

## Bakteriální heteropolysacharid sukcinoglykan AR6

RNDr. EVA ŠÍMOVÁ, Ing. VÁCLAV KLEKNER, CSc., RNDr. JAN ŘÍČICA, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

**Klíčová slova:** *Agrobacterium radiobacter*, heteropolysacharid sukcinoglykan, kyselá hydrolýza, základní stavební jednotka, viskozita, tepelná stabilita

Extracelulární polysacharidy byly objeveny a studovány u řady bakterií. Tyto polymery prokazují výhodné fyzikálně chemické vlastnosti, které lze využít v různých odvětvích průmyslu. Především polysacharidy produkované *Xanthomonas campestris* našly již široké uplatnění [1].

V posledních letech je studium bakteriálních polysacharidů stále intenzivnější. Z hlediska průmyslového využití jsou u polysacharidů sledovány specifické vlastnosti, jak jsou uvedeny v tab. 1.

Tabulka 1. Přehled bakteriálních heteropolysacharidů

Název	Obchodní název produkční bakterie	Předpokládané využití
xantan	Keltrol <i>Xanthomonas campestris</i> Kelzan Rhodigel 123	stabilizace suspenzí trvanlivost olejů vazba vody zvyšování viskozity
erwina	Zanflo 10 <i>Erwinia tahitica</i>	stabilizace barev zvyšování viskozity
algináty	— <i>Pseudomonas aeruginosa</i> — <i>Azotobacter vinelandii</i>	želírování tvorba filmu stabilizace emulzí
sukcinoglykan	— <i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i> — <i>Agrobacterium radiobacter</i>	stabilizace disperzí zvyšování viskozity zahušťovadlo
B-1973	— <i>Arthrobacter viscosus</i>	zvyšování viskozity tvorba filmu
PS-7	— <i>Beijerinckia indica</i> ( <i>Azotobacter indicum</i> )	úprava koloidních roztoků vytváření gelů

Pracovali jsme s kmenem *Agrobacterium radiobacter* CCM 2704, který byl izolován v našem ústavu pod č. B6 a který produkuje extracelulární polymer rozpustný ve vodě. *A. radiobacter* kultivován na minerální půdě S [2], syntetizuje polysacharid z různých uhlíkatých zdrojů např. ze sacharosu, laktosu, glukosu, galaktosu, fruktosu, arabinosu, glycerolu a ethanolu [3, 4]. Výtěžek polysacharidu závisí na řadě faktorů ovlivňujících kultivační podmínky.

Metody pro izolaci extracelulárních polysacharidů jsou voleny podle charakteru produkční bakterie, typu polysacharidů a požadovaného stupně čistoty. Extracelulární polysacharidy mohou být separovány od buněk odstředěním nebo filtrací. Mají-li být tyto způsoby efektivní, vyžadují kulturu nízké viskozity.

Při izolaci extracelulárního polysacharidu AR6 jsme submerzní kulturu před odstředěním (15 min, 7 000 g) ředili vodou na potřebnou viskozitu. Polymer jsme vysráželi ze supernatantu 96 % ethanolu (1:2). Sraženinu jsme rozpustili ve vodě a dialyzovali proti vodě 48 h. Makromolekuly polymeru z dialyzační trubice jsme lyofilizovali. Získaný preparát má bílou barvu a obsahuje 2–5 % bílkovin.

Konformační a specifické vlastnosti polysacharidů jsou podmíněny strukturálními rysy makromolekuly. Základem pro budování stereochemické představy makromolekuly je primární struktura polymeru. První strukturální informace se obvykle získávají kyselou hydrolýzou polymeru a následným stanovením vzniklých produktů.

