

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΞΑΝΘΑΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ *Xanthomonas campestris* wt

Σ. Ψωμάς, Α. Μπατσίλας, Σ. Παράς, Μ. Λιακοπούλου-Κυριακίδου
Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54006 Θεσσαλονίκη

Μ. Παπαγιάννη¹, Δ. Κυριακίδης²
¹Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54006 Θεσσαλονίκη
²Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54006 Θεσσαλονίκη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η παραγωγή ξανθάνης, προϊόντος υψηλής προστιθέμενης αξίας με τον μικροοργανισμό *Xanthomonas campestris* wt από συνθετικό υπόστρωμα LBG (Luria- Bertani + 0.5% Glucose). Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε αντιδραστήρα 2L, στους 28°C και αρχικό pH 7. Μελετήθηκε η επίδραση της ανάδευσης (100 ως 600 rpm) τόσο στην παραγωγή ξανθάνης όσο και στις χαρακτηριστικές ιδιότητες του πολυσακχαρίτη.

Βρέθηκε ότι με αύξηση του ρυθμού ανάδευσης, αυξάνουν και η παραγωγή ξανθάνης και βιομάζας. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη παραγωγή ξανθάνης παρατηρήθηκε στα 600 rpm και στις 72 ώρες (0.66 g/100ml). Το MB της παραγόμενης ξανθάνης (5×10^5) φάνηκε ότι δεν επηρεάζεται από τον ρυθμό ανάδευσης ενώ η περιεκτικότητα του πολυμερούς σε πυροσταφυλικό οξύ αυξήθηκε από 1.54% στα 100rpm μέχρι 3.49% στα 300rpm χωρίς περαιτέρω μεταβολή μέχρι και τα 600 rpm

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ξανθάνη είναι ένας ανιονικός ετεροπολυσακχαρίτης Αποτελείται από έναν επαναλαμβανόμενο πεντασακχαρίτη (μονομέρες) που περιέχει D-γλυκόζη, D-μαννόζη και D-γλυκουρονικό οξύ σε αναλογία 2:2:1 [1,2]. Συγκεκριμένα, η κύρια αλυσίδα αποτελείται από μόρια γλυκόζης στα οποία ανά δύο, υπάρχει ένας τρισακχαρίτης ως πλευρική αλυσίδα, που αποτελείται από 6-ακέτυλο-D-μαννόζη, D-γλυκουρονικό οξύ και 4,6-πυροσταφυλική- D-μαννόζη [3]. Η ξανθάνη είναι ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων της οι οποίες εξαρτώνται τόσο από το MB της όσο και από την περιεκτικότητά της σε πυροσταφυλικό οξύ. Χρησιμοποιείται κυρίως ως γαλακτοματοποιητής και σταθεροποιητής στη βιομηχανία τροφίμων. Βρίσκει επίσης σημαντικές εφαρμογές στη φαρμακευτική βιομηχανία καθώς και στη βιομηχανία πετρελαίου [4].

Μέχρι σήμερα για τη μικροβιακή της παραγωγή, χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα μαννόζης και μελάσας [5], τυρόγαλα (με τροποποιημένα-βελτιωμένα- στελέχη) [6,7] καθώς και χυμός ροδάκινου [8] και καστανάλευρο (με μη τροποποιημένα στελέχη) [9].

Για την παραγωγή της ξανθάνης χρησιμοποιείται ο μικροοργανισμός *Xanthomonas campestris* ο οποίος είναι βακτήριο αρνητικό κατά Gram, ανήκει στην κατηγορία των ψευδομονάδων [1] και είναι αυστηρά αερόβιος. Η βέλτιστη ανάπτυξη του επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 25-30°C και σε pH 7 [11].

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του ρυθμού ανάδευσης στην παραγωγή ξανθάνης καθώς και των χαρακτηριστικών της κατά τη ζύμωση του *Xanthomonas campestris* wt σε βιοαντιδραστήρα 2L με συνθετικό υπόστρωμα LBG.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Χρησιμοποιήθηκε μη τροποποιημένο στέλεχος του μικροοργανισμού *Xanthomonas campestris*. Η αρχική καλλιέργεια καθώς και η καλλιέργεια στον βιοαντιδραστήρα, έγιναν σε LB (Luria-Bretani) μέσο το οποίο αποτελείται από τρυπτόνη 1%, εκχύλισμα ζύμης 0.5% και χλωριούχο νάτριο 0.5% στο οποίο προστέθηκε 0.2% γλυκόζης. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε βιοαντιδραστήρα 2L στους 28°C για ρυθμούς ανάδευσης 100, 200, 300, 400 και 600rpm. Ο ρυθμός παροχής του αέρα ήταν 1vvm. Το αρχικό pH ρυθμίστηκε στην τιμή 7, ενώ το ενοφθάλμισμα ήταν 5% σε όλες τις περιπτώσεις.

