

## BIOSINTEZA KSANTANA NA OBOGAĆENOJ VODI OD ISPIRANJA TROPA

*Siniša L. Markov, Jelena M. Dodić, Dragoljub D. Cvetković,  
Svetlana B. Milošević, Vesna J. Marjanović, Siniša N. Dodić*

*U podlogu za biosintezu, čija je osnova voda od ispiranja tropa (kao izvor ugljenika, azota, mikroelemenata i faktora rasta), dodavani su ekstrakt kvasca, limunska kiselina i mikroelementi. Ispitan je uticaj navedenih dodataka podlozi na produkciju ksantana vlastitim sojem i referentnim reizolatom.*

*Utvrđeno je da inicijalni sadržaj azota u vodi od ispiranja tropa nije dovoljan pa se dodavanjem ekstrakta kvasca, do 0,38% ostvaruju bolji prinosi. Pozitivan efekat na prinos ostvaruje se dodatkom mikroelemenata kao i dodatkom limunske kiseline. U svim primenjenim podlogama, pod istim eksperimentalnim uslovima, veći prinosi su ostvareni referentnim sojem.*

**KLJUČNE REČI:** *Ksantan, biosinteza, voda od ispiranja tropa*

### UVOD

Zahvaljujući specifičnim osobinama, prirodni polisaharidi i njihovi derivati široko su primenjivi u brojnim granama industrije. Pored uobičajeno primenjivanih polisaharida biljnog porekla, poslednjih decenija sve veća pažnja poklanja se polisaharidima mikrobiološkog porekla, sobine ovih biopolimera u većoj meri odgovaraju zahtevima nekih savremenih tehnologija. Njihova proizvodnja ne zavisi od faktora spoljašnje sredine, a zasniva se na konverziji nuzproizvoda ili otpadnih materijala prehrambenih tehnologija. Iako rezultati naučnih istraživanja pokazuju da polisaharidi mikrobiološkog porekla mogu uspešno zameniti neke od biljnih polisaharida, svrha njihove proizvodnje nije zamena biljnih biopolimera, već proširenje područja primene prirodnih polisaharida.

Ksantan je, komercijalno gledano, najznačajniji mikrobiološki polisaharid. Od momenta njegovog otkrića, koje se pripisuje istraživačkom timu iz NRRL, Peoria (1), on ne prestaje da zaokuplja pažnju istraživača. Prema procenama, aktuelne potrebe za ksantanom na svetskom tržištu rastu godišnjom stopom 5-10% (2), a njegova se primena, u raznovrsnim proizvodima

---

Dr Siniša Markov, docent, dipl. inž. Jelena Dodić, dipl. inž. Dragoljub Cvetković, Mr Svetlana Milošević, asistent, dipl. inž. Vesna Marjanović, Mr Siniša Dodić, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, Jugoslavija.

i granama industrije, brzo i neprestano širi. Zbog jedinstvenog, pseudoplastičnog ponašanja njegovih vodenih rastvora u širokom opsegu temperature i pH, ovaj biopolimer ima primenu u agrohemiji, prehrambenoj, kozmetičkoj i naftnoj industriji (3). Neka novija istraživanja pokazuju da ksantan može biti primenjan i u farmaceutskoj industriji (4, 5).

Biosinteza ovog heteropolisaharida je genetska karakteristika mikroorganizma *Xanthomonas campestris* i ne zavisi od izvora ugljenika (6). Ukoliko koncentracija šećera ne prelazi 2%, na raznim tipovima podloge zapažen je stepen konverzije od 90% u odnosu na lako usvojive ugljene hidrate kao što su glukoza, maltoza, maltotrioza (7). Minimalan sadržaj azota u podlozi je 0,02% (8, 9), a izvor azota ima limitirajući efekat na produkciju biopolimera. Na prinos i kvalitet nastalog biopolimera utiče sadržaj limunske kiseline u sintetičkoj podlozi. Za biosintezu je neophodno obezbediti stalnu aerobnu sredinu, a optimalna vrednost pH je između 6,5-7,5 (2).

Cilj ovog rada je ispitivanje mogućnosti primene obogaćene vode od ispiranja tropa za biosintezu ksantana.

