

Kurdlan — struktura, właściwości, wykorzystanie

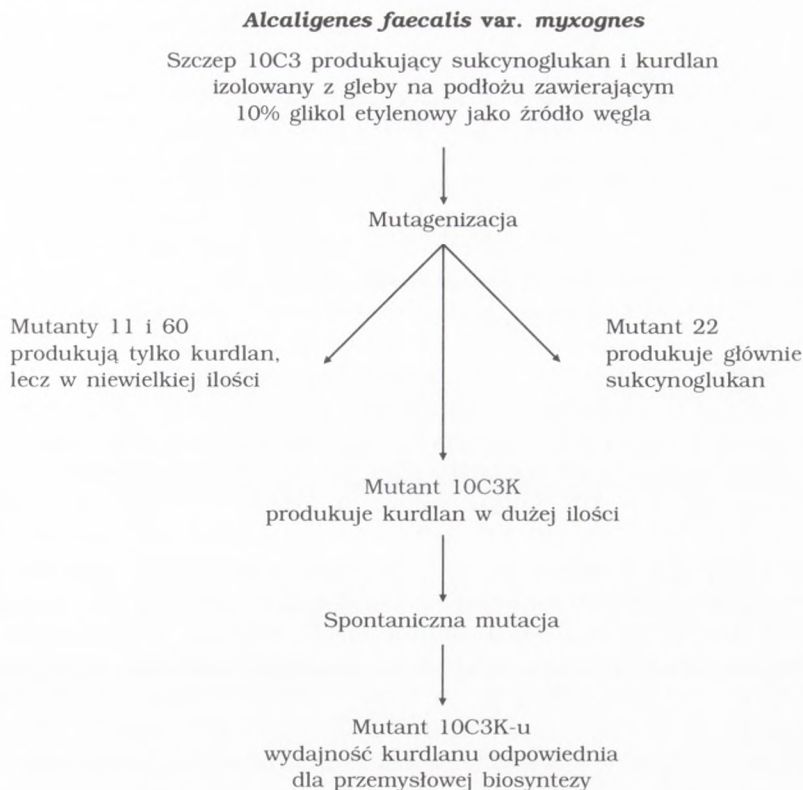
Marianna Turkiewicz
Wojciech Czub
Instytut Biochemii Technicznej
Politechnika Łódzka
Łódź

1. Wstęp

Kurdlan jest nazwą nadaną przez Haradę i wsp. (1) klasie zewnątrzkomórkowych mikrobiologicznych polimerów o charakterze glukanów, w których kolejne reszty D-glukopiranozy połączone są wiązaniami β -(1 \rightarrow 3)-O-glikozydowymi. Unikatową cechą kurdlanu jest zdolność tworzenia żeli przez wodne zawiesiny polisacharydu pod wpływem podwyższonej temperatury, które przy dalszym podgrzaniu nie przechodzą w stan ciekły, tj. nie topią się (2,3). Prekursorem w badaniach nad budową i właściwościami kurdlanu był wspomniany już Tokuya Harada z Uniwersytetu w Osace. W połowie 1981 r. na rynku pojawiły się pierwsze handlowe preparaty tego polisacharydu z planowanym ich wykorzystaniem jako dodatków w produktach spożywczych.

2. Biosynteza kurdlanu

Oryginalny szczep bakteryjny wytwarzający kurdlan został wyizolowany przez Haradę i wsp. (4-7) podczas skryningu bakterii glebowych degradujących różne frakcje substancji ropopochodnych. Bakterie te, zdolne do wzrostu w podłożu zawierającym 10% glikol etylenowy w charakterze źródła węgla, sklasyfikowano jako *Alcaligenes faecalis* var. *Myxogenes*. W toku wstępnych badań okazało się, że wyizolowany przez Haradę i wsp. szczep produkował dwa typy polisacharydów: nierozpuszczalny w wodzie, obojętny homoglukan, nazwany kurdlanem i rozpuszczalny w wodzie kwaśny heteroglukan, zawierający w swym składzie około 10% kwasu sukcynewego, nazwany sukcynerglukanem (4,6). Obydwa polimery można rozróżnić na podstawie zdolności tworzenia kompleksów z rozpuszczalnym w wodzie niebieskim barwnikiem — błękitem anilinowym (*aniline blue*); tylko kurdlan tworzy



Rys. 1 Doskonalenie szczepu *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3 na drodze mutagenizacji (schemat) (11).

z tym związkami stabilne, barwne kompleksy (8). Natężenie zabarwienia takich kompleksów zależy od stężenia polimeru i jego stopnia polimeryzacji (DP). Adsorbując błękitu anilinowego przez kurdlan wykorzystano jako prostą metodę do selekcji drobnoustrojów produkujących ten polisacharyd.