Η ξανθάνη και η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων προσδιορίστηκαν όπως αναφέρονται σε προηγούμενη εργασία [9].

Ο προσδιορισμός της βιομάζας έγινε με ζύγιση έπειτα από ξήρανση στους 80°C για 24 ώρες.

Ο προσδιορισμός του MB έγινε με HPLC σε στήλη ZORBAX BIO SERIES GF-450 (στήλη μοριακής διήθησης με διαχωριστική ικανότητα από 10^4 - 10^6) και με ανιχνευτή RI.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πυροσταφυλικού οξέος έγινε με HPLC σε στήλη SEPARON SGX C18 και με ανιχνευτή UV (μήκος κύματος 210nm).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

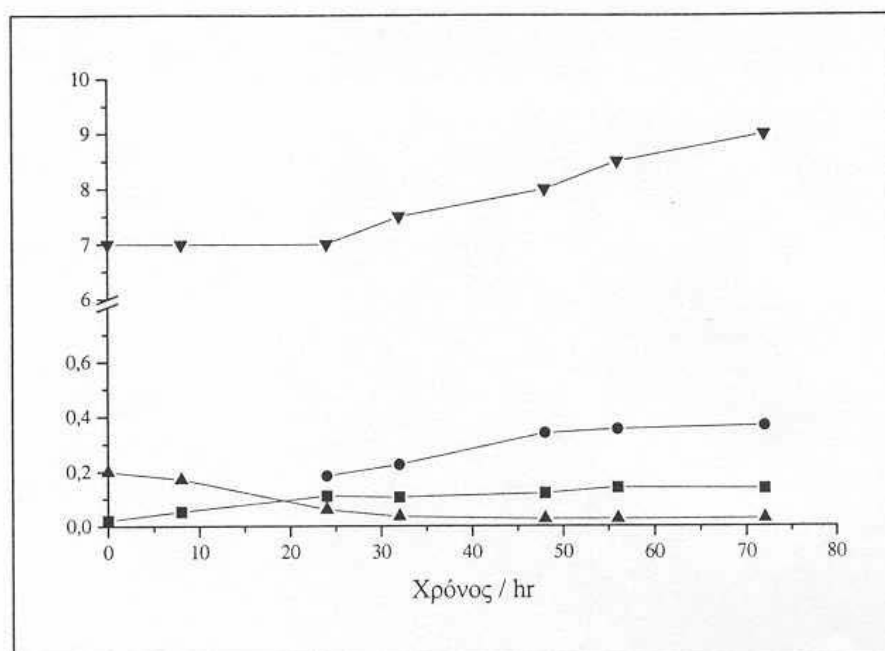
Η επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπάρχει εξάρτηση μεταξύ του ρυθμού ανάδευσης και της παραγόμενης ξανθάνης και βιομάζας και συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι με αύξηση του ρυθμού ανάδευσης αυξάνει και η παραγωγή τους.

Τα δεδομένα των πειραμάτων για 100 και 600rpm δείχνουν σχεδόν διπλασιασμό της παραγόμενης ξανθάνης, από 0.36 g/100ml σε 0.66 g/100ml αντίστοιχα. Αύξηση της παραγωγής με αύξηση του ρυθμού ανάδευσης, παρατηρήθηκε και για την κυτταρική μάζα. (από 0, 14 g/100ml στα 100rpm σε 0.3 g/ml στα 600 rpm). Τα ανάγοντα σάκχαρα, καταναλώνονται από τον μικροοργανισμό σχεδόν σε 48 ώρες. Στα 600rpm, η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων μεταβλήθηκε από την αρχική τιμή των 0.2 g/100ml στην τιμή 0.02 g/100ml σχεδόν σε 24 ώρες.

