

Production of Xanthan Gum by the Native Strain of *Xanthomonas Citri* in Whey Medium and Evaluation of its Physicochemical Properties

Moravej, Roya

PhD student of biology, science and research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, microbiology.m@gmail.com

Alavi, Seyed Mehdi

Assistant professor of Plant cellular and molecular biology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran .

mealavi@nigeb.ac.ir

azin, mehrdad*

Associate professor of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran .

mehrdadazin01@gmail.com

salmanian, ali hatf

Associate professor of Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran .salman@nigeb.ac.ir

Abstract

Introduction: Xanthan is an extracellular polysaccharide produced by *Xanthomonas* genus. Because of high viscosity and other properties, this gum is used in various industries. Hence, the use of cheap carbon sources such as whey can be economically feasible to produce Xanthan gum with positive lactose strains of *Xanthomonas*.

Materials and methods: In this study, the native strain of *Xanthomonas citri* 386 was used to produce xanthan gum in cheese whey medium. The strain was cultured in a yeast extract lactose broth (YL) and then inoculated into production medium, the fermentation process was investigated in 5 days' time in terms of production variables such as growth, consumption of lactose, viscosity and amount of xanthan. The content of pyruvate and acetate of product were compared with standard xanthan and the FTIR method was used to determine the functional groups.

Results: The utilized strain had the ability to use lactose in cheese whey. At the end of the fermentation process, the amount and viscosity of xanthan were estimated to be 20.3 g/L and 2066.5 centipoise, respectively. The acetate and pyruvate content was acceptable in comparison with standard xanthan, and the FTIR study confirmed the position of the functional groups of the xanthan structure.

Conclusion: In this study, for the first time, the native isolate of *Xanthomonas citri* 386 was evaluated for the production of xanthan in whey. This strain showed high potential for lactose consumption in whey and produced a significant amount of xanthan with an optimum viscosity. Therefore, at an industrial scale, the use of this native isolate, can be suitable for the production of xanthan by low-priced whey medium.

Key words: Xanthan Gum, *Xanthomonas citri*, Cheese Whey, Acetate and Pyruvate.

* Corresponding author

Received: December 31, 2018 / **Accepted:** May 25, 2019

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۳۰، تابستان ۱۳۹۸، صفحه: ۷۹-۶۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۰۴

تولید صمغ زانتان توسط سویه بومی باکتری *زانتوموناس سیتیری* در محیط آب پنیر و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن

رویا مروج: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، microbiology.m@gmail.com
سیدمهدی علوی: استادیار زیست‌شناسی سلولی و مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران، mealavi@nigeb.ac.ir
مهرداد آذین*: دانشیار بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، azin@irost.ir
علی هاتف سلمانیان: دانشیار بیوتکنولوژی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران، salman@nigeb.ac.ir

چکیده

مقدمه: زانتان، پلی‌ساکاریدی خارج‌سلولیسیت که باکتری *زانتوموناس* آن را تولید می‌کند. این صمغ به علت ویسکوزیته زیاد و دیگر ویژگی‌های منحصربه‌فرد در صنایع مختلف کاربرد دارد؛ از این رو، استفاده از منابع کربنی ارزان‌قیمت مانند آب پنیر برای تولید صمغ زانتان توسط سویه‌های لاکتوز مثبت باکتری *زانتوموناس* از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، سویه بومی باکتری *زانتوموناس سیتیری* ۳۸۶ برای تولید صمغ زانتان در محیط آب پنیر استفاده شد. سویه مدنظر در محیط حاوی عصاره مخمر و قند لاکتوز (YL) کشت و سپس به محیط تولید دارای آب پنیر تلقیح شد. فرایند تخمیر طی مدت پنج شبانه‌روز از نظر متغیرهای تولید نظیر رشد، مصرف قند لاکتوز، ویسکوزیته و مقدار وزنی زانتان بررسی شد. محتوای پیرووات و اسات زانتان تولیدشده با زانتان استاندارد مقایسه و برای تعیین گروه‌های عاملی از روش طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR) استفاده شد.

نتایج: سویه استفاده‌شده قابلیت مصرف لاکتوز را در محیط آب پنیر داشت. در انتهای فرایند تخمیر، مقدار ویسکوزیته زانتان به ترتیب ۲۰/۳ گرم بر لیتر و ۲۰۶۶/۵ سانتی‌پواز برآورد شد. محصول زانتان، محتوای اسات و پیرووات درخور توجهی در مقایسه با زانتان استاندارد داشت و بررسی FTIR موقعیت گروه‌های عاملی ساختار زانتان به دست آمده را تأیید کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر برای نخستین بار، سویه بومی *زانتوموناس سیتیری* ۳۸۶ برای تولید زانتان در محیط آب پنیر ارزیابی شد. این سویه توانایی زیادی برای مصرف قند لاکتوز در محیط آب پنیر نشان داد و مقدار درخور توجهی زانتان با ویسکوزیته مطلوب تولید کرد؛ بنابراین، استفاده از این سویه بومی برای تولید زانتان در محیط ارزان‌قیمت آب پنیر در مقیاس صنعتی مناسب است.