## EKSPERIMENTALNI DEO

U ovim istraživanjima korišćene su sledeće podloge:

- 1) za čuvanje, održavanje i osvežavanje ksantanogenih sojeva: YM agar (Difco) sa dodatkom  $\text{CaCO}_3$ ;
- 2) za pripremu inokuluma - osnovna podloga: voda od ispiranja tropa sa dodatkom  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,02%) i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,4%);
- 3) za biosintezu: osnovna podloga obogaćena ekstraktom kvasca (0,38%), limunskom kiselinom (0,21%) i/ili smešom mikroelemenata (10).

Rastvori dodvanih soli kao i rastvori za obogaćivanje odvojeno su sterilisani i dodavani u sterilisanu vodu od ispiranja tropa neposredno pred zasejavanje. Inicijalne vrednosti pH podloge za biosintezu korigovane su na potrebnu vrednost sterilnim rastvorima 2M HCl ili 2M KOH.

U ovim istraživanjima primenjeni su ksantanogeni sojevi iz zbirke kultura predmeta Mikrobiologija, Tehnološki fakultet, Novi Sad. Soj Am je reizolat iz liofilizovane referentne kulture *Xanthomonas campestris* NRRL-1459. Soj R<sub>2086/11-3m</sub> (u daljem tekstu 11-3m) izolovan je iz prirodnog materijala, našeg okruženja.

Inokulum je pripreman dvostrukim pasažiranjem, u toku 24-32h na 28°C, u podlozi za inokulum uz mešanje (300 o/min). Biosinteze su izvedene u bocama (zapremine 500 ml) sa prinudnom aeracijom (1000 l/h), na temperaturi 28-30°C, u trajanju do 96 h, na rotacionoj tresilici. Uzorkovanje fermentacione tečnosti, pod sterilnim uslovima, izvedeno je jednom dnevno, uz predhodnu nadoknadu gubitka mase nastalog tokom biosinteze.

Ksantan je, iz fermentacione tečnosti izdvajan, na hladno, uz mešanje, dodavanjem metanola do koncentracije od 60% (m/m) (11), i zasićenog rastvora KCl do 1% (12). Uzorci su, zatim, čuvani 24h na temperaturi 4°C, a potom centrifugovani (3500 o/min) u toku 15 min. Izdvojeni talog sušen je do konstantne mase na 60°C. Masa dvostruko taloženog ksantana merena je nakon rastvaranja taloga dobijenog opisanim postupkom u destilovanoj vodi do početne zapremine, i ponovnog izdvajanja. Viskoznost fermentacione tečnosti određivana je iz odnosa napona smicanja i brzine smicanja. Promene napona smicanja u funkciji brzine smicanja merene su rotacionim viskozimetrom Rotovisco RV-20, Haake (13).

Sadržaj redukujućih šećera u fermentisanoj tečnosti odredivan je metodom sa dinitrosalicilnom kiselinom (14) na osnovu njihovog sadržaja u supernatantu koji je dobijen tokom izdvajanja ksantana. Sakupljeni supernatanti su upareni pod sniženim pritiskom do mase fermentacione tečnosti.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Za utvrđivanje uticaja dodatog ekstrakta kvasca i limunske kiseline sa mikroelementima na biosintezu ksantana korišćene su sledeće podloge: osnovna podloga (proba 1 ili I), osnovna podloga obogaćena ekstraktom kvasca (proba 2 ili II) i osnovna podloga obogaćena limunskom kiselinom i smešom mikroelemenata (proba 3 ili III). U eksperimentima sa sojem Am (probe 1, 2 i 3) korišćena je voda od ispiranja tropa (suva materija 2,20%; rastvorljivi proteini 0,15%; redukujući šećeri 1%) sa nižim sadržajem rastvornih proteina i redukujućih šećera, u odnosu na vodu od ispiranja tropa (suva materija 4,70%; rastvorljivi proteini 0,3%; redukujući šećeri 2%) koja je korišćena u ogleđima sa sojem 11-3m (probe I, II i III).

