

PIOTR JANAS, ZDZISŁAW TARGOŃSKI

**WPLYW ŹRÓDŁA WĘGLA I AZOTU NA PRODUKCJĘ KSANTANU
I ENZYMÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH PRZEZ
PENICYLINOOPORNEGO MUTANTA
*XANTHOMONAS CAMPESTRIS***

Streszczenie

Zbadano wpływ źródła węgla i azotu na produkcję ksantanu i enzymów zewnątrzkomórkowych przez penicylinoopornego mutantu *Xanthomonas campestris*. Dobrymi źródłami węgla do produkcji ksantanu były maltodekstryny, sacharoza, glukoza, celobioza, inulina i maltoza. Najwyższe stężenia ksantanu uzyskano po hodowlach w obecności 3% dodatku maltodekstryn i sacharozy. W hodowlach tych oznaczono też wysokie aktywności enzymów zewnątrzkomórkowych (inulinazy, inwertazy, α -amylazy). Najlepszymi źródłami azotu do produkcji ksantanu przez *X. campestris* PPJ4 były: siarczan(VI) amonu i mocznik.

Słowa kluczowe: *Xanthomonas campestris*, ksantan, źródło węgla, źródło azotu, enzymy zewnątrzkomórkowe

Wstęp

Dzięki swoim właściwościom liczne polisacharydy występujące w przyrodzie znalazły szerokie zastosowanie w działalności człowieka. Związki te pozyskiwane są na dużą skalę z surowców roślinnych. Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się też polisacharydy pochodzenia mikrobiologicznego, takie jak ksantan, dekstran czy pululan. Atrakcyjność tych substancji wynika z faktu, że ich wytwarzanie i dostępność nie zależą od warunków zewnętrznych, jak pogoda czy położenie geograficzne.

Badania przeprowadzone w latach 60. XX w. w USA wykazały, że bakterie *Xanthomonas campestris* wyizolowane z kapusty wytwarzają zewnątrzkomórkowy polisacharyd o wyjątkowych właściwościach reologicznych – ksantan, który dzisiaj jest najważniejszym polisacharydem pochodzenia mikrobiologicznego otrzymywanym na skalę przemysłową [15]. Szacuje się, że roczna światowa produkcja gumy ksantanowej

Dr P. Janas, prof. dr hab. Z. Targoński, Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Akademia Rolnicza, ul. Skromna 8, 20-950 Lublin

wynosi około 25000 ton, a popyt na ten polisacharyd na świecie wzrasta o 5–10% rocznie.

Na skalę przemysłową ksantan produkowany jest na drodze tlenowej fermentacji substratu węglowodanowego, który najczęściej stanowią: glukoza, sacharoza, melasa, skrobia oraz jej kwasowe i enzymatyczne hydrolizaty. Podstawowym szczepem produkcyjnym jest obecnie *Xanthomonas campestris* NRRL B1459, który w warunkach przemysłowych wytwarza około 12 g/dm³ ksantanu. Prowadzone są też liczne badania mające na celu zwiększenie ilości wytwarzanego przez bakterie ksantanu, poprawę jego jakości oraz obniżenie kosztów produkcji. Cele te realizowane są poprzez otrzymywanie i izolację nowych wysokoprodukcyjnych szczepów bakterii, jak też optymalizację warunków hodowli np. poprzez zastosowanie nowych alternatywnych źródeł węgla. Już w 1977 r. Kidby i wsp. [5] stwierdzili że wysoko produkcyjne dzikie szczepy *Xanthomonas campestris* cechuje wrażliwość na niektóre antybiotyki. Natomiast pierwsze mutanty odporne na bacytracynę oraz rifampicynę i charakteryzujące się zwiększonymi zdolnościami do produkcji ksantanu otrzymano w latach 80. [7]. U wysoko produkcyjnych mutantów *X. campestris* stwierdzono ponadto zależność między opornością na antybiotyki a zmianami zawartości białek błony komórkowej [10].