واژه‌های کلیدی: صمغ زانتان، *زانتوموناس سیتیری*، آب پنیر، اسات و پیرووات

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

صمغ زانتان، پلیمر تجزیه‌پذیر است که نخستین بار، دانشمندان آمریکایی در سال ۱۹۵۰ آن را کشف کردند. باکتری زانتوموناس^۱ بیماری‌زای گیاهی از خانواده زانتوموناداسه^۲ این صمغ را طی فرایند تخمیر تولید می‌کند (۱). از میان همه صمغ‌های میکروبی، ویژگی‌های منحصر به فرد زانتان مانند درجه بالای الاستیسیته کاذب و ویسکوزیته، حلالیت در آب و پایداری موجب شده‌اند همواره تقاضا برای تولید انبوه آن در جهان مطرح باشد و سهم زیادی را در بازار تجاری به خود اختصاص دهد. این پلیمر زیستی کاربرد گسترده‌ای در صنایع بهداشتی - آرایشی، غذایی، نساجی و نفتی دارد (۲-۴). ساختار زانتان متشکل از اسکلتی سلولزی با شاخه‌های جانبی قند دی‌مانوز، دی‌گلوکورونیک‌اسید و دی‌مانوز انتهایی است و گروه‌های استیل و پیروویل به نسبت‌های مختلف به زنجیره جانبی متصلند؛ این امر موجب ویژگی‌های روانه‌شناسی متفاوت در محلول‌های زانتان شده است (۵ و ۶). زانتان بسته به مقدار جایگزینی واحدهای استیل و پیروویل در زنجیره جانبی می‌تواند وزن مولکولی متفاوتی داشته باشد (۷). عموماً ۶۶ تا ۸۸ درصد و ۵ تا ۲۱ درصد مانوز خارجی در زنجیره جانبی زانتان به ترتیب پیروویله و استیله شده است (۸). پژوهش‌های انجام‌شده روی باکتری زانتوموناس کمپستریس^۳، آن را سویه‌ای مطرح در صنعت تولید زانتان معرفی کرده‌اند (۱)؛ با وجود این، گزارش‌های محدودی درباره تولید زانتان توسط سویه‌های بومی مانند زانتوموناس سیتیری^۴ وجود دارند. عموماً برای تولید زانتان از مواد کربنی نظیر گلوکز، ساکارز و نشاسته استفاده می‌شود (۷).

آب‌پنیر، فراورده جانبی کارخانه‌های لبنی و شامل ۴ تا ۵ درصد لاکتوز، ۰/۸ تا ۱ درصد پروتئین و مقادیر کمی اسیدهای آلی است که دورریختن آن موجب نگرانی‌هایی درباره محیط‌زیست شده است (۹)؛ از این رو، به‌منظور غلبه بر مشکلات ناشی از دفع و نفوذ آن به آب‌های زیرزمینی می‌توان آب‌پنیر را برای تولید فراورده‌های زیستی مانند اتانول، متانول، پروتئین مخمری، لاکتات، استات و حتی زانتان استفاده کرد (۱۰)، از سویی به‌علت میزان بیان کم و در برخی موارد نقص آنزیم بتاگالاکتوزیداز در باکتری‌های جنس زانتوموناس، استفاده از لاکتوز به‌عنوان منبع کربن در محیط‌های کشت امکان‌پذیر نیست (۱۱)؛ از این رو، بدیهی است دستیابی به سویه‌های لاکتوز مثبت طبیعی یا دست‌ورزی ژنتیکی سویه‌های تجاری برای کسب قابلیت رشد در محیط‌های لاکتوزی و بهره‌مندی از ضایعات صنایع غذایی (مانند آب‌پنیر) در تولید زانتان می‌تواند مزیت نسبی مطلوبی از نظر اقتصادی داشته باشد (۹ و ۱۲)؛ بنابراین، استفاده از آب‌پنیر به‌عنوان منبع غذایی کربنی برای تولید صمغ زانتان توسط سویه‌های مصرف‌کننده لاکتوز باکتری زانتوموناس همواره مدنظر پژوهشگران بوده است (۹). در مطالعه حاضر، قابلیت تولید و ویژگی‌های کیفی و کمی صمغ زانتان با استفاده از محیط آب‌پنیر و سویه بومی زانتوموناس سیتیری زیرگونه سیتیری ارزیابی شد. پیش‌از این، پژوهشگران پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری این سویه را از مرکبات جنوب ایران جدا و با عنوان *Xci/386* X. citri/ NIGEB-386 نام‌گذاری کرده‌اند.