Szczep *Alcaligenes faecalis* 10C3, wyizolowany z gleby przez Haradę i wsp. (4-7) został ulepszony na drodze kilkustopniowej mutagenizacji (rys. 1), dzięki której uzyskano mutant nie wytwarzający sukcyngluklanu, natomiast syntetyzujący kurdlan z wydajnością odpowiednią dla produkcji w skali przemysłowej.

Obecnie wiadomo, że kurdlan syntetyzują nie tylko szczepy *Alcaligenes faecalis*. Taką zdolnością odznaczają się też niektóre bakterie rodzaju *Agrobacterium*.

Metaboliczne szlaki biosyntezy kurdlanu nie są całkowicie poznane, choć przyjmuje się, że podobnie jak w przypadku biosyntezy celulozy przez *Acetobacter xylinum*, główną drogą wytwarzania kurdlanu przez *Alcaligenes fae-*

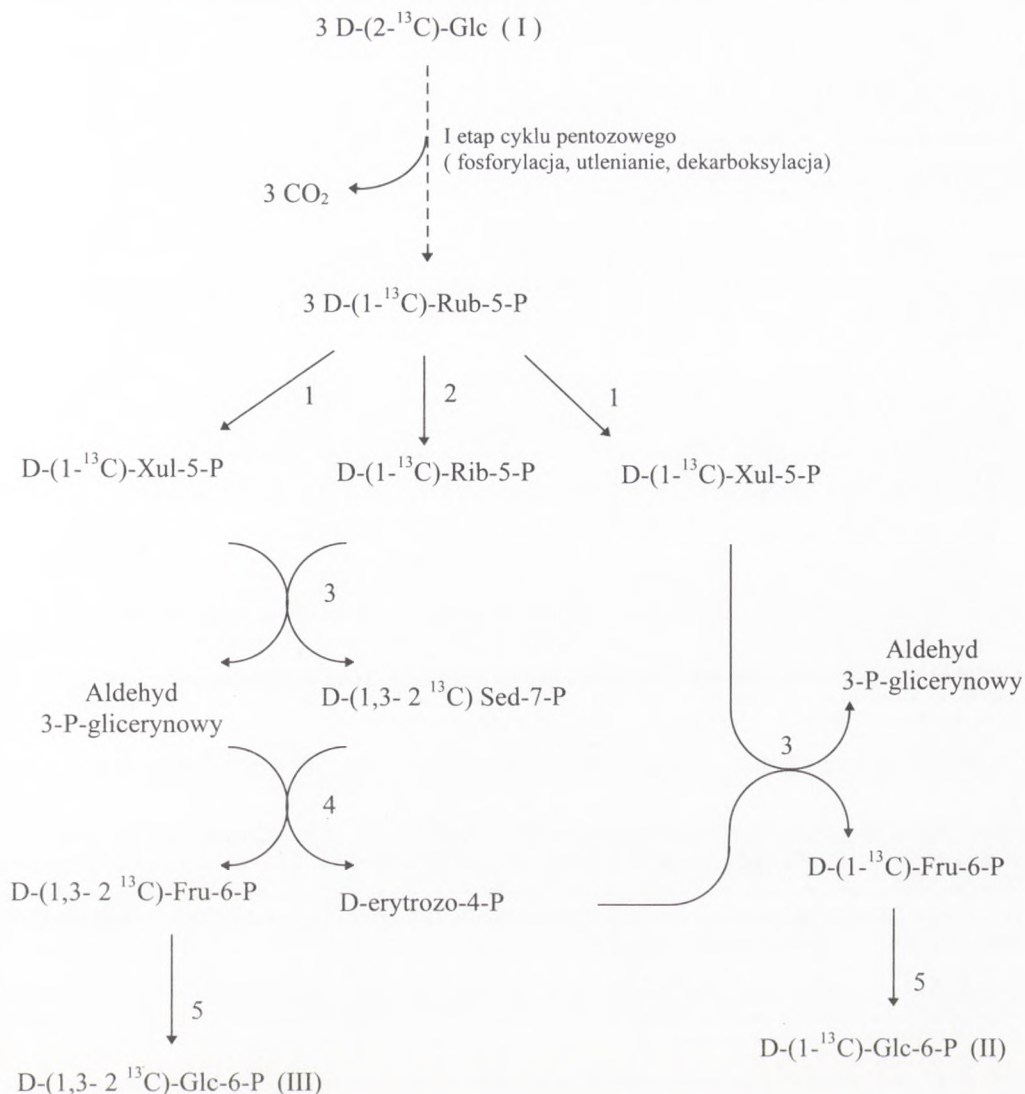
calis i *Agrobacterium* jest bezpośrednia synteza polisacharydu z glukozy, pochodzącej z podłoża hodowlanego, *via* UDPG (9). Potwierdzają to wyniki spektroskopowych badań kurdlanu (^{13}C NMR), syntetyzowanego przez *Alcaligenes faecalis* i *Agrobacterium* w podłożach z D-glukozą znakowaną ^{13}C w różnych pozycjach (C-1, C-6 lub C-2), które wykazały, że reszty glukozy w polisacharydzie są każdorazowo znakowane głównie w tej pozycji, co wyjściowy monosacharyd (odpowiednio w 93, 89 i 67%). Pozostała część znakowanego węgla Kai i wsp. (9) znajdowali w innych pozycjach reszt glukozy kurdlanu aniżeli w wyjściowych substratach, tj.:

- w C-3 (5%) dla kurdlanu syntetyzowanego z D-(1- ^{13}C) Glc;
- w C-1 (8%) przy syntezie polisacharydu na D-(6- ^{13}C) Glc;
- w C-1 (21%) i C-3 (12%), gdy źródłem węgla była D-(2- ^{13}C) Glc.

Na podstawie tych obserwacji zasugerowano możliwość biosyntezy kurdlanu nie tylko z bezpośrednio pobranej z podłoża glukozy, lecz także z glukozy resyntetyzowanej z intermediatów glikolizy, cyklu pentozowego i szlaku Entnera-Doudoroffa. Autorzy badań wskazują, że jest możliwe przesunięcie ^{13}C z pozycji 1 do 3 w fosfodihydroksyacetonie, chociaż nie opisano dotąd enzymu katalizującego tę rearanżację. Odwrotne przesunięcie miałoby towarzyszyć izomeryzacji aldehydu 3-fosfo-D-(3- ^{13}C)-glicerynowego do 1-fosfo-(1- ^{13}C)-dihydroksyacetonu w szlaku Embdena-Meyerhoffa. Przesunięcie znakowanego węgla z pozycji 2 na 1 w resztach glukozy kurdlanu, syntetyzowanego przy wzroście drobnoustrojów na D-(2- ^{13}C)-Glc świadczy o możliwości resyntezy glukozy z fruktozo-6-fosforanu, pochodzącego z reakcji transaldolacji ksylulozo-5-fosforanu z erytrozo-4-fosforanem w cyklu pentozowym, natomiast transaldolacja sedoheptulozo-7-fosforanu z aldehydem 3-fosfoglicerynowym mogłaby tłumaczyć przesunięcie ^{13}C z pozycji 2 w wyjściowej glukozie podłoża w pozycje 1 i 3 reszt glukozy kurdlanu (rys. 2).

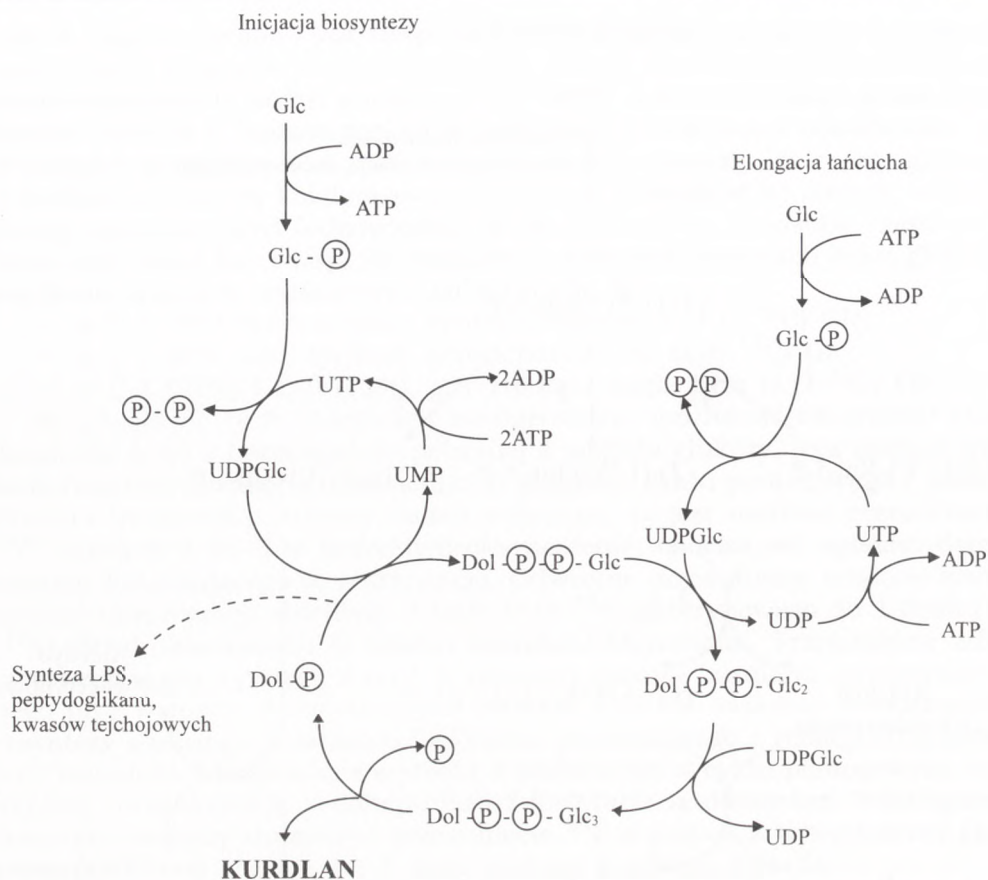
Nie ma wątpliwości, że biosynteza kurdlanu z glukozy resyntetyzowanej w różnych szlakach metabolizmu węglowodanów stanowi zawsze poboczną drogę produkcji tego polisacharydu, jednakże jej ilościowa relacja względem drogi głównej (bezpośrednia synteza kurdlanu z glukozy podłoża) może się zmieniać w zależności od warunków hodowli drobnoustroju. Badania Kai i wsp. (9) wykazały dużą zachowawczość 4, 5 i 6 węgla szkieletu glukozy podczas przemian metabolicznych w szczepach *Agrobacterium*, syntetyzujących kurdlan przy wzroście na tym monosacharydzie, jako źródle węgla.