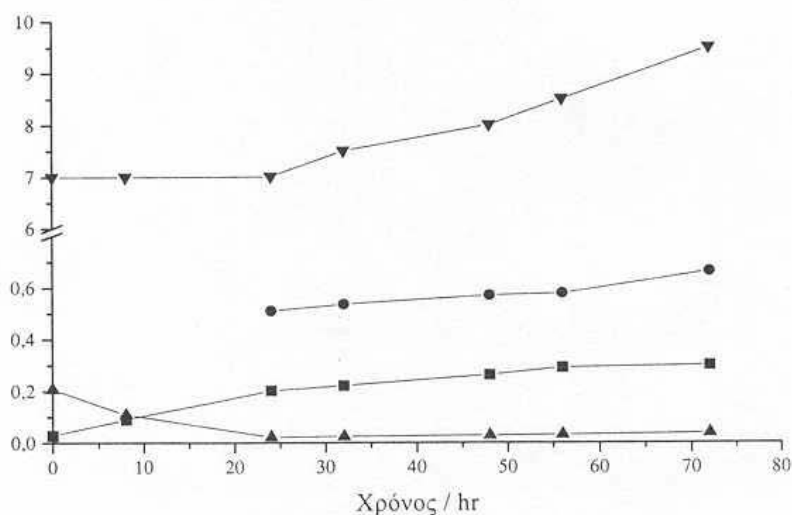
Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρατηρήθηκε αύξηση και στην τιμή του pH. Συγκεκριμένα από την αρχική τιμή 7, παρατηρήθηκε αύξηση στην τιμή 9 (ή 9.5 για την περίπτωση των 600rpm).

Στα Σχήματα 1 και 2 φαίνεται η μεταβολή της συγκέντρωσης της ξανθάνης, βιομάζας και των αναγόντων σακχάρων καθώς και η μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για ρυθμούς ανάδευσης 100rpm και 600rpm αντίστοιχα.

Το MB του πολυσακχαρίτη που ελήφθη με τις παραπάνω συνθήκες υπολογίστηκε στις 5×10^5 σε όλες τις περιπτώσεις και δείχνει ότι δεν υπάρχει εξάρτησή του από το ρυθμό ανάδευσης. Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε πυροσταφυλικό οξύ φαίνεται να επηρεάζεται από το ρυθμό ανάδευσης. Συγκεκριμένα, με αύξηση του ρυθμού ανάδευσης από 100 σε 300 rpm η περιεκτικότητα της ξανθάνης σε πυροσταφυλικό οξύ αυξάνει από 1.54% στα 3.49% αντίστοιχα χωρίς περαιτέρω αύξηση από τα 300rpm στα 600rpm.



Σχήμα 1. Συγκέντρωση βιομάζας (g/100ml) ■, ξανθάνης (g/100ml) ●, αναγόντων σακχάρων (g/100ml) ▲, pH ▼, σε συνάρτηση με το χρόνο για ρυθμό ανάδευσης 100rpm



Σχήμα 2. Συγκέντρωση βιομάζας (g/100ml) ■, ξανθάνης (g/100ml) ●, αναγόντων σακχάρων (g/100ml) ▲, pH ▼, σε συνάρτηση με το χρόνο για ρυθμό ανάδευσης 600rpm

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Moorhouse R., Walkinshaw D. and Arnott S., "Extracellular Microbial Polysaccharides", Acs Symposium Series, Am. Chem. Soc. (1977), p.91.
- [2] Whitfield C., Sutherland I.W. and Cripps R., *J. Gen. Microbiol.* **124**:385 (1981).
- [3] Παπουτσοπούλου Β. Σ., Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη 1996.
- [4] Barbara Katzbaner, *Polymer Degrad. and Stabil.* **59**:81 (1998)
- [5] De Vuyst L. and Vermeire A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**:187 (1994).
- [6] Liakopoulou-Kyriakides M., Tzanakakis E., Kyparissidis C., Ekateriniadou L. and Kyriakides D.A., *Chem. Eng. And Technology* **20**:354 (1997).
- [7] Ekateriniadou L.V., Papoutsopoulou S.V. and Kyriakidis D.A., *Biotechnol. Lett.* **16**:517 (1994).
- [8] Papi R.M., Ekateriniadou L.V., Beletsiotis E., Typas M.A. and Kyriakidis D.A., *Biotechnology Lett.* **21**:39 (1999)
- [9] Liakopoulou-Kyriakides, M., Psomas, S.K. and Kyriakidis, D.A., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **82**:175 (1999)
- [10] Weisz P.B., "The Science of Biology" (1971), p.144
- [11] Moraine R.A. and Rogovin S.P., *Biotechnol. Biong.* **8**:511 (1966).