Celem przeprowadzonych badań był dobór optymalnego źródła węgla i azotu do produkcji ksantanu i enzymów zewnątrzkomórkowych przez penicylioopornego mutantu *Xanthomonas campestris* PPJ4, otrzymanego po mutagenizacji promieniami UV szczepu *X. campestris* NRRL B-1459

Material i metody badań

Mikroorganizm

Do doświadczeń użyto penicylioopornego mutantu *Xanthomonas campestris* PPJ4 wyizolowanego po mutagenizacji promieniowaniem UV szczepu *Xanthomonas campestris* NRRL B1459 i selekcji na podłożu z dodatkiem penicyliny. Bakterie przechowywano na skosach z podłożem YM o składzie [g/dm³]: glukoza 20, ekstrakt drożdżowy 3, pepton mięsny 5, ekstrakt maltozowy 3, agar 20. Odczyn podłoża doprowadzano do wartości pH 7 przy użyciu 25% roztworu NaOH. Po inkubacji w temp. 30°C przez 72 godz. i wzroście bakterii skosy przechowywano w temp. 4°C. Bakterie przeszczepiano co miesiąc na nowe skosy.

Warunki hodowli

Hodowle bakterii prowadzono w kolbach Erlenmeyera o pojemności 500 cm³ wypełnionych 100 cm³ podłoża, wg Roseiro i wsp.[12], o składzie [g/dm³]: źródło węgla (30), źródło azotu (3,4), H₃BO₃ (0,0072), FeCl₃×6H₂O (0,0042), K₂PO₄ (7,2), CaCO₃ (0,029), MgSO₄×7H₂O (0,24), ZnSO₄×7H₂O (0,006), kwas cytrynowy

(2,0), ekstrakt drożdżowy (0,75), pepton mięsny (0,34). W poszczególnych hodowlach zmieniano jednocześnie tylko źródło węgla lub azotu. W pierwszej części doświadczenia w charakterze źródła azotu stosowano $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($3,4 \text{ g/dm}^3$), natomiast zmieniano rodzaj źródła węgla, które stanowiły: glukoza, sacharoza, maltoza, celobioza, laktoza, karboksymetyloceluloza, fruktoza, maltodekstryny, sorboza, inulina, kwas laktobionowy, ksyloza, ksylan, chityna oraz zmielone bulwy topinamburu (30 g/dm^3).

W drugiej części doświadczenia stałym składnikiem podłoża była glukoza (30 g/dm^3), natomiast zmieniano rodzaj źródła azotu, które stanowiły: siarczan amonowy, fosforan dwuamonowy, fosforan jednoamonowy, chlorek amonu, fluorek amonu, azotan amonu, mocznik, namok kukurydziany ($3,4 \text{ g/dm}^3$).

Wyjściowe pH podłoża ustalano na poziomie pH 7 za pomocą 20% roztworu wodorotlenku sodowego. Kolby z podłożem sterylizowano w autoklawie w temp. 110°C w ciągu 30 min. Po ochłodzeniu kolb z podłożem szczepiono je otrzymanym wcześniej inokulum. Inokulum przygotowywano przez przeniesienie sterylną eżą ze skosów z podłożem YM komórek mutanta *X. campestris* PPJ4 do kolb zawierających podłoże o składzie identycznym z podłożem hodowlanym z dodatkiem 3% glukozy jako źródła węgla. Prowadzono hodowlę mutanta przez 72 godz. na wytrząsarce rotacyjnej (150 obr./min) w temp. 30°C ; 8 cm^3 zawiesiny komórkowej *X. campestris* PPJ4 przenoszono do kolb z podłożem hodowlanym. Kolby umieszczano w temp 30°C na wytrząsarce rotacyjnej, ustawiając obroty na 150 obr./min . Hodowlę prowadzono przez 72 godz. Po tym czasie pobierano próby do analiz.

Precypitacja i oznaczanie stężenia ksantanu

Odwirowane ciecze pohodowlane poddawano precypitacji czystym alkoholem etylowym w stosunku 1:2, w obecności 1% KCl. Roztwory były mieszane przez 2 godz. przy użyciu mieszadła mechanicznego. Następnie pozostawiano je na 12 godz. w temp. pokojowej. Wytrącony ksantan sączono przez wcześniej zważoną tkaninę filtracyjną Mirocloth (Calbiochem – Szwajcaria). Oddzielony na tkaninie filtracyjnej ksantan suszono w temp. 80°C przez 4 godz.