Przyjmuje się, że w biosyntezie łańcucha glukawanowego kurdlanu istotną rolę odgrywa dolichol, wielonienasycony lipid, będący fosforanowym estrem alkoholu poliizoprenoidowego (10). Podobnie jak w posttranslacyjnych glikozylacjach białek, czy w biosyntezie niektórych składników bakteryjnych ścian komórkowych (kwasy tejchojowe, lipopolisacharydy, peptydoglikan), stanowi on akceptor kolejnych reszt cukrowych, w tym przypadku glukopiranozowych, przenoszonych z UDPG (rys. 3). Zapoczątkowanie biosyntezy kurdlanu wymaga zużycia trzech cząsteczek ATP, natomiast przyłączenie każdej kolejnej reszty glukozy do rosnącego łańcucha jest związane z hydrolizą 2 ATP. Ponieważ, jak wspomniano, biosynteza niektórych składników ścian komórkowych bakterii produkujących kurdlan zachodzi również z udziałem doli-

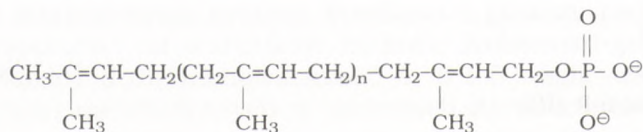


Rys. 2. Reakcje cyklu pentozowego prowadzące do przesunięcia ¹³C z pozycji 2 (I) do pozycji 1 (II) oraz 1 i 3 (III); 1 — epimeraza ksylulozo-5-P, 2 — izomeraza rybozo-5-P, 3 — transketolaza, 4 — transaldolaza, 5 — fosfoglukoizomeraza.

cholu, można by się spodziewać dużej konkurencji obu szlaków o pulę tego lipidu. Faktycznie współzawodnictwo o dolichol ma niewielkie znaczenie, ponieważ maksymalna produkcja kurdlanu — przeciwnie niż innych mikrobiologicznych zewnątrzkomórkowych polisacharydów — następuje w fazie stacjonarnej, po zastopowaniu wzrostu drobnoustroju, spowodowanego prze-



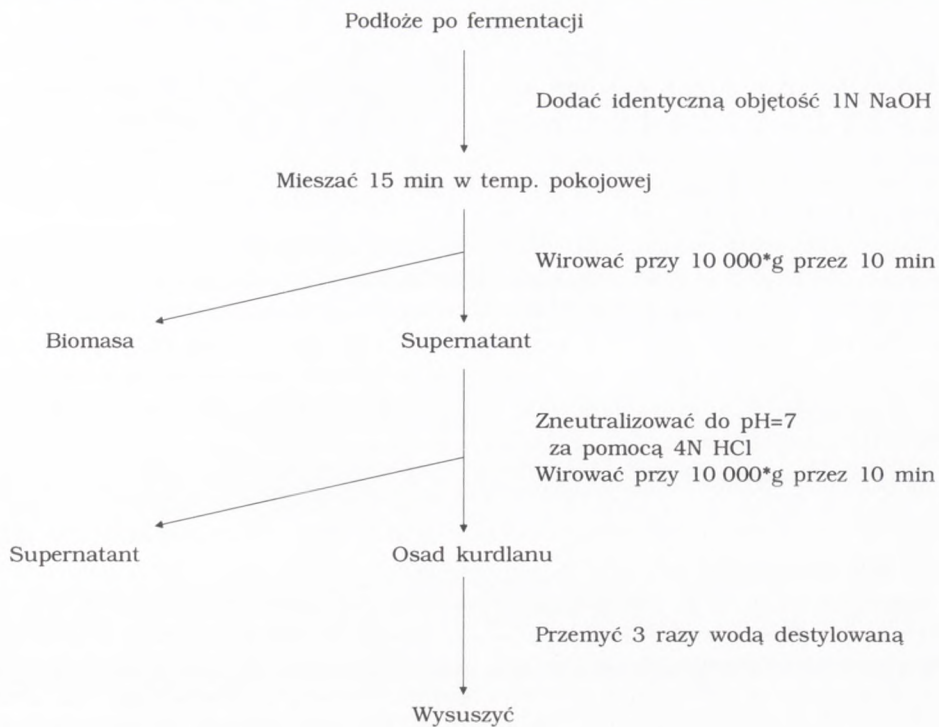
Rys. 3. Szlak biosyntezy kurdlanu (wg Sutherlanda (10), zmodyfikowany). Dol — P : dolichol (fosforan alkoholu poliizoprenoidowego):



