *eps*-géntömörülés klónozása sok másolattá, de itt kényes kérdés a törzs megőrzendő stabilitása.Ennek alternatívájaként az *eps*-operont tartalmazó plazmidok átvihetők más organizmusokba emelt szintű EPS-termelés céljából. Pl. sikerült megvalósítani az *S. thermophilus* teljes *eps*-géntömörülésének expresszióját *L. lactis*ban.

Az EPS-termeléssel kapcsolatos teljes operonok vagy géntömörülések klónozásának potenciális ipari értékét tükrözi több szabadalom. Ilyen törzsek piaci lehetőségei azonban természetesen az alkalmazás hatósági szabályozásától és a lakossági fogadtatástól függnek.

Az EPS-szerkezetek baktériumokban való módosításának lehetősége

A bakteriális EPS-termelés fokozása mellett a vegyületcsoportnak fel kell mutatnia a kívánt funkcionális hatást, ehhez pedig fel kell deríteni a különféle EPS-struktúrák és a táplálék közötti kölcsönhatásokat molekuláris szinten. Ehhez molekuláris modellek készülnek, amelyeknek végső célja az EPS-

struktúra rendeltetés szerinti megtervezése. Lehetőség van meglevő vagy új glükoziltranszferázok bevitelére tejsavbaktériumokba vagy gének ún. becsúsztatásával glükoziltranszferázzal együtt új kötésfajták kialakítására.

A kívánt szerkezetű EPS létrejöttét a tenyésztési feltételek, így a szénforrás megválasztása is segítheti. A *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fruktóz táptalajon 1:2,4 arányban glükóz- és galaktózegységeket tartalmazó EPS-t szintetizál, fruktóz/glükóz keverékben pedig 1:7:0,8 arányú glükóz/galaktóz/ramnóz összetételű poliszacharidot termel.

A tejsavbaktériumok az aerob szénhidráttermelőkhöz képest gyenge energiahasznosítással végzik a konverziót. A tejsavbaktériumok metabolikusan módosított EPS-szintézisének egyetlen ésszerű alkalmazása a hozam és az egészségmegőrző tulajdonságok tekintetében megjavított szerkezet kombinálásából fakad. A nagyobb méretre való áttéréshez azonban mindenképpen szükség van a hozam javítására, a bakteriális anyagcsere és a molekuláris folyamatok modellezésének, valamint a kombinatorikai technikának az együttes alkalmazásával.

Minthogy azonban a tejsavbaktériumok energetikai viszonyai semmiképpen sem engedik meg a bőséges EPS-termelést, e vegyületcsoport hasznosítása csak kialakított speciális funkciós hatásokon nyugodhat. Először ezeket kell tehát pontosan meghatározni, majd ezeknek megfelelően átalakítani vagy szelektálni a kívánt polimereket termelő törzseket. Ezen a vonalon egy másik megoldás lehet az igény szerint megtervezett polimer ismétlődő összegyűjtése sejteken kívül termelési szakaszokból, ugyancsak a művelethez szabott enzimek felhasználásával.

(Dr. Boros Tiborné)

Welman, A. D.; Maddox, I. S.: Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perpectives and challenges. = Trends in Biotechnology, 21. k. 6. sz. 2003. p. 269–274.

Laws, A.: Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. = Biotechnology Advances, 19. k. 7. sz. 2001. p. 597–625.

Faber, E. J.: Modelling in aqueous solution of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* 766. = Biopolymers, 63. k. 1. sz. 2002. p. 66–76.

Kleerebezem, M.: Metabolic engineering of *Lactococcus lactis:* the impact of genomics and metabolic modelling. = Journal of Biotechnology, 98. k. 2. sz. 2002. p. 199–213.

Röviden…

Halálos kórokozó ellen védő élelmiszer-csomagolás

Egy új élelmiszer-csomagoló műanyag, amelyből lassan diffundálnak ki antimikrobiális növényi hatóanyagok, megvédi a sajtokat, húsokat olyan veszélyes ételmérgezést okozó baktériumoktól, mint az *E. coli* és a *Listeria*, miközben nem változtatják meg az áru ízét.

Az előzetes tesztelés alapján az új burkolat hosszabb ideig fejti ki védőhatását és őrzi meg pl. a Cheddar sajt eredeti minőségét, mint a használatos csomagolások. A termék a haifai (Izrael) Technion Institute of Technology és a melbourne-i (Ausztrália) Victoria University közös fejlesztése.

A műanyagot a bazsalikomból kivont két vegyi anyaggal, a metil-chavikol nevű éterrel és linalool alkohollal keverik, amelyek a baktériumok nyolc típusával szemben hatékonyak, mindkettő a bakteriális sejtfal elroncsolása útján.

Polimerbe illékony vegyületek beépítése – márpedig a kórokozó elpusztításához a hatóanyagnak párolognia kell! – azért problematikus, mert ehhez nem nélkülözhető a mátrix melegítése, ami viszont veszteséggel jár. Az új fejlesztés egyik értéke éppen a műanyag burkolás olyan összetétele különböző polimerekből, amely megfelel az ellentmondó követelményeknek, lényegében olyan módon, hogy a hatóanyagok csak a csomagolás belseje felé diffundálnak, kijutásukat megakadályozza a kombináció egyik erre alkalmas rétege.

A bazsalikom hatóanyagainak természetes eredete ma pozitív marketingtényező, bár a gyártó szerint, kipróbálás alapján, antimikrobiális hatásuk nem éri el a fenti alkalmazásban szintén használható egyes szintetikumokét.

(New Scientist, 178. k. 2399. sz. 2003. jún. 14. p. 26.)