مواد و روش‌ها

کشت و نگهداری باکتری: سویه بومی Xci/NIGEB-386 از بخش ذخایر میکروبی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری^۵ (NIGEB) تهیه شد. به منظور تهیه پیش کشت، لوپ باکتری در محیط مایع Yeast Lactose شامل ۵ گرم برلیتر عصاره مخمر، ۵ گرم برلیتر پیتون کازین و ۷ گرم برلیتر لاکتوز کشت داده شد (۱ و ۵)؛ برای تلقیح از سلول‌های باکتریایی ای استفاده شد که در مرحله نمایی رشد قرار داشتند. به منظور نگهداری طولانی مدت باکتری، سوسپانسیون باکتری در محیط یادشده حاوی ۲۰ درصد گلیسرول تهیه و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۸).

محیط تولید زانتان: پودر آب پنیر کارخانه پگاه تهران به عنوان منبع کربن استفاده شد. پروتئین‌های آب پنیر در اثر حرارت دلمه می‌شوند و در فرایند تولید استخراج زانتان مشکل ایجاد می‌کنند؛ در نتیجه، محیط تولید باید عاری از این پروتئین‌ها باشد. به منظور جداسازی پروتئین‌های آب پنیر از روش تیمار حرارتی استفاده شد؛ به این ترتیب که ۶۰ گرم پودر آب پنیر در ۱ لیتر آب حل و به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد، محلول پس از صاف شدن دوباره ۱۰ دقیقه جوشانده و سپس سانتریفیوژ شد و در نهایت از محیط نیمه شفاف رویی به عنوان محیط پایه آب پنیر استفاده شد (۱۳ و ۱۴). محیط تولید آب پنیر از ترکیب ۱ لیتر آب پنیر تیمار شده، ۲/۲ گرم برلیتر پودر عصاره خیسانده ذرت^۱ (منبع نیتروژن) و محلول‌های نمکی طبق جدول ۱ ساخته و اسیدیته نهایی محیط معادل ۷ در نظر گرفته شد. مقدار تلقیح پیش کشت برای فرایند تخمیر، ۱۰ درصد (حجمی/حجمی) در نظر گرفته شد و محیط‌ها به مدت

پنج شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با دور ۱۸۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند (۱ و ۱۵).

جدول ۱- محلول‌های نمکی لازم برای ساخت محیط تولید زانتان

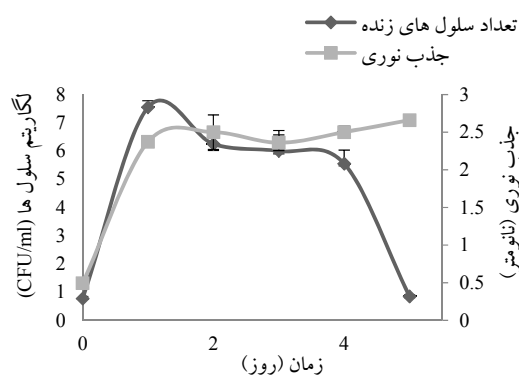
ترکیبات	مقدار (گرم برلیتر)
K ₂ HPO ₄	۰/۷
KH ₂ PO ₄	۰/۲
(NH ₄) ₂ SO ₄	۰/۸
MgCl ₂ 6H ₂ O	۰/۱
FeSO ₄ 7H ₂ O	۰/۰۱
MnCl ₂	۰/۰۰۱

استخراج زانتان: پس از اتمام فرایند تولید، نمونه‌ها به نسبت (۱:۱) با آب مقطر رقیق و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا توده سلولی جدا شود. اتانول ۹۸ درصد سرد (به حجم سه برابر محیط) به مایع رویی اضافه شد تا زانتان رسوب کند و برای از بین بردن بقایای محیط کشت، محصول زانتان دوباره با الکل ۹۸ درصد تیمار و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد (۱ و ۱۴). محصول رسوب یافته به مدت ۲۴ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس با دستگاه فریز درایر^۶ (مدل LYOVAC™-GT 3) خشک شد.

مطالعه روند فرایند تولید زانتان در محیط آب پنیر: نمونه گیری از محیط تولید در فواصل زمانی ۲۴ ساعته انجام و رشد باکتری به دو روش سنجش جذب نوری و شمارش سلولی سنجیده شد (۱۵). به منظور ارزیابی میزان مصرف قند، به طور هم‌زمان فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز و مقدار لاکتوز باقیمانده سنجیده شد. فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز با استفاده از شیوه کار استاندارد روش Miller^۷ و پیش‌ماده اورتونیترو فنیل گالاکتوپیرانوزید^۷ (ONPG) اندازه گیری

نتایج

تغییرات هنگام فرایند تخمیر طی مدت پنج شبانه‌روز بررسی شدند. نتایج ارزیابی رشد باکتری در شکل ۱ نشان می‌دهند طی ۲۴ ساعت اول، بیشینه جذب نوری حاصل از رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر برابر ۲/۵ است و این روند افزایشی با شمارش سلول‌های زنده روی محیط لاکتوز آگار مطابقت دارد؛ همچنین طی مدت پنج شبانه‌روز از آغاز تخمیر و هم‌زمان با افزایش فعالیت آنزیم، مصرف قند نیز افزایش می‌یابد؛ به طوری که تا روز سوم فرایند، باکتری بیش از نیمی از قند محیط را مصرف می‌کند.