$n = 15-19$; LPS — lipopolisacharyd; UDPGlc (UDPG) — urydynodifosfoglukozą

de wszystkim wyczerpaniem się źródła azotu (11). Inną rolą dolicholu jest prawdopodobnie udział w sekrecji kurdlanu z komórki bakteryjnej.

Fizjologiczna rola kurdlanu nie została w literaturze jasno sformułowana. Można przypuszczać, że pełni on funkcję ochronną przed szkodliwymi związkami znajdującymi się we frakcjach ropy naftowej. Może też stanowić rezerwę pokarmową w razie niedoboru innych źródeł węgla (9).



Rys. 4. Schemat procedury izolacji kurdlanu.

3. Struktura kurdlanu

Ustalenie struktury chemicznej i molekularnej kurdlanu wymagało opracowania procedury otrzymania go w postaci homogennej. Autorami najczęściej stosowanej, prostej metodyki separacji tego polisacharydu z cieczy po hodowli *Alcaligenes faecalis* są Nakanishi i wsp. (12). Opiera się ona na zmianie konformacji cząsteczki kurdlanu, która zachodzi, gdy polisacharyd znajduje się w środowisku bardziej zasadowym niż 0,2 N NaOH (13). Jest on wówczas rozpuszczalny i można w prosty sposób oddzielić go od biomasy. Po neutralizacji roztworu kurdlan wytrąca się i z łatwością daje się odwirować. Wilgotny preparat należy przemyć wodą w celu oczyszczenia go z soli i wysuszyć (rys. 4).

Już we wczesnych badaniach Harada i wsp. (1) wykazali, że kurdlan jest homopolimerem D-glukozy połączonej wiązaniami β -(1 \rightarrow 3)-O-glikozydowymi. Przed jego odkryciem β -(1 \rightarrow 3)-glukany były znane przede wszystkim jako składniki strukturalne ścian komórkowych grzybów i roślin wyższych. Istnieje wśród nich wiele różnych wariantów struktur molekularnych. Rozpuszczalność β -(1 \rightarrow 3)-glukanów zależy głównie od stopnia polimeryzacji ich łańcuchów. Porównując β -(1 \rightarrow 3)-glukany o różnej budowie, np. kurdlan

i pachyman z *Poria cocos* (13) można zauważyć, że chociaż obydwie są nierozpuszczalne w wodzie, a rozpuszczalne w alkaliach, to pachyman formuje mniej elastyczne i mniej wytrzymałe żele w porównaniu z żelami kurdlanowymi. Nie świadczy to jednak o jego mniejszym stopniu polimeryzacji, lecz wynika z istnienia w cząsteczce różnych wiązań pomiędzy resztami glukozy (14), zakłócających liniowość łańcucha pachymanu, a przez to zmniejszających jego zdolność do tworzenia żeli.

Cząsteczki glukanów izolowane z komórek drożdży, mimo że zawierają wiązania β -(1 \rightarrow 3) nie są rozpuszczalne w wodzie i alkaliach oraz nie mają właściwości termozelujących (14). Wynika to z rozgałęzionej ich budowy; w takiej cząsteczce liczne łańcuchy β -(1 \rightarrow 3)-glukanowe są przyłączone wiązaniami β -(1 \rightarrow 6) do głównego łańcucha β -(1 \rightarrow 3), stanowiącego trzon polisacharydu, dzięki czemu mogą się tworzyć wiązania wodorowe, stabilizujące całą strukturę.