Oznaczanie suchej masy komórek

Ciecze pohodowlane wirowano przy $20000 \times g$ przez 30 min. Odwirowaną biomasę przenoszono ilościowo na wcześniej zważone sączki filtracyjne i przemywano niewielką ilością wody destylowanej. Sączki z biomasą suszono w temp. 110°C do uzyskania stałej masy.

Oznaczanie aktywności enzymatycznych

W celu oznaczania aktywności α -amylazy sporządzano 1% roztwór skrobi w $22,5 \text{ mM}$ buforze fosforanowym o pH 7,2. Do $0,8 \text{ cm}^3$ roztworu skrobi dodawano $0,2 \text{ cm}^3$ płynu pohodowlanego i inkubowano przez 1 godz. w temp. 37°C . Ilość uwolnionych

cukrów redukujących oznaczano metodą kolorymetryczną przy użyciu odczynnika zawierającego kwas 3,5-dwunitrosalicylowy (DNS) po pomiarze absorpcji próby wobec odczynnikowej próby kontrolnej. Za jednostkę aktywności α -amylazy przyjęto taką ilość enzymu, która uwalnia 1 μmol cukrów redukujących w ciągu 1 min w warunkach reakcji.

Do oznaczania aktywności inwertazy sporządzano 3,4% roztwór sacharozy w 0,1 M buforze Mc Ilwaine'a o pH 6. Do 0,5 cm^3 roztworu sacharozy dodawano 0,5 cm^3 płynu pohodowlanego i inkubowano przez 30 min. w temp 55°C. Ilość uwolnionych cukrów redukujących oznaczano metodą kolorymetryczną przy użyciu odczynnika zawierającego kwas 3,5-dwunitrosalicylowy (DNS) po pomiarze absorpcji próby wobec odczynnikowej próby kontrolnej. Za jednostkę aktywności inwertazy przyjęto taką ilość enzymu, która uwalnia 1 μmol cukrów redukujących w ciągu 1 min w warunkach reakcji.

W celu oznaczenia aktywności inulinazy sporządzano 2% roztwór inuliny w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7. Do 0,8 cm^3 roztworu inuliny dodawano 0,2 cm^3 płynu pohodowlanego i inkubowano przez 1 godz. w temp 45°C. Ilość uwolnionych cukrów redukujących oznaczano metodą kolorymetryczną przy użyciu odczynnika zawierającego kwas 3,5-dwunitrosalicylowy (DNS) po pomiarze absorpcji próby wobec kontroli odczynnikowej. Za jednostkę aktywności inulinazy przyjęto taką ilość enzymu, która uwalnia 1 μmol cukrów redukujących w ciągu 1 min w warunkach reakcji.

Do oznaczania aktywności β -galaktozydazy sporządzano 0,01 M roztwór β -o-nitrofenylogalaktozydu (β -nifegalu). Do 0,5 cm^3 roztworu β -nifegalu dodawano 3,5 cm^3 0,1 M buforu Z (bufor fosforanowy z 1% dodatkiem KCl) o pH 7 i 1 cm^3 filtratu pohodowlanego i inkubowano przez 30 min w temp. 30°C. Reakcję przerywano przez dodatek do mieszaniny reagującej 1 cm^3 1 M roztworu węgla sodu. Następnie dodawano 10 cm^3 wody destylowanej. Pomiaru ekstynkcji dokonywano przy długości fali 420 nm wobec próby odczynnikowej. Za jednostkę aktywności enzymu przyjęto zmianę ekstynkcji mieszaniny reagującej w ciągu 1 min w 1 cm^3 filtratu pohodowlanego.

Wyniki i dyskusja

Najwyższe stężenie ksantanu oznaczono w filtratach po hodowlach na podłożach zawierających jako źródło węgla: maltodekstryny (25,48 g/dm^3), sacharozę (23,73 g/dm^3), glukozę (21,32 g/dm^3), celobiozę (20,00 g/dm^3), maltozę (15,33 g/dm^3), inulinę (16,66 g/dm^3) oraz topinambur (9,6 g/dm^3) (tab. 1).

Stwierdzono, że źródłem węgla najbardziej stymulująco wpływającym na efektywny wzrost komórek bakterii był kwas laktobionowy (4,208 g/dm^3) i sacharoza (1,6 g/cm^3). Wykorzystując ten pierwszy substrat otrzymano jednak niskie stężenia ksantanu (4,73 g/dm^3). W przypadku sacharozy wysoki plon biomasy był skorelowany z ilością otrzymanego ksantanu.