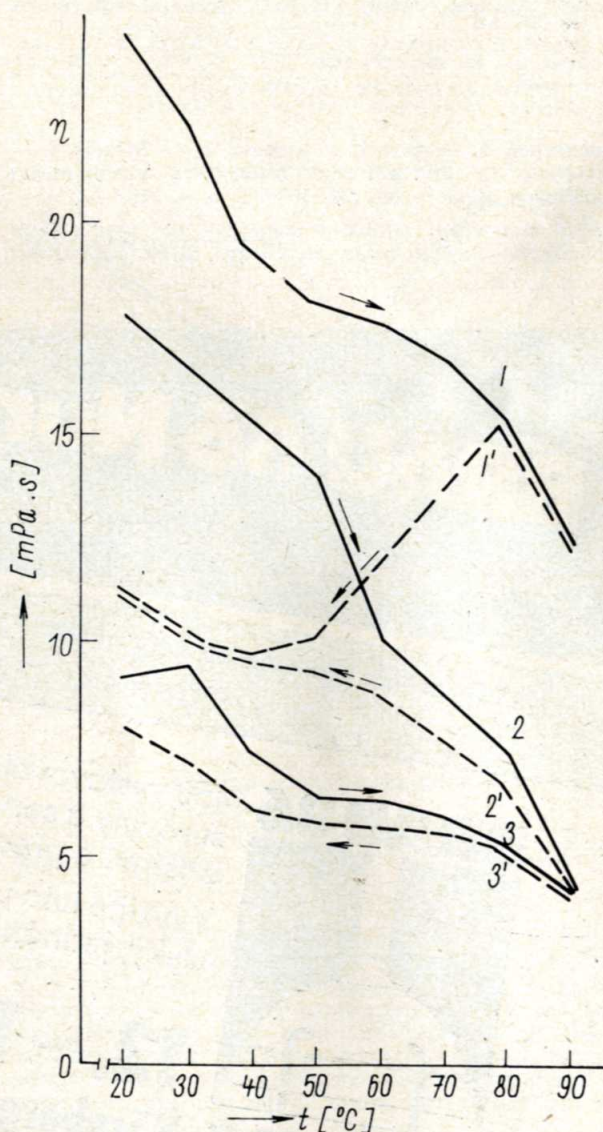
Polysacharid AR6 jsme hydrolyzovali 2M  $\text{CF}_3\text{COOH}$ . V průběhu hydrolyzačního stupně jsme zjistili, že polymer je zhydrolyzován v prostředí bez  $\text{O}_2$ , při 100 °C za 2 h. Produkty hydrolýzy jsme stanovili plynovou chromatografií [5] a kolorimetrickými metodami [6, 7].

Podle výsledků uvedených v tabulce 2 lze říci, že polysacharid AR6 je sukcinoglykan. Obvykle váže 10–15 % vody.

Podle literárních údajů byla struktura sukcinoglykanu studována enzymovou hydrolýzou a metylační ana-

Tabulka 2. Produkty hydrolýzy polysacharidu AR6 2M  $\text{CF}_3\text{COOH}$

AR6 polysacharid	D-glukosa	D-galaktosa	Kyselina jantarová	Kyselina pyrohroznová	Součet
1	0,620	0,098	0,110	0,080	0,908



Obr. 1. Vliv teploty na viskozitu extracelulárních polysacharidů

Stabilita preparátů při zahřívání — reverzibilita — — —  
1 — xantánový preparát Keltrol, 2 — sukcinoglykan AR6, 3 — xantánový preparát NDR



lýzou [8]. Základní kostra sukcinoglykanu je složena z lineárně se opakujících oktasacharidových jednotek, s molárním zastoupením: D-glukosa: D-galaktosa: kyseliny jantarové: kyseliny pyrohroznové v poměru 7:1:1:1. Cukerné složky jsou vzájemně propojeny  $\beta$ -(1,3), (1,4) a (1,6) glykosidickými vazbami. Kyselina pyrohroznová je připojena ketálovou vazbou a kyselina jantarová esterovou vazbou.

Jak je uvedeno v tabulce 1, je u extracelulárních polysacharidů ceněna vlastnost tvořit viskózní roztoky. Sledovali jsme vliv teploty na viskozitu sukcinoglykanu AR6 a schopnost reverzibility při zpětném ochlazení. Tyto vlastnosti jsme porovnávali s obchodními vzorky polysacharidů typu xantanu, vyráběnými v USA pod názvem Keltrol a v NDR.

Viskozitu jsme měřili u 0,5 % roztoků extracelulárních polysacharidů při střižní rychlosti  $1312 \text{ s}^{-1}$  na rotačním viskozimetru Rheotest II (výrobce NDR). Teplotní stabilitu pokusných vzorků jsme sledovali při změně teplot v rozpětí 20–90 °C. Jak je patrné z obr. 1, má sukcinoglykan AR6 při 20 °C daleko větší viskozitu než preparát z NDR, avšak nižší než Keltrol. Viskozita xantanolových polysacharidů měla největší pokles při teplotě 30–40 °C, což se vysvětluje změnou struktury řetězce xantanu, kdy se uspořádaná struktura bortí v poměrně flexibilní řetězec [9]. U sukcinoglykanu AR6 nastává změna mezi 50–60 °C. Porovnáme-li schopnost reverzibility tohoto preparátu s Keltrolem, má sukcinoglykan AR6 po ochlazení na 20 °C téměř o dvacet procent vyšší schopnost reverze.