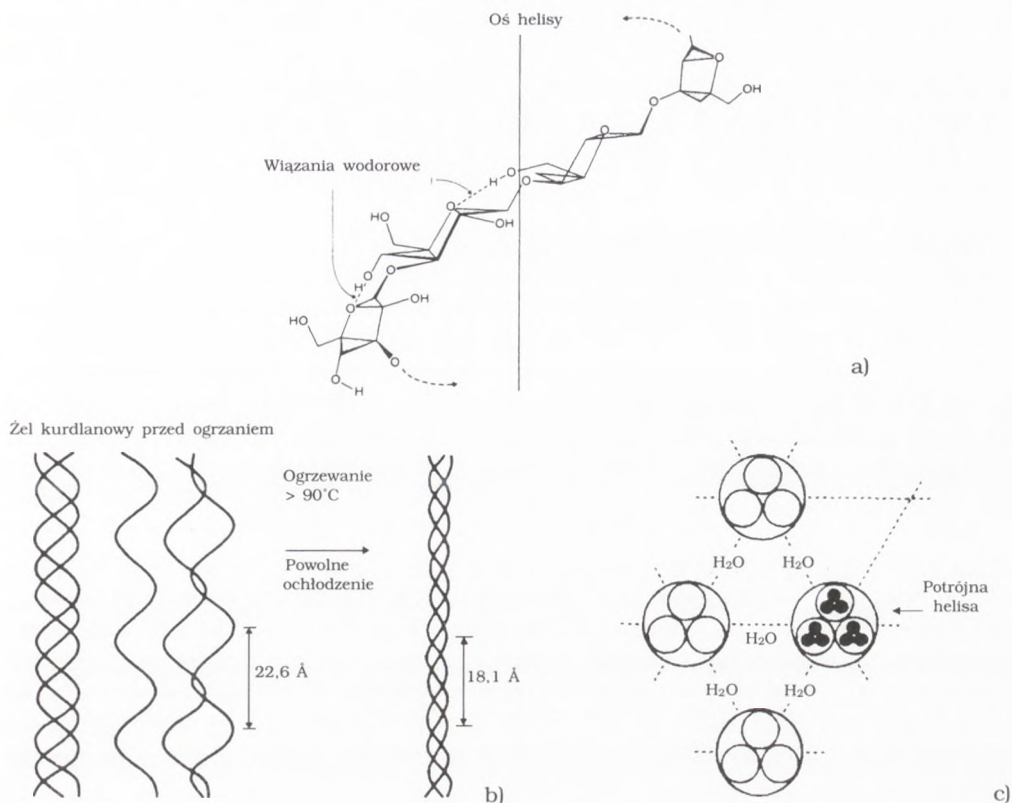
Analiza chemiczna przeprowadzona przez Satio i wsp. (14) wykazała, że DP różnych preparatów kurdlanu, otrzymanych podczas hodowli *Alcaligenes faecalis* waha się w granicach 135-455 i zależy od warunków, w jakich prowadzi się biosyntezę.

Ogawa i wsp. (15) podają, że wielkość optycznej rotacji właściwej przy 439 nm preparatów kurdlanu w 0,2 N NaOH zmienia się wraz ze stopniem polimeryzacji w granicach od 25-200, natomiast gdy DP > 200 wartość rotacji właściwej jest maksymalna i stała. Ponieważ jakość tworzonego na drodze termicznej żelu kurdlanowego zależy od DP jego cząsteczek, pomiar optycznej rotacji właściwej stanowi prostą metodę określania przydatności wyjściowego substratu do otrzymania żelu o oczekiwanej charakterystyce.

W alkalicznych roztworach NaOH (> 0,2N) kurdlan jest całkowicie rozpuszczalny i występuje głównie w postaci cząsteczek o konformacji przypadkowego zwoju (16). Przy neutralizacji takiego roztworu, jeszcze przed ogrzaniem polimer zaczyna przechodzić w stan uporządkowany, tj. jego cząsteczki związają się helikalnie i występują bądź w postaci pojedynczych, bądź potrójnych łańcuchów, w których na jeden zwój helisy przypada siedem reszt glukozy (rys. 5) (17).

Ogrzanie zawiesiny kurdlanu powyżej 90°C, a następnie powolne jej schłodzenie powoduje częściową utratę wody i powstanie nowej, ściślejszej struktury potrójnej helisy, w której długość pojedynczego zwoju zmniejsza się z 22,6Å do 18,1Å (18), a średnica wynosi 15,56Å (19). Taka struktura utworzona jest z symetrycznie zwiniętych i przesuniętych w fazie trzech łańcuchów β -(1 \rightarrow 3)-glukanowych. Usunięcie z niej wody, np. przez suszenie pod zmniejszonym ciśnieniem, powoduje jeszcze bardziej ściśle upakowanie łańcuchów i zarazem zmniejszenie się długości jednego zwoju helisy do 5,7Å. Fulton i Atkins (20) sugerują, że potrójne helisy tworzą pomiędzy sobą sieć wiązań wodorowych. Struktury molekularne kurdlanu (rys. 5) zostały opracowane na podstawie wyników analiz rentgenograficznych i badań spektroskopowych polisacharydu w zakresie podczerwieni.