Tabela 1

Stężenia ksantanu oraz plony biomasy otrzymane po hodowli *Xanthomonas campestris* PPJ4 na podłożach zawierających różne źródła węgla.

Concentration of xanthan gum and biomass obtained after cultivation of *Xanthomonas campestris* PPJ 4 on the medium containing different source of carbon.

Źródło węgla Source of carbon	Stężenie ksantanu [g/dm ³] Concentration of xanthan gum [g/dm ³]	Plon biomasy [g/dm ³] Biomass [g/dm ³]
Glukoza Glucose	21,32	0,667
Sacharoza Sucrose	23,73	1,6
Maltoza Maltose	15,33	0,85
Celobioza Celbiose	20,00	0,65
Laktoza Lactose	7,80	0,04
Fruktoza Fructose	9,00	0,24
Maltodekstryny Maltodextrin	25,48	0,12
Sorboza Sorbose	5,00	0,04
Inulina Inulin	16,66	0,16
Kwas laktobionowy Lactobionic acid	4,73	4,208
Ksyloza Xylose	8,26	0,459
Chityna Chitin	3,93	1,467
Topinambur Yerusalem artichoke	9,75	0,07

Stosunkowo dużą koncentracją biomasy (0,85 g/dm³) charakteryzował się płyn z hodowli, w której źródłem węgla była maltoza. Najniższy plon biomasy (0,04 g/dm³) oznaczono po hodowli na podłożu zawierającym laktozę jako źródło węgla. Najwyższą aktywnością inulinazy (tab. 2) charakteryzowały się filtry otrzymane po hodowli z wykorzystaniem ksylozy (0,6318 μmol/cm³×min), sorbozy (0,3729 μmol/dm³×min), topinamburu (0,2060 μmol/cm³×min), maltodekstryn (0,1275 μmol/cm³×min) oraz

fruktozy ($0,1263 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) jako źródeł węgla. Stwierdzono natomiast niską aktywność inulinazy ($0,0555 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) w filtracie otrzymanym po hodowli w obecności inuliny.

Najwyższe aktywności inwertazy oznaczono w filtratach otrzymanych po hodowlach w obecności maltodekstryn ($0,391 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$), celobiozy ($0,2243 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) oraz sacharozy ($0,2032 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$). W filtratach otrzymanych po pozostałych hodowlach aktywności tego enzymu były niskie (tab. 2).

Najwyższą aktywność α -amylazy stwierdzono w filtratach po hodowlach na maltodekstrynach ($2,4087 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$), ksylozie ($1,7263 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$), celobiozie ($1,1585 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) oraz fruktozie ($1,0211 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$). Najniższą aktywnością α -amylazy charakteryzowały się filtry z hodowli prowadzonych z wykorzystaniem glukozy ($0,0841 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) i kwasu laktobionowego ($0,088 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) jako źródeł węgla. W pozostałych filtratach pochodzących aktywność α -amylazy była zbliżona i wahała się w granicach od $0,1781 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$ w przypadku sorbozy do $0,2891 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$ - laktozy (tab. 2).

Najwyższą aktywnością β -galaktozydazy charakteryzowały się filtry z hodowli w obecności maltodekstryn ($0,01687 \text{ U}/\text{cm}^3$), inuliny ($0,01413 \text{ U}/\text{cm}^3$) i sacharozy ($0,01347 \text{ U}/\text{cm}^3$). Najniższą aktywność tego enzymu stwierdzono w filtracie otrzymanym z hodowli prowadzonej na kwasie laktobionowym ($0,00077 \text{ U}/\text{cm}^3$). Niską aktywność β -galaktozydazy ($0,001567 \text{ U}/\text{cm}^3$) oznaczono też w filtracie z hodowli w obecności laktozy jako źródła węgla (tab. 2).

Kolejnym etapem pracy było zbadanie wpływu źródła azotu na produkcję ksantanu i enzymów przez *Xanthomonas campestris* PPJ4. W doświadczeniu tym hodowle prowadzono przy zastosowaniu różnych źródeł azotu i w obecności jednego źródła węgla, którym była glukoza (tab. 3 i 4).