Na základě získaných výsledků lze říci, že sukcinoglykan AR6 patří mezi vysokoviskózní polysacharidy. Jeho předností je jen částečná deformace molekuly zahřátím na 80 °C a dobrá reverzibilní schopnost po ochlazení. Tyto jeho vlastnosti dávají předpoklad pro využití v průmyslu.

Z ekonomického hlediska je získávání bakteriálních extracelulárních polysacharidů sice náročnější a dražší než izolace z rostlin, avšak předností je zaručená stálost kvality neovlivněná přírodními podmínkami jako u rostlinných polymerů. Využitím levných substrátů k fermentaci se výhodnost produkce bakteriálních polysacharidů ještě zvýrazní.

Lektoroval Ing. Jiří Uher, CSc.

## Literatura

- [1] SŁODKI, M. E., CADMUS, M. C.: „Advances in Applied Microbiology“, Vol. 23, ed. by D. Perlman, Academic Press, New York, P. 21, 1978.
- [2] AMEMURA, A., HARADA, T.: J. Ferment. Technol. **49**, 559–566, 1971.
- [3] ŠIMOVA, E., ŘÍČICA, J., PEČENÝ, J., PANOŠ, J.: 14. výroční kongres Čsl. spol. Mikrobiol. při ČSAV, 17.–18. října 1978,

Folia Microbiol. Vol. 26, 1981, Abstracts of Communications str. 36.

- [4] KLEKNER, V., ŠIMOVA, E., ŘÍČICA, J., PANOŠ, J.: Folia Microbiol. **29**, 138–147, 1984.
- [5] MORRISON, W. R., SMITH, L. M.: Lip. Res. **5**, 600–608, 1964.
- [6] KESTON, A. S.: Abstracts of papers, 129 the Meeting, A.C.S. p. 31 C, 1958.
- [7] KOEPSALL, H. J., SHARPE, E. S.: Arch. Bioch. Biophys. **38**, 443, 1952.
- [8] HISAMATSU, M., ABE, J., AMEMURA, A., HARADA, T.: Agric. Biol. Chem. **44**, 461–462, 1980.
- [9] MORISS, F. R., REES, D. A., YOUNG, C., WALKINSHAW, M. D., DARKE, A.: J. Mol. Biol. **110**, 1–16, 1977.

**Šimová, E. - Klekner, V. - Řičica, J.: Bakteriální heteropolysacharid sukcinoglykan AR6.** Kvas. prům. **32**, 1986, č. 9, s. 218–219.

*Agrobacterium radiobacter CCM 2704* produkuje extracelulární polysacharid sukcinoglykan AR6, který ve své molekule obsahuje D-glukosu, D-galaktosu, kyselinu jantarovou a pyrohroznovou. Viskozita jeho vodných roztoků je vysoká a v závislosti na teplotě poměrně stabilní.

**Шимова Е., Клекнер В., Ржица Я.: Бактериальный гетерополисахарид сукциногликан АР 6.** Квас. прум. **32**, 1986, № 9, стр. 218–219.

*Agrobacterium radiobacter CCM 2704* производит внеклеточный полисахарид сукциногликан АР 6, который в своей молекуле содержит D-глюкозу, D-галактозу, янтарную и пировиноградную кислоты. Вязкость его водных растворов высока и в зависимости от температуры относительно стабильна.

**Šimová, E., Klekner, V., Řičica, J.: Bacterial Heteropolysaccharide Succinoglycane AR 6.** Kvas. prům. **32**, 1986, No. 9, pp. 218–219.

*Agrobacterium radiobacter CCM 2704* produces extracellular polysaccharide succinoglycane AR 6, which in its molecule contains D-glucose, D-galactose, succinic and pyruvic acids. Viscosity of its aqueous solutions is high and in dependence on temperature relatively stable.

**Šimová, E. — Klekner, V. — Řičica, J.: Bakterielles Heteropolysaccharid Sukzinoglykan AR 6.** Kvas. prům. **32**, 1986, Nr. 9, S. 218–219.

*Agrobacterium radiobacter CCM 2704* produziert das extrazelluläre Polysaccharid Sukzinoglykan AR 6, das in seiner Moleküle D-Glukose, D-Galaktose, Bernsteinsäure und Brenztraubensäure enthält. Die Viskosität seiner Wasserlösungen ist hoch und in der Abhängigkeit von der Temperatur verhältnismässig stabil.