W ostatnio przeprowadzonych badaniach Cheeseman i Brown (21) przy użyciu spolaryzowanej mikroskopii świetlnej oraz nisko i wysoko rozdzielczej



Rys. 5. Kurdlan: a) model helikalnej struktury molekuly kurdlanu; b) i c) zmiany w konformacji cząsteczki pod wpływem ogrzewania i suszenia.

transmisyjnej mikroskopii elektronowej, sugerują, że kurdlan jest wytwarzany przez drobnoustroje w formie granul o strukturze mikroskopowej zbliżonej do struktury granul skrobi. W granulach tych łańcuchach polisacharydu nie cechuje tak wysoce uporządkowana struktura, jak w żelach kurdlanu otrzymywanych *in vitro*, bowiem mikrofibrylle kurdlanu związają się w nich w formę kłębka o prawdopodobnie stycznych łańcuchach. Granule tworzy też paramylon, β -(1 \rightarrow 3)-glukan glonów morskich, dla którego udowodniono, że mikrofibrylle związane w kłębek formujący granulę powstają przez asocjację trzech helikalnie splecionych łańcuchów (22). Cheeseman i Brown (21) sugerują wprawdzie identyczną strukturę mikrofibrylli kurdlanu w granulach, jednakże wymaga to dalszych badań.

Podczas ogrzewania zawiesin kurdlanu jego mikrofibrylle stopniowo ulegają asocjacji, co prowadzi — jak już wspomniano — do tworzenia żelu. O ile jednak w temperaturach z zakresu 55-95°C w asocjacji mikrofibrylli

podstawową rolę odgrywają międzycząsteczkowe wiązania wodorowe, to powyżej tej temperatury zaczynają przeważać oddziaływania hydrofobowe między mikrofibryllami (23). Do tej pory nie rozstrzygnięto jakie zmiany zachodzą w strukturze żeli kurdlanowych powyżej 120°C, kiedy przechodzą one w stan jeszcze bardziej uporządkowany.

4. Właściwości fizykochemiczne kurdlanu

Kurdlan zawdzięcza nazwę unikatowym właściwościom termożelującym. Kiedy podgrzewa się 2% (w/v) zawiesinę kurdlanu można zaobserwować zmianę jej zdolności do przepuszczania światła widzialnego. Zwiększa się ona stopniowo wraz ze wzrostem temperatury do 50-54°C, kiedy to roztwór staje się zupełnie przezroczysty. Powyżej 54°C kurdlan zaczyna tworzyć żel, początkowo mało stabilny i lepki, potem, wraz z podgrzaniem do 95°C mocny i trwały (24). Taki żel jest nierozpuszczalny do temperatury 140-160°C (25), co oznacza, że w przeciwieństwie do agaru nie topi się po ponownym ogrzaniu. Temperatura topnienia zależy od stężenia polimeru, a także od stopnia jego polimeryzacji (im większy DP, tym wyższa temperatura topnienia). W porównaniu do agaru, tworzącego stosunkowo kruchy i miękki żel, żełe kurdlanowe są bardziej elastyczne i trwałe. Są one także bardziej odporne na zamrażanie i ponowne rozmrażanie. Inną zaletą tych żeli jest ich stabilność w szerokim zakresie pH, od 3 do 9,5. Żele o maksymalnej wytrzymałości powstają przy pH 3 (26). Nie jest to możliwe w przypadku agaru, ponieważ ten nie żeluje w pH poniżej 4,5.

5. Potencjalne zastosowanie kurdlanu w przemyśle

Kiedy kurdlan został odkryty, pierwszym planowanym zastosowaniem było użycie go w przemyśle spożywczym jako substytutu naturalnych polisacharydów roślinnych, a także jako preparatu zagęszczającego (27). Później, po stwierdzeniu, że β -(1 → 3)-glukan nie jest degradowany przez enzymy trawienne człowieka, kolejnym możliwym zastosowaniem kurdlanu były produkty o obniżonej kaloryczności (dietetyczne). Możliwość tworzenia przez kurdlan żeli zdolnych do wchłaniania dużej ilości cukrów z syropu, sugeruje kolejne zastosowanie polimeru w produkcji wyrobów cukierniczych. Z kolei ich odporność na zamrażanie umożliwia użycie go w produkcji mrożonek i lodów. Pseudoplastyczne zachowanie się cieczy zawierających dodatek kurdlanu pozwala wykorzystać je jako zagęszczacze i stabilizatory żywności.

Do tej pory kurdlan został dopuszczony do stosowania w przemyśle spożywczym Japonii, gdzie jest używany głównie jako dodatek w wyrobach cukierniczych. Wykorzystuje się go także do produkcji błon (28), które są nierozpuszczalne w wodzie, biodegradowalne i nieprzepuszczalne dla tlenu (29). Prawdopodobnie kurdlan zostanie szybciej wykorzystany w innych gałęziach przemysłu, na przykład do odzysku odpadowych olejów. Możliwe jest także

użycie tego polisacharydu w immobilizacji enzymów. Niezwykle interesujące są doniesienia o antynowotworowych właściwościach trójłańcuchowych cząsteczek kurdlanu o uporządkowanej molekularnej strukturze, które wskazują możliwość wykorzystywania tego bakteryjnego polisacharydu w leczeniu nowotworów (30).