W porównaniu ze stężeniem ksantanu ($21,32 \text{ g}/\text{dm}^3$) otrzymanym po hodowli z zastosowaniem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ żadne inne źródło azotu nie spowodowało wzrostu produkcji ksantanu przez szczep *Xanthomonas campestris* PPJ4. Zbliżone stężenie ksantanu ($21,47 \text{ g}/\text{dm}^3$) oznaczono tylko po hodowli z zastosowaniem mocznika jako źródła azotu. Najniższe stężenie ksantanu ($10,33 \text{ g}/\text{dm}^3$) stwierdzono w filtratach po hodowli z zastosowaniem NH_4F (tab. 3).

Najwyższy plon biomasy ($0,667 \text{ g}/\text{dm}^3$) oznaczono po hodowli w obecności $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jako źródła azotu. Po zastosowaniu NH_4NO_3 i $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ uzyskano o $0,2 \text{ g}/\text{dm}^3$ niższe plony biomasy (tab. 3).

Jak przedstawiono w tab. 4., najwyższą aktywność inulinazy i inwertazy (odpowiednio, $0,5762$ i $0,4609 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) stwierdzono w filtratach po hodowli z wykorzystaniem NH_4F jako źródła azotu. Nie stwierdzono aktywności tych enzymów w filtratach po hodowli prowadzonej na podłożu zawierającym $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_3$.

Tabela 2

Produkcja enzymów zewnątrzkomórkowych przez *Xanthomonas campestris* PPJ4, determinowana różnymi źródłami węgla.

Effect of different carbon sources on the production of extracellular enzymes by *Xanthomonas campestris* PPJ4.

Źródło węgla Source of carbon	Aktywność enzymatyczna Enzymatic activitie			
	Inulinaza [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3\text{min}$] inulinase [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3\text{min}$]	Inwertaza [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3\text{min}$] Invertase [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3\text{min}$]	α -amylaza [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3\text{min}$] α -amylase [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3\text{min}$]	β -galaktozydaza [U/ cm^3] β -galactosidase [U/ cm^3]
Glukoza Glucose	0,0127	0,0102	0,0841	0,003267
Sacharoza Sucrose	0,1065	0,2032	0,2604	0,013470
Maltoza Maltose	0,0233	0,0000	0,2082	0,007070
Celobioza Celobiose	0,0000	0,2243	1,1589	0,003133
Laktoza Lactose	0,0338	0,0000	0,2891	0,001567
Fruktoza Fructose	0,1263	0,0000	0,2110	0,004233
Maltodekstryny Maltodextrin	0,1275	0,3910	2,4870	0,016870
Sorboza Sorbose	0,3729	0,0000	0,1781	0,004367
Inulina Inulin	0,0555	0,0357	0,2539	0,014130
Kwas laktobionowy Lactobionic acid	0,0000	0,0000	0,0880	0,000770
Ksyloza Xylose	0,6318	0,0000	1,7263	0,005
Chityna Chitin	0,0420	0,0000	0,2154	0,0011
Topinambur Yerusalem artichoke	0,2060	0,0931	0,1840	0,0018

Tabela 3

Stężenia ksantanu oraz plony biomasy otrzymane po hodowli *Xanthomonas campestris* PPJ4 na podłożach zawierających różne źródła azotu.

Concentration of xanthan gum and biomass obtained after cultivation of *Xanthomonas campestris* PPJ 4 on the medium containing different source of nitrogen.

Źródło azotu Source of nitrogen	Stężenie ksantanu [g/dm ³] Concentration of xanthan gum [g/dm ³]	Plon biomasy [g/dm ³] Biomass [g/dm ³]
(NH ₄) ₂ SO ₄	21,32	0,667
(NH ₄) ₂ HPO ₄	16,52	0,334
NH ₄ H ₂ PO ₄	18,30	0,467
NH ₄ Cl	16,13	0,134
NH ₄ F	10,33	0,08
Namok kukurydziany Corn steep liquor	15,47	0,334
NH ₄ NO ₃	13,46	0,467
Mocznik Urea	21,47	0,2

Najwyższą aktywnością α -amylazy charakteryzowały się filtry otrzymane po hodowli z zastosowaniem NH₄NO₃ (0,8429 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) i mocznika (0,741 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$). Najniższą aktywność tego enzymu (0,004 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) oznaczono w filtracie pochodzącym z hodowli z wykorzystaniem NH₄H₂PO₃ jako źródła azotu.