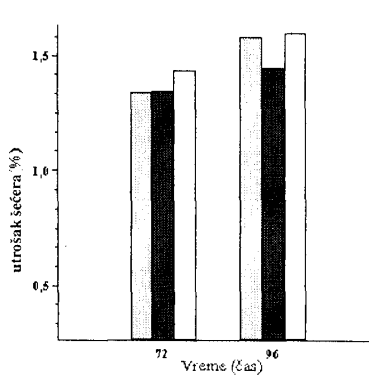
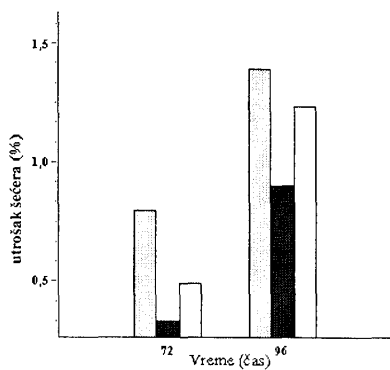
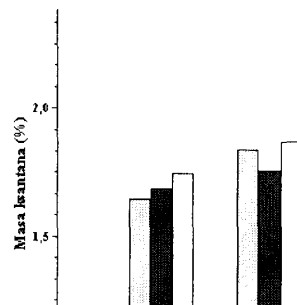
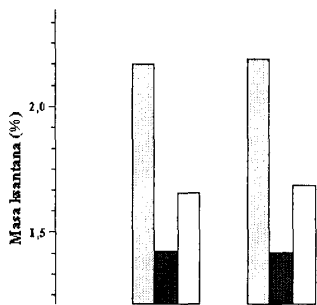
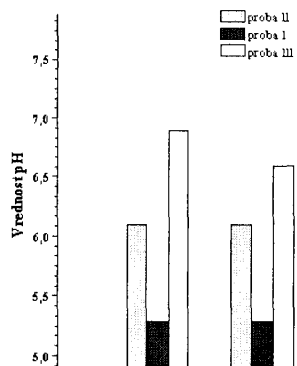
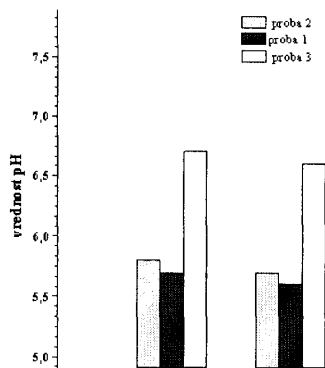
Vrednost pH u osnovnoj podlozi na početku procesa sa sojem Am bila je 7,30. Isti parametar u osnovnoj podlozi obogaćenoj ekstraktom kvasca bio je 7,15, dok je u podlozi obogaćenoj limunskom kiselinom i mikroelementima vrednost pH korigovana sa 5,30 na 7,40. Po isteku 72h fermentacije vrednost pH je u probama 1 i 2 pala ispod vrednosti optimalne za biosintezu (slika 1), što ukazuje da je u toku narednih 24h biosinteza minimalna. U probi 3 vrednost pH je i po isteku 96h fermentacije bila u okviru vrednosti optimalnih za biosintezu. Prinos ksantana u probi 2 je najveći (slika 1), što ukazuje na činjenicu da veća količina izvora azota u podlozi obezbeđuje i veći prinos ksantana. Ovakvi rezultati potvrđuju činjenicu da količina azota u osnovnoj podlozi limitira rast biomase u prvoj fazi fermentacije čime je značajno smanjena produkcija biopolimera (2). Količina redukujućih šećera utrošena tokom fermentacije značajno je manja od količine ovih materija prisutnih u vodi od ispiranja tropa. Ovo ukazuje na činjenicu da količina ugljenika koja je na raspolaganju mikroorganizmu nije limitirajući faktor biosinteze (slika 1).