شکل ۱- بررسی روند رشد زانتوموناس سیتیری سویه ۳۸۶ در محیط تولید

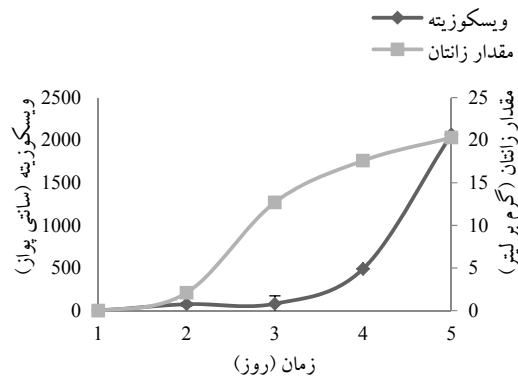
شکل ۲ نشان می‌دهد مقدار قند و فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز از زمان آغاز فرایند تا ۲۴ ساعت اول نسبتاً ثابت است، ولی فعالیت آنزیم پس از ۲۴ ساعت به طور تصاعدی افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده شدت گرفتن مصرف قند لاکتوز محیط توسط سویه بومی است. بیشترین فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز پس از ۹۶ ساعت معادل ۱۳۰۲/۲۷ واحد بر میلی‌لیتر ثبت شد.

شد. منحنی استاندارد لاکتوز با استفاده از روش هیدرولیز اسیدی و روش دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید^۸ (DNS) رسم و میزان قند باقیمانده در محیط اندازه‌گیری شد (۱۶ و ۱۷). به منظور دستیابی به مقدار وزنی محصول زانتان، پس از هر بار نمونه‌گیری و استخراج، محصول خشک و با ترازوی دیجیتال وزن شد (۱).

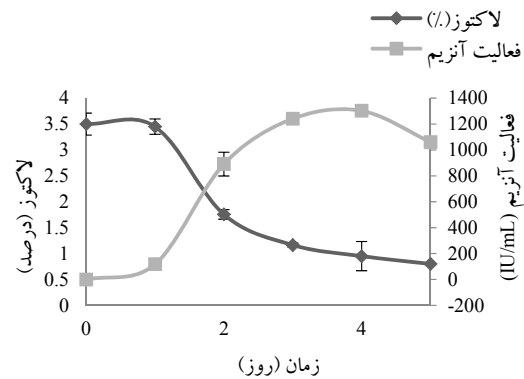
ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی محصول زانتان: تعیین ویسکوزیته: در مدت زمان فرایند تخمیر طی پنج شبانه‌روز، مقدار ویسکوزیته محیط پس از هر بار نمونه‌گیری با ویسکومتر استوالد^۹ در دمای محیط ۲۵ درجه سانتی‌گراد سنجیده شد (۹ و ۱۸)؛ همچنین به منظور دستیابی به ویسکوزیته محصول زانتان، محلول ۱ درصد زانتان حاصل از سویه ۳۸۶ در آب مقطر تهیه و یکنواخت و سپس ویسکوزیته آن اندازه‌گیری شد. به منظور مقایسه از محلول ۱ درصد زانتان استاندارد (تهیه شده از شرکت سیگما مربوط به باکتری صنعتی زانتوموناس کمپستریس با کد ۲-۶۶-۱۱۱۳۸) استفاده شد (۱۹).

سنجش محتوای پرووات و استات: به منظور ارزیابی محتوای پرووات و استات موجود در ساختار زانتان به ترتیب از روش ۲ و ۴ دی‌نیتروفنیل‌هیدرازین و هیدروکسامیک‌اسید استفاده شد (۲۰ و ۲۱). منحنی استاندارد استیل‌کولین و پرووات تهیه و برای شاهد از پودر زانتان استاندارد استفاده شد (۲۲).

بررسی ساختار زانتان با روش طیف‌سنجی مادون قرمز^{۱۰} (FTIR): محصول صمغ زانتان پودر و همراه با پتاسیم پروماید به شکل قرص تهیه شد. FTIR نمونه به روش طیف‌سنجی مادون قرمز و با استفاده از دستگاه FTIR (Perkin Elmer spectrum one) در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر انجام و طیف‌های FTIR آن به منظور تعیین ویژگی‌ها و گروه‌های عاملی با زانتان استاندارد مقایسه شدند (۱۹ و ۲۳).



شکل ۳- بررسی تولید زانتان و ویسکوزیته در محیط تولید



شکل ۲- بررسی مصرف لاکتوز و فعالیت آنزیم توسط

زانتوموناس سیتیری سویه ۳۸۶ در محیط تولید

ویسکوزیته محلول ۱ درصد زانتان نیز سنجیده شد. نتایج مقایسه ویسکوزیته و محتوای استات و پیرووات زانتان حاصل از پژوهش حاضر و زانتان سویه استاندارد زانتوموناس کمپستریس (تهیه شده از شرکت سیگما با شماره ثبت ۲-۶۶-۱۱۱۳۸) در جدول ۲ نشان داده شده است.