Najwyższą aktywność β -galaktozydazy (0,011267 U/cm³) oznaczono w filtracie uzyskanym po hodowli prowadzonej na podłożu zawierającym (NH₄)₂HPO₃, a najniższą (0,002733 U/cm³) w filtracie po hodowli z zastosowaniem NH₄F jako źródła azotu (tab. 4).

W przeprowadzonych w pracy badaniach podjęto próbę określenia optymalnych warunków hodowli do produkcji ksantanu przez penicylioopornego mutantu *Xanthomonas campestris* PPJ4. Leela i Sharma [6] stwierdzili, że najlepszym źródłem węgla do produkcji ksantanu przez szczepy *Xanthomonas campestris* są: glukoza, sacharoza, maltoza i skrobia. Najwyższe stężenie (14,744 g/dm³) ksantanu wytwarzanego przez *Xanthomonas campestris* GK6 otrzymali oni, stosując glukozę i nieco niższe stężenie (13,234 g/dm³) w przypadku sacharozy jako źródła węgla. Shou i Demain [13] donoszą jednak, że sacharoza jest lepszym substratem do produkcji ksantanu niż glukoza, co potwierdzają również wyniki otrzymane w tej pracy.

Ważnym czynnikiem wpływającym na syntezę polisacharydów przez drobno-ustroje jest stężenie źródła węgla w podłożu produkcyjnym. Najwyższe wydajności produkcji ksantanu przez bakterie *Xanthomonas campestris* uzyskano stosując stężenia

glukozy w zakresie 1-5% [5]. Rogovin i wsp. [11] informują, że stosując 1% dodatek glukozy do podłoża hodowlanego otrzymano prawie całkowitą jej konwersję (90%) do polisacharydu. Abd El-Salam i wsp. [1], stosując melasę z buraków cukrowych jako substrat do produkcji ksantanu, uzyskali najwyższe stężenie polisacharydu ($41,3 \text{ g/dm}^3$) przy 25% stężeniu substratu, natomiast najwyższą wydajność procesu (92%) uzyskali przy jego 2% stężeniu.

Tabela 4

Produkcja enzymów zewnątrzkomórkowych przez *Xanthomonas campestris* PPJ4, determinowana różnymi źródłami azotu.

Effect of different nitrogen sources on the production of extracellular enzymes by *Xanthomonas campestris* PPJ4.

Źródło azotu Source of nitrogen	Aktywność enzymatyczna Enzymatic activities			
	inulinaza [$\mu\text{mol/cm}^3\text{min}$]	invertaza [$\mu\text{mol/cm}^3\text{min}$]	α -amylaza [$\mu\text{mol/cm}^3\text{min}$]	β -galaktozydaza [U/ cm^3]
	inulinase [$\mu\text{mol/cm}^3\text{min}$]	invertase [$\mu\text{mol/cm}^3\text{min}$]	α -amylase [$\mu\text{mol/cm}^3\text{min}$]	β -galactosidase [U/ cm^3]
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,0127	0,0102	0,0841	0,003267
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,1673	0,1339	0,0932	0,011267
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,0000	0,000	0,004	0,003467
NH ₄ Cl	0,1697	0,1357	0,2291	0,008267
NH ₄ F	0,5726	0,4609	0,4798	0,002733
Namok kukurydziany Corn steep liquor	0,3208	0,2566	0,1540	0,004600
NH ₄ NO ₃	0,1076	0,0861	0,8429	0,002933
Mocznik Urea	0,2142	0,1714	0,7410	0,005267

Wymienione wcześniej źródła węgla są powszechnie stosowane do produkcji ksantanu. Obecnie trwają też badania nad wykorzystaniem innych, tańszych źródeł węgla np. korzeni cykorii, zawierających inulinę czy serwatki, zawierającej laktozę. Park i wsp. [8] wykazali, że szczep *Xanthomonas* sp. jest w stanie wytwarzać w odpowiednich warunkach zewnątrzkomórkową inulinazę o wysokiej aktywności (20 U/ml). Wynik ten osiągnęli, przeprowadzając hodowlę *Xanthomonas* sp. na podłożu zawierającym odpowiednio przygotowane korzenie cykorii jako źródło węgla w ilości 5 g/dm^3 . W badaniach tych nie oznaczano jednak ilości wytwarzanego ksantanu, ale wysoka aktywność inulinazy sugeruje możliwość wykorzystania niektórych substratów zawierających inulinę do produkcji gumy ksantanowej przez szczepy z rodzaju *Xanthomonas*. Niski poziom aktywności β -galaktozydazy wydzielanej do podłoża podczas ho-

dowli *Xanthomonas campestris* uniemożliwia wykorzystanie laktozy oraz serwatki jako substratów do produkcji ksantanu przez bakterie. Frank i Somkui [2] oczyszczili β -galaktozydazę produkowaną przez *Xanthomonas campestris*. Enzym ten wykazywał najwyższą aktywność w temp. 32 – 37°C i pH 5,5 – 5,8 oraz charakteryzował się niskim powinowactwem w stosunku do substratu – laktozy. Od początku lat 80. XX w. podejmowane były próby izolacji szczepów *Xanthomonas campestris* o uzdolnieniach do rozkładu laktozy. Zastosowano również techniki inżynierii genetycznej do konstrukcji transformantów *Xanthomonas campestris* zawierających geny kodujące β -galaktozydazę z *E. coli*. Fu i Tseng [3] otrzymali transformanta *Xanthomonas campestris* przy użyciu plazmidu ekspresyjnego zawierającego gen kodujący β -galaktozydazę z *E. coli* pod kontrolą promotora fagowego. Otrzymany transformant produkował ksantan w podobnych stężeniach podczas hodowli na serwatce oraz na podłożach zawierających laktozę i glukozę, jako źródło węgla. Tang i wsp. [14] udowodnili, że synteza ksantanu i niektórych enzymów np. α -amylazy jest skorelowana. Hu i wsp. [4] otrzymali α -amylazę produkowaną przez *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. Białko to było wydzielane przez bakterie podczas hodowli na podłożu z glukozą lub maltozą jako źródłem węgla. Badacze ci wyizolowali z biblioteki faga λ gen kodujący α -amylazę z tej bakterii zlokalizowany na fragmencie DNA o długości 27 kb. Na podstawie sekwencji nukleotydowej określono sekwencję białka α -amylazy zbudowaną z 475 aminokwasów zawierającą sekwencję sygnałową zbudowaną z 35 aminokwasów. Stwierdzono bardzo słabą sekrecję α -amylazy z *Xanthomonas campestris* w *E. coli* pod kontrolą jej własnego promotora. Enzym ekspresyjny w *E. coli* gromadził się w przestrzeni periplazmatycznej.

Quader i Baig [9], badając szczep *Xanthomonas campestris* NRRL 1459 wykazali, że najbardziej efektywnym źródłem azotu do produkcji ksantanu jest $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Jednakże Abd El-Salam i wsp. [1] wykazali niską przydatność tej soli jako źródła azotu do produkcji ksantanu przez szczep *Xanthomonas campestris* E-NRC-3. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzili oni, że najbardziej efektywnymi źródłami azotu do produkcji polisacharydu są: NH_4Cl , NH_4NO_3 oraz mocznik i namok kukurydziany. Otrzymali oni wyższe stężenie ksantanu, stosując podczas hodowli bakterii $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ w porównaniu z $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ jako źródem azotu. Zależność taką zaobserwowano w doświadczeniu prowadzonym w tej pracy.

Wnioski

1. Penicyliinooporny mutant *Xanthomonas campestris* PPJ4 charakteryzował się wysoką produkcją ksantanu w czasie hodowli w obecności szerokiego spektrum źródeł węgla. Dobrymi źródłami węgla do produkcji ksantanu przez mutantą PPJ4 były: maltodekstryny, sacharoza, glukoza, celobioza, inulina i maltoza. Dobrym substratem do produkcji polimeru okazały się też rozdrobnione bulwy topinamburu.