Vrednost pH podloge na početku fermentacije sa sojem 11-3m u probi I iznosila je 7,5. U probi II ova vrednost je bila 7,4, dok je u probi III vrednost pH korigovana sa 5,3 na 7,4. U podlogama bez limunske kiseline i mikroelemenata (probe I i II) vrednost pH je pala ispod vrednosti optimalne za biosintezu ksantana već nakon 72h, dok je u probi III i nakon 96h u optimalnim granicama za biosintezu (slika 2). Najveći prinos ksantana ostvaren je u podlozi sa limunskom kiselinom i mikroelementima u kojoj tokom fermentacije nije bilo drastičnih promena vrednosti pH (slika 2). Prinosi ksantana su u probama I i III veći nego u probama 1 i 3, verovatno zahvaljujući činjenici da su podloge za eksperimente sa sojem 11-3m bogatije azotom i ugljenikom u odnosu na podloge za eksperimente sa sojem Am. Veće količine azota obezbeđuju više biomase, koja troši više izvora ugljenika i daje veću količinu ksantana. U probi II prinos ksantana je manji u odnosu na prinos u probi 2. Ovo ukazuje na inhibitorni efekat većih količina azota na prinos biopolimera, jer utrošak izvora ugljenika u periodu 72-96h ukazuje na njegovo dobro iskorišćenje u probi II, a što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (7-9).

Na osnovu podataka dobijenih praćenjem kinetike biosinteze sojevima Am i 11-3m, zapažaju se razlike u prinosu u pojedinačnim fermentacijama, što je verovatno posledica sniženja vrednosti pH.

U cilju utvrđivanja produktivnosti primenjivanih sojeva izvedene su biosinteze pod istim eksperimentalnim uslovima. Biosinteze su vodene u tri različite vrste podloge: osnovna podloga, osnovna podloga obogaćena ekstraktom kvasca i osnovna podloga u kojoj je korišćena voda od ispiranja tropa sa nižim sadržajem azota i ugljenika. S obzirom da su predhodni ogleđi pokazali neznatne razlike ispitivanih parametara između 72h i 96h fermentacije, biosinteza je trajala 72h.

Početne vrednost pH podloga za soj Am bile su 7,4. Za soj 11-3m početne vrednosti pH podloga su se međusobno razlikovale: osnovna podloga 7,55, osnovna podloga obogaćena ekstraktom kvasca 7,3 i osnovna podloga sa nižim sadržajem izvora ugljenika i azota 7,4.



**Slika 1.** Uticaj ekstrakta kvasca i limunske kiseline sa mikroelementima na biosintezu ksantana sojem Am

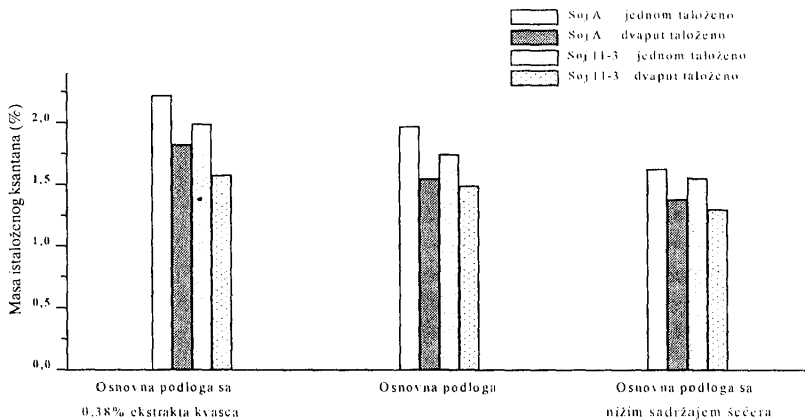
**Slika 2.** Uticaj ekstrakta kvasca i limunske kiseline sa mikroelementima na biosintezu ksantana sojem 11-3m

U Tabeli 1 su date vrednosti parametara određene nakon 72h fermentacije. Najveći prinos ostvaren je u podlozi sa ekstraktom kvasca, nešto manji je u osnovnoj podlozi, a najmanji u podlozi sa nižim sadržajem izvora azota i ugljenika. Zapaža se da je produktivnost soja Am nedvosmisleno veća, mada po padu vrednosti pH fermentisane mase to nije očigledno. Vrednost pH podloge koja je siromašnija esencijalnim elementima u 72h još uvek je u optimalnom opsegu za biosintezu. Visoko iskorišćenje izvora ugljenika u istim ogledima ukazuje na limitiranost biosinteze u ovoj podlozi nedovoljnim količinama šećera.

**Tabela 1.** Rezultati ispitivanja fermentisanih tečnosti nakon 72h fermentacije

	Soj Am			Soj11-3m		
	Podloga sa ekstraktom kvasca	Osnovna podloga	Podloga sa nižim sadržajem C, N	Podloga sa ekstraktom kvasca	Osnovna podloga	Podloga sa nižim sadržajem C,N
Vrednost pH	6,40	5,85	6,75	6,30	5,95	6,80
Utrošak šećera [g/100ml podloge]	79,63	71,53	86,76	74,84	63,8	84,79
Masa ksantana [%]	2,22	1,97	1,625	1,99	1,745	1,555

Rezultati dvostrukog taloženja ksantana ukazuju da složenost podloge uvećava razliku prinosa biopolimera jednom i dvaput taloženog ksantana. Slika 3 pokazuje razliku prinosa ksantana nakon jednostrukog i dvostrukog taloženja biopolimera iz fermentisane tečnosti.

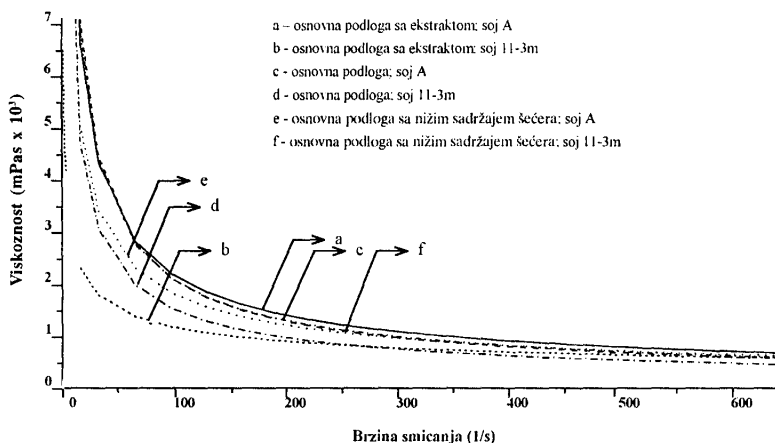


**Slika 3.** Prinosi ksantana nakon 72h

Za oba primenjivana soja, u sve tri primenjene podloge je na kraju biosinteze izvršena analiza promena viskoznosti fermentisane tečnosti u funkciji brzine smicanja. Rezultati ovih određivanja prikazani su na slici 4.

Najveća viskoznost pri svim brzinama smicanja zapaža se kod podloge sa ekstraktom kvasca koja je fermentisana sojem Am, a najmanja viskoznost zapažena je kod iste podloge fermentisane sojem 11-3m. Ostale fermentisane tečnosti imaju bliske vrednosti viskoznosti za sve primenjene brzine smicanja. Dobijene vrednosti viskoznosti u podlogama koje su fermentisane sojem Am u skladu su sa ostvarenim prinosima u datim podlogama. Kod

podloga fermentisanih sojem 11-3m to nije slučaj. Poznato je da viskoznost rastvora ksantana nije jednoznačno određena koncentracijom biopolimera, već u velikoj meri zavisi i od sadržaja piruvata ugrađenog u bočne grane molekula kao i od raspodele molekulskih masa ksantana. Ispoljene razlike u viskoznosti fermentisanih tečnosti sojem 11-3m verovatno potiču od sadržaja piruvata u biopolimeru, a moguće je i da zavise od urednosti strukture nastalog ksantana.



**Slika 4.** Promene viskoznosti fermentisanih tečnosti nakon 72h procesa u funkciji brzine smicanja

## ZAKLJUČAK

Sadržaj izvora ugljenika u podlozi direktno utiče na prinos ksantana, a za ekološki prihvatljivu proizvodnju potrebno je odrediti stepen iskorišćenja izvora ugljenika za svaki soj pod datim uslovima.

U zavisnosti od inicijalnog sadržaja azota u vodi od ispiranja tropa zavisi i količina ekstrakta kvasca koju je neophodno dodati.

Veći prinosi ksantana se ostvaruju ukoliko se u vodu dodaju mikroelementi.

Dodatkom limunske kiseline u osnovnu podlogu usporava se pad vrednosti pH uz porast iskorišćenja šećera, čime se ostvaruje veći prinos ksantana.

U svim primenjenim podlogama veća produktivnost se ostvaruje ukoliko je proizvodni mikroorganizam referentni soj.

## LITERATURA

1. Rogovin, S.P., R.F. Anderson, and M.C. Cadmus: Production of Polysaccharide with *Xanthomonas campestris*, J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. **3** (1961), 51-63.
2. Galindo, E.: Aspects of the Process for Xanthan Production, Trans IChemE **72** (1994), 227-237.
3. Sutherland I.W.: Novel and established applications of microbial polysaccharides, Tibtech **16** (1998), 41-46.

4. Shimada, K., H. Okada, K. Matsuo, and S. Uoshioka: Involvement of Chelating Action and Viscosity in the Antioxidative Effect of Xanthan in an Oil/Water Emulsion, *Biosci. Biotech. Bioch.* **60** (1996), 125-127.
5. Duru, D., D. Gaudy, H. Neye, S. Rizk, M. Jakob, and A. Puech: A New Tablet Disintegrating Agent, Xanthan Sm Formulation and Drug Release Studies, *Pharmazie* **50** (1995), 272-275.
6. Papoutsopoulou, S.V., L.V. Ekatariniadou, and D.A. Kyriakidis: Genetic Construction of *Xanthomonas campestris* and Xanthan Gum Production from Whey, *Biotechnol. Lett.* **16** (1994), 1235-1240.
7. Moraine, R.A., and P. Rogovin: Xanthan Biopolymer Production at Increased Concentration by pH Control, *Biotechnol. Bioeng.* **13** (1971), 381-391.
8. Cadmus, M.C., C.A. Knutson, A.A. Lagoda, J.E. Pittsley and K.A. Burton: Syntetic Media for Production of Quality Xanthan gum in 20 Liter Fermentors, *Biotechnol. Bioeng.* **XX** (1987), 1003-1014.
9. Silman, R.W. and P. Rogovin: Continous Fermentation of Produce Xanthan Biopolymer: Laboratory Investigation, *Biotechnol. Bioeng.* **XII** (1970), 75-83.
10. Eitle, W., K. Hoffman, W. Lehn, K. Füshsle, B. Hansen: Deutsches Patentschriht DE 28 49 183 C3 (1981) Verfahren zur Herstellung von Polysaccharid.
11. Flahive III, J.J., A. Faufopoulos, and M.R. Etzel: Alcohol Precipitation of Xanthan Gum from Pure Solutions and Fermentation Broths, *Separ. Sci. Technol.* **29** (1994), 1673-1687.
12. Gonzales, R., M.R. Johns, P.F. Greenfield, and W. Pace: Xanthan Gum Precipitation Using Ethanol, *Process. Biochem.* **24** (1989), 200-203.
13. Vrbaški L.Lj., B.S. Pekić, S.L. Markov, M.J. Hauk: Study of the Xanthan gum Biosynthesis, *Proceedings of Faculty of Technology Novi Sad* **26-27** (1995-96), 271-279.
14. Miller, G.L: Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.* **31** (1959), 426-428.

## XANTHAN BIOSYNTHESIS ON ENRICHED WATER FOR SPENT GRAINS WASHING

*Siniša L. Markov, Jelena M. Dodić, Dragoljub D. Cvetković,  
Svetlana B. Milošević, Vesna J. Marjanović, Siniša N. Dodić*

Yeast extract, citric acid and microelements were added in biosynthesis medium based on enriched spent grains liquor (as the source of C and N atoms as well as microelements and growing factors). Influence of these supplements on production of xanthan by itself strain and reisolation strain was studied.

The initial content of nitrogen in the last running spent grains liquor was not enough, but with adding of yeast extract, the xanthan yield had better results. Better effects on xanthan yield were realized with adding of microelements and citric acid as well. The better results of xanthan yield are obtained with Am strain in all testing broths.

Prispeo 18. januara 2000.  
Prihvaćen 11. jula 2000.