فرایند تولید زانتان در محیط تولید بر پایه آب پنیر طی مدت پنج شبانه روز در شکل ۳ دیده می شود. ویسکوزیته نهایی محیط پس از پنج شبانه روز به ۲۰۶۶/۵ سانتی پواز رسید؛ همچنین روند افزایشی تولید زانتان از روز سوم آغاز شد و در پایان فرایند، بیشترین مقدار وزنی زانتان معادل ۲۰/۳ گرم برلیتر به دست آمد.

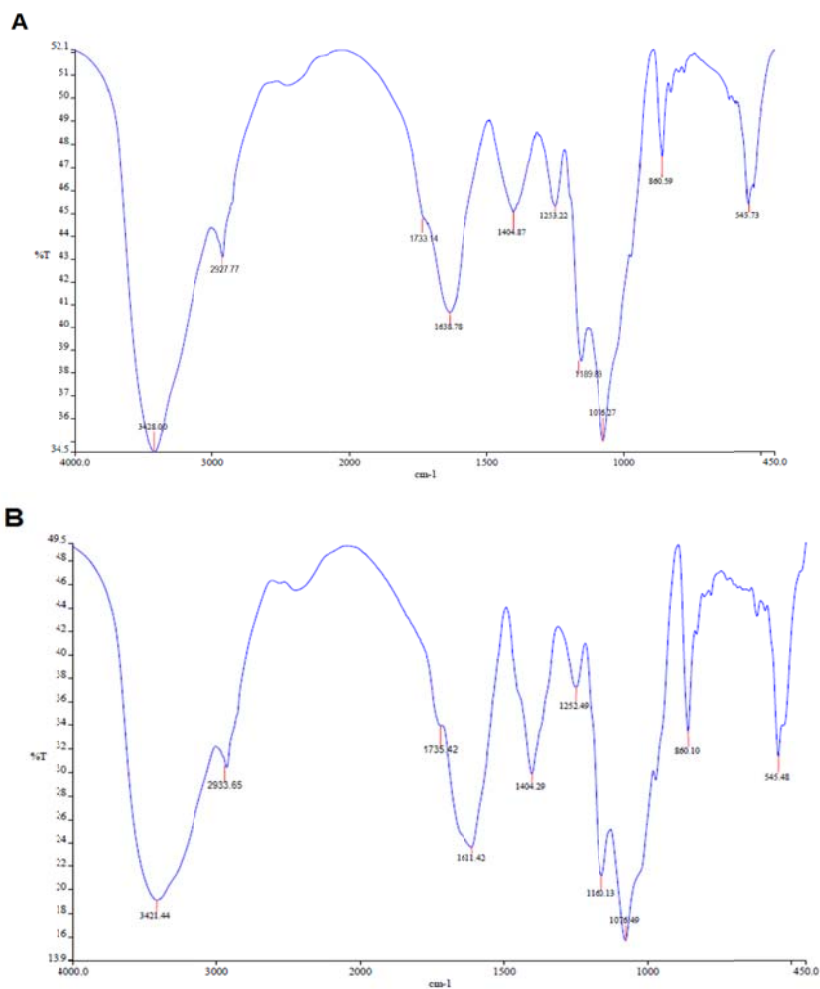
جدول ۲- مقایسه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی زانتان حاصل از زانتوموناس سیتیری سویه ۳۸۶ و نمونه استاندارد

باکتری	ویسکوزیته محلول ۱ درصد	پیرووات (درصد)	استات (درصد)
<i>X. citri</i> /NIGEB-386	۳۲۵±۵	۲/۱±۰/۱	۰/۲۸۹±۰/۰۱
<i>X. campestris</i>	۶۹۵±۱۲	۵/۴±۰/۰۴	۰/۳۳±۰/۰۲

± نشان دهنده انحراف معیار است.

زانتان نشان می دهد؛ اختلاف جزئی در محدوده پیک های مدنظر با نمونه استاندارد به علت ناخالصی های موجود در محصول زانتان حاصل از پژوهش حاضر است.

در مطالعه حاضر با توجه به شکل ۴، گروه های عاملی استیل در محدوده های ۲۹۰۰ تا ۲۹۵۰ و ۱۷۳۰ تا ۱۷۳۵ بر سانتی متر و گروه های کربونیل در محدوده های ۱۶۰۰ تا ۱۶۴۵ و ۱۰۷۰ تا ۱۲۰۰ بر سانتی متر مشاهده شدند. جدول ۳، نتایج مقایسه گروه های عاملی را بین دو نمونه



شکل ۴- طیف FTIR زانتان؛ A. زانتان سویه استاندارد (زانتوموناس کمپستریس)، B. محصول زانتان باکتری زانتوموناس سیتیری سویه ۳۸۶

جدول ۳- مقایسه گستره جذب (cm^{-1}) گروه‌های عاملی موجود در ساختار زانتان به روش FTIR

گروه‌های عاملی	هیدروکسیل	کربونیل	کربوکسیل	استیل
زانتان سیگما	۳۴۲۶	۱۶۳۴، ۱۷۳۳	۱۴۵۴، ۱۲۵۳	۲۹۲۷، ۱۰۷۶
زانتان سویه ۳۸۶	۳۴۲۱	۱۶۱۱، ۱۷۳۵	۱۴۵۴، ۱۲۵۲	۲۹۳۳، ۱۰۷۶

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر برای نخستین بار، تولید صمغ زانتان با استفاده از سویه بومی Xci/ NIGEB-386 در محیط آب‌پنیر ارزیابی شد و تمام متغیرهای تخمیر بررسی شدند. نتایج نشان دادند این سویه با داشتن فعالیت

بتاگالاکتوزیدازی از لاکتوز موجود در آب‌پنیر استفاده و مقدار درخور توجهی صمغ زانتان (۲۰/۳ گرم بر لیتر) تولید می‌کند. با توجه به هزینه زیاد منابع کربنی مورد استفاده در فرایندهای میکروبی، همیشه استفاده از منابع کربنی ارزان‌قیمتی مانند ضایعات کشاورزی و

سویه ۳۸۶ روی محیط آب پنیر، ۲۰/۳ گرم برلیتر بود و این نشان‌دهنده قابلیت زیاد این سویه برای مصرف لاکتوز و تولید زانتان در محیط آب پنیر است؛ هرچند فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز سویه *Xcc/NIGEB K37* در مطالعهٔ رمضانی و همکاران حدود ۲۰۰ واحد فعالیت آنزیمی نسبت به سویه *Xci/386* بیشتر بود و این احتمالاً به علت استفاده از محیط دارای لاکتوز به جای آب پنیر است. از سویی، مطالعهٔ حاضر نشان داد آنزیم بتاگالاکتوزیداز، آنزیم نسبتاً پایداری است؛ زیرا باتوجه به شکل ۲ و برخلاف کاهش تعداد سلول‌های زنده در پایان فرایند تخمیر، مقدار آنزیم ثابت بود و افت بسیار ناچیزی در پایان فرایند نشان داد. پژوهش‌ها نشان می‌دهند غلظت اولیهٔ سوبسترای لاکتوز در پایداری آنزیم موثر است و حتی اگر سوبسترا هنگام فرایند اضافه شود، اثر منفی روی فعالیت آنزیم خواهد داشت (۲۵). در پژوهش حاضر، غلظت اولیهٔ لاکتوز در محیط تولید برابر ۳/۵ درصد بود و با وجود کاهش لاکتوز در پایان فرایند، همچنان تأثیر مثبت غلظت اولیهٔ پیش‌ماده روی پایداری آنزیم مشهود بود.

ویسکومتری ابزار مهمی برای تشخیص ترکیبات شیمیایی آگروپلیمری سنتز شده در فرایندهای تخمیری است (۲۶) و کیفیت ویسکوزیتهٔ ذاتی بر اساس نوع سویه، شرایط تخمیر و روش‌های استخراج متغیر است (۲۷). نتایج بررسی تولید زانتان نشان دادند با افزایش مدت زمان فرایند تولید، مقدار زانتان و ویسکوزیته افزایش می‌یابد. طی ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از آغاز فرایند، تغییرات افزایشی در مقدار وزنی زانتان و ویسکوزیته مشاهده شد و این روند افزایشی بین روزهای چهارم تا پنجم معنادار بود. از آنجاکه تولید صمغ در فاز سکون رشد باکتری اتفاق می‌افتد؛ می‌توان گفت با کاهش

پساب‌های صنایع غذایی مدنظر بوده است (۱). باتوجه به اینکه آب پنیر مقادیر زیادی لاکتوز دارد، محیط مناسبی برای تولید کم‌هزینهٔ صمغ زانتان با ماهیت پلی‌ساکاریدی توسط باکتری مولد محسوب می‌شود (۹). تلاش در راستای استفاده از محیط‌های لاکتوزی نظیر آب پنیر برای رشد باکتری و تولید زانتان همواره مدنظر پژوهشگران بوده است.

باکتری صنعتی *زانتوموناس کمپستریس*، سویهٔ صنعتی تولیدکنندهٔ زانتان معرفی شده است (۱۱)؛ همان‌طور که نیک‌نژاد^۱ و همکاران بیشترین مقدار تولید زانتان توسط *زانتوموناس کمپستریس* را در شرایط بهینه برابر با ۱۶/۴ گرم برلیتر در محیط آب پنیر دارای لاکتوز گزارش کرده‌اند (۱۳). باکتری *زانتوموناس کمپستریس* عموماً قابلیت کمی برای مصرف لاکتوز نشان می‌دهد و پژوهشگران راه دستیابی به سویه‌های جهش‌یافتهٔ لاکتوز مثبت را از طریق روش‌های جهش‌زایی و مهندسی ژنتیک فراهم می‌کنند. کانیشک^{۱۱} و همکاران (۱۹۹۳) سویهٔ جهش‌یافتهٔ لاکتوز مثبت *زانتوموناس کمپستریس* را با استفاده از جهش‌زایی تصادفی و عوامل جهش‌زای ان‌متیل، ان‌نیترو، ان‌نیتروز و گوانیدین غربال کردند و سپس با بهینه‌کردن شرایط تولید در محیط دارای ۴ درصد لاکتوز توانستند ۲۰ گرم برلیتر زانتان به دست آورند (۲۴). به‌تازگی سویه‌های بومی‌ای از جنوب ایران با عنوان باکتری‌های لاکتوز مثبت جدا شده‌اند که به‌طور طبیعی لاکتوز را مصرف می‌کنند؛ به‌طوری‌که رمضانی^{۱۲} و همکاران (۲۰۱۳) مقدار وزنی زانتان به‌دست‌آمده از سویهٔ بومی *زانتوموناس سیتیری Xcc/NIGEB K37* (K37) در محیط دارای ۵ درصد لاکتوز را پس از ۱۲۰ ساعت تخمیر معادل ۱۴ گرم برلیتر محاسبه کرده‌اند (۱۵)؛ درحالی‌که مقدار وزن خالص زانتان حاصل از

تغییر شرایط تخمیر دو عامل مهم در تنوع ساختاری و ویژگی‌های روانه‌شناختی زانتان محسوب می‌شوند (۳۳) و (۳۴). شرایط محیطی در ساختار اولیه زانتان تأثیری ندارد، ولی در شکل‌گیری ساختار ثانویه زانتان، وزن مولکولی و بازده مؤثر است (۴ و ۳۵). FTIR روشی برای تشخیص شباهت‌ها و تفاوت‌ها در ساختار شیمیایی ترکیبات است (۲۳). بررسی‌هایی که تاکنون به کمک FTIR روی ساختار زانتان انجام شده‌اند، نشان می‌دهند هر گروه عاملی در ساختار زانتان در محدوده طول موج خاصی پیک می‌دهد. نمونه محصول زانتان سویه ۳۸۶ و نمونه استاندارد برای شناسایی گروه‌های شیمیایی موجود تجزیه و تحلیل شدند و منطقه مطالعه شده شامل تمام باندهای طیفی در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر بود و با وجود تفاوت‌های جزئی جمع‌آوری شده در طیف FTIR، این نتیجه نشان می‌دهد ماهیت زانتان تولید شده توسط سویه ۳۸۶ با نمونه زانتان استاندارد (شرکت سیگما با شماره ثبت ۲-۶۶-۱۱۱۳۸) از نظر جایگاه گروه‌های عاملی مطابقت دارد. داسیلوا^{۱۴} و همکاران (۲۰۱۸) دو سویه ۱۸۶۶ و ۱۸۶۷ از باکتری *زانتوموناس* کمپستریس را از نظر تولید زانتان ارزیابی کردند و نشان دادند با استفاده از منابع کربنی مختلف و سویه‌های متفاوت، طیف‌های حاصل از FTIR در هر دو سویه گروه‌های عاملی مشابهی دارند (۱۸)؛ اما با توجه به اینکه روش FTIR به‌تنهایی برای شناسایی پلیمر زیستی کافی نیست، روش‌های کامل‌تری از جمله استروسکوپی با رزونانس مغناطیسی هسته کربن و پروتون نیز پیشنهاد می‌شوند. با استناد به نتایج پژوهش حاضر و در مقایسه با سویه صنعتی *زانتوموناس* کمپستریس، سویه *زانتوموناس* سیتری ۳۸۶ نیز نامزد مناسب تولید زانتان در محیط آب‌پنیر معرفی می‌شود.

لاکتوز، منابع غذایی در دسترس باکتری پایان می‌یابند و باکتری وارد مرحله تولید صمغ برای مقابله با شرایط نامساعد غذایی می‌شود (۲۸ و ۲۹). پژوهش‌ها نشان می‌دهند محتوای استات و پیرووات موجود در ساختار زانتان روی ویسکوزیته زانتان بسیار مؤثر است و با افزایش گروه‌های عاملی استیل و پیروویل، ویسکوزیته افزایش می‌یابد (۲۶ و ۳۰)؛ بنابراین با توجه به نتایج سنجش ویسکوزیته، این فرضیه وجود داشت که محتوای استات و پیرووات نمونه زانتان سویه ۳۸۶ از زانتان استاندارد کمتر باشد و پس از بررسی نتایج سنجش طبق جدول ۲ مشخص شد محتوای استات در هر دو نمونه زانتان نسبتاً یکسان است؛ بنابراین، تجربه‌های پژوهش حاضر از نقش استات در افزایش ویسکوزیته پشتیبانی نمی‌کنند؛ این نتیجه با نتایج رودریگوئز^{۱۳} و همکاران (۱۹۹۷) همخوانی دارد (۶ و ۳۱). در بررسی‌های دیگر نیز مشخص شده است محتوای زیاد پیرووات و محتوای کم استات موجب افزایش ویسکوزیته محلول زانتان می‌شود (۳۲)؛ به طوری که با افزایش محتوای پیرووات (حدود ۰/۱ تا ۰/۵ درصد)، ویسکوزیته حدود ۶۰ تا ۸۰ درصد افزایش می‌یابد (۲۹). مطالعه حاضر نشان داد ارتباط مستقیم و معناداری بین محتوای پیرووات و ویسکوزیته وجود دارد؛ زیرا محتوای پیرووات و همچنین ویسکوزیته محلول ۱ درصد نمونه زانتان استاندارد نسبت به محتوای پیرووات و ویسکوزیته زانتان سویه ۳۸۶ حدود ۲/۵ برابر بیشتر بود. درحقیقت، به نظر می‌رسد محتوای پیروویک‌اسید بهترین شاخص کیفیت پلی‌ساکارید زانتان است و درصد استیله و پیروویله شدن مانوز ساختار زانتان می‌تواند موجب تغییرات ویسکوزیته و ویژگی‌های روانه‌شناختی آن شود (۶)؛ هرچند نوع ریز موجود و

units. *Carbohydrate Polymer* 2013; 98(1): 914-921.

- (9) Fu JF., Tseng YH. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Applied and Environmental Microbiology* 1990; 56: 919-923.
- (10) Siso MG. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology* 1996; 57: 1-11.
- (11) Yang TC., Wu GH., Tseng YH. Isolation of a *Xanthomonas campestris* strain with elevated beta-galactosidase activity for direct use of lactose in xanthan gum production. *Letters in Applied Microbiology* 2002; 35(5): 375-379.
- (12) Leela JK., Sharma J. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess and Engineering* 2000; 23: 687-689.
- (13) Niknezhad SV., Asadollahi MA., Zamani A., Biria D., Doostmohamadi M. Optimization of xanthan gum production using cheese whey and response surface methodology. *Food Science and Biotechnology* 2015; 24(2): 453-460.
- (14) Ashraf S., Soudi MR., Sadeghizadeh M. *Xanthomonas* of a novel mutated strain of *xanthomonas campestris* for xanthan production using whey as the sole substrate. *African Journal of Microbiology* 2008; 3(11): 438-442.
- (15) Ramezani A., Jafari M., Goodarzi T., Alavi SM., Salmanian AH., Azin M. Lactose consuming strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) insight into the emergence of natural field resources for xanthan gum production. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 2014; 30(5): 1511-1517.
- (16) Miller GD. *Handbook of Dairy Foods and Nutrition*. 3rd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2006.
- (17) Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959; 31: 426-428.

سپاسگزاری

نویسندگان از امکانات سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک ایران که در اختیار پژوهش حاضر قرار گرفتند، سپاسگزاری می‌کنند.

References

- (1) Garcia-Ochoa F., Santos VE., Casas JA., Gomez E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* 2000; 18(7): 549-579.
- (2) Katzbauer B. Properties and application of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability* 1998; 59: 81-84.
- (3) Kennedy J., Bradshaw I. Production, properties and applications of xanthan. *Progress in Industrial Microbiology* 1984; 19: 319-371.
- (4) Monaco-Lopez BD., Lessa VL., Silva BM., Schnitzler E., Lacerda LG. Xanthan gum: Properties, production conditions, quality and economic perspective. *Journal of Food and Nutrition Research* 2015; 54(3): 185-194.
- (5) Palaniraj A., Jayaraman V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering* 2011; 106: 1-11.
- (6) Shatwell KP., Sutherland IV., Ross-Murphy SB. Influence of acetyl and pyruvate substituents on the solution properties of xanthan polysaccharide. *International Journal of Biology and Macromolecules* 1990; 12: 71-78.
- (7) Callet F., Milas M., Rinaudo M. Influence of acetyl and pyruvate content on rheological properties of xanthan in dilute solution. *International Journal of Biological Macromolecules* 1987; 9(5): 291-293.
- (8) Kool MM., Gruppen H., Sworn G., Schols HA. Comparison of xanthan by the relative abundance of its six constituent repeating

- (18) da Silva JA., Cardoso LG., de Jesus Assis D., Gomes JVP., Oliveira MBPP., de Souza OC., et al. Xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IBSBF 1866 and 1867 from lignocellulose agro industrial wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2018; 1-14.
- (19) Faria S., de Oliveira Petkowicz CL., de Moraes SAL., Hernandez Terrones MG., de Resende MM., de Franc FP., et al. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. *Carbohydrate Polymer* 2011; 86: 469-476.
- (20) Katsuki H., Kawano C., Yoshida T., Kanayuki H., Tanaka S. The determination of pyruvic acid by 2, 4-Dinitrophenylhydrazin method. *Analytical Chemistry* 1961; 2: 433-439.
- (21) McComb EA., McCready RM. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymer. *Analytical Chemistry* 1957; 29(5): 819-821.
- (22) Hsu CS. Integrated rotating fibrous-bed bioreactor-