- Najwyższe stężenia ksantanu oznaczono po hodowlach w obecności 3% dodatku maltodekstryn i sacharozy.
2. Stwierdzono wysokie aktywności enzymów zewnątrzkomórkowych (inulinazy, inwertazy, α -amylazy) wydzielanych do podłoża przez mutanta *Xanthomonas campestris* PPJ4 podczas hodowli w obecności tych źródeł węgla.
 3. Najlepszym źródłem azotu do produkcji ksantanu przez *Xanthomonas campestris* PPJ4 były: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i mocznik.
 4. Badany mutant produkował niewielkie ilości ksantanu w hodowlach na podłożu zawierającym laktozę jako źródło węgla. Powodem tego była niska aktywność enzymu – β -galaktozydazy wydzielanego przez ten szczep bakterii.

Literatura

- [1] Abd El – Salam M. H., Fadel M. A., Murad H. A.: Bioconversion of sugarcane molasses into xanthan gum. J. Biotechnol., 1994, **33**, 103-106.
- [2] Frank J.F., Somkuti G.A.: General properties of β -galactosidase of *Xanthomonas campestris*. Appl. Environ. Microbiol., 1979, **38**, 554-558.
- [3] Fu J. F., Tseng Y. H.: Construction of lactose – utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56**, 919-923.
- [4] Hu N.T., Hung H.N., Huang A.M., Tsai H.F., Yang B.Y., Chow T.Y. and Tseng Y.H.: Molecular cloning, characterization and nucleotide sequence of the gene for secreted α -amylase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, J. Gen. Microbiol., 1992, **138**, 1647-1655.
- [5] Kidby D., Herman A., Cadmus M., Maintenance procedures for the curtailment of genetic instabilities in *Xanthomonas campestris* NRRL E-1459, Appl. Environ. Microbiol., 1977, **33**, 840-845.
- [6] Leela J.K., Sharma G.: Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. Biopr. Eng., 2000, **23**, 687-689.
- [7] Marquett M., Mikołajczyk M., Thorne, Pollock T.J.: Improved strains for production of xanthan gum by fermentation of *Xanthomonas campestris*. J. Ind. Microbiol. 1989, **4**, 53-64.
- [8] Park J.P., Yun J.W.: Utilization of chicory roots for microbial endoinulinase production. Lett. in Appl. Microbiol., 2001, **33**, 183-187.
- [9] Quader M.A., Baig S.: Effect of nitrogen source on the production of extracellular polysaccharide by *Xanthomonas campestris* NRRL B 1459. Science Int., 1989, **14**, 262-264.
- [10] Rodriguez H., Aguilar L., Lao M.: Variations in xanthan production by antibiotic-resistant mutants of *Xanthomonas campestris*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997, **48**, 626-629.
- [11] Rogowin S.P., Anderson R.F., Cadmus M.C.: Production of polysaccharide with *Xanthomonas campestris*. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng., 1961, **111**, 51-63.
- [12] Roseiro J.C., Esgalhado M.E., Amaral Collaco M.T., Emery A.N.: Medium development for xanthan production. Proc. Biochem., 1991, **27**, 167-175.
- [13] Souw P., Demain A.L.: Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. Appl. Env. Microbiol., 1979, **37**, 1186-1192.
- [14] Tang J.L., Gough C.L., Daniels T.L.: Cloning of genes involved in negative regulation of production of extracellular enzymes and polysaccharide of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol. Gen. Genet., 1990, **222**, 157-160.
- [15] Udeh K.O., Janas P., Grobelski M.: Microbial synthesis of xanthan gum and application. Biotechnology, 2002, **57**, 113-129.

THE INFLUENCE OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON THE PRODUCTION OF XANTHAN GUM AND EXTRACELLULAR ENZYMES BY PENICILINERESISTANT MUTANT OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*

S u m m a r y

The influence of carbon and nitrogen sources on the production of xanthan gum and extracellular enzymes by penicilineresistant mutant of *Xanthomonas campestris* was investigated. The good carbon sources for xanthan production were maltodextrin, sucrose, glucose, celobiose, inulin and maltose. The highest xanthan concentration was obtained after cultivations in the presence of 3% addition of maltodextrin and sucrose. Also, the high activities of extracellular enzymes (inulinase, invertase, α – amylase) were estimated in the media. The best nitrogen sources for xanthan production by *X. campestris* were $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and urea.

Key words: *Xanthomonas campestris*, xanthan, carbon source, nitrogen source, extracellular enzymes ☒