Literatura

1. Harada T., Masada M., Fujimori K., Maeda I., (1966), *Agr. Biol. Chem.*, 30, 196-201.
2. Harada T., Misaki A., Satio H., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, 124, 292-298.
3. Harada T., Amenura A., Satio H., Kamamara S., Misaki A., (1968), *J. Ferment. Technol.*, 46, 679.
4. Harada T., Yoshimura T., (1965), *Agr. Biol. Chem.*, 29, 1027-1029.
5. Harada T., Yoshimura T., (1964), *Acta Biochim. Biophys.*, 83, 374-376.
6. Harada T., (1965), *Arch. Biochim. Biophys.*, 112, 65-69.
7. Harada T., Yoshimura T., (1964), *J. Ferment. Technol.*, 42, 615-622.
8. Nakanishi T., Kimura K., Kusui S., Yamazaki E., (1974), 32, 47-52.
9. Kai A., Ishino T., Arashida T., Hatanaka K., Akaike T., Matsuzaki K., Kaneko Y., Mimura T., (1993), *Carbohydr. Res.* 240, 153-159.
10. Sutherland I., W., (1979), in: *Microbial Polysaccharides and Polysaccharades*, Eds. Berkeley R. C. W., Gooday G. W., Ellwood D. C., Acad. Press, New York, 1-50.
11. *Biotechnology*, (1996), Eds. Rehm H. J., Reed G., Weinheim, N.Y., Basel, Cambridge, Tokyo, vol. 6, 635.
12. Nakanishi T., Kanamura K., Kimura K., Matsukura A., Asai M., Suzuki T., Yamatodani S., (1972), *Proc. 284th Meeting of Kansai Branch of Agr. Chem. Soc.*, Osaka.
13. Warsi S. A., Whelan W. J., (1957), *Chem. Ind. London*, 5, 1573-1576.
14. Satio H., Harada T., Misaki A., (1968), *Agr. Biol. Chem.*, 32, 1261-1269.
15. Ogawa K., Tsurugi J., Watanbe T., (1973), *Carbohydr. Res.*, 29, 397-402.
16. Ogawa K., Watanbe T., Tsurugi J., Ono S., (1972), *Carbohydr. Res.*, 23, 399-405.
17. Takeda H., Yasuoka N., Kasai N., Harada T., (1978), *Polymer J.*, 10, 365-368.
18. Kasai N., Harada T., French A. D., Gardner K. H., (1980), *Fiber Diffraction Methods*, American Chemical Society Symposium Series, Washington DC, 363-383.
19. Chuah C. T., Sarko A., Deslandes Y., Marchessault R. H., (1983), *Macromolecules*, 16, 1375-1382.
20. Fulton W. S., Atkins E. D. T., French A. D., Gardner K. H., (1980), *Fiber Diffraction Methods*, American Chemical Society Symposium Series, Washington DC, 385-410.
21. Cheeseman I. M., Brown R. M., (1995), *Microscopy of Curdlan Structure*, Howard Hughes Molecular Biology Summer Research Program Poster, Austin, TX.
22. Marchessault R. H., Deslandes Y., (1979), *Carbohydr. Res.*, 75, 231-242.
23. Harada T., Koreeda A., Satio S., Kasai N., (1979), *J. Electron Microscopy* 28(3), 147-153.
24. Stone A. B., Clark A. E., (1992), *Chemistry and Biology of (1→3)-β-Glucans*, La Trobe University Press, Victoria, Australia.
25. Roller S., Dea I. C. M., (1992), *Crit. Rev. in Biotechnol.*, 12(3), 261-277.
26. Kimura H., Mostitaka S., Misaki M., (1973), *Journal Food Science*, 38, 668-670.
27. Kimura H., Sato S., Nakagawa T., Nakatani H., Matsukura A., Asai M., Suzuki T., Kanamaru T., Shibata M., Yamatodani S., (1973), *U. S. Patent* 3, 745, 925.
28. Konno A., Lida A., (1989), *Eur. Patent Appl.*, EP 0328317A1.
29. Takahashi K., Yamasaki Y., Kato K., Takahasi T., (1976), *Abstract of the Annual Meeting of Agr. Chem. Soc., Japan*, 401.
30. Satio H., Yoshioka Y., Yokoi M., Yamada J., (1990), *Biopolymers*, 29, 1689-1698.

Curdlan — structure, properties and applications

Summary

Curdlan, a bacterial β -(1 \rightarrow 3)-glucan produced by some strains of *Alcaligenes faecalis* and *Agrobacterium*, forms thermoplastic gels, stable at pH from 3 to 9,5 and up to 140-160°C. This paper describes biosynthetic pathways, molecular structure and properties of this polysaccharide, and also discusses the possibilities of its applications, mainly in food industry.

Key words:

microbial polysaccharides, β -(1 \rightarrow 3)-glucans, curdlan.

Adres do korespondencji:

Marianna Turkiewicz, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-457 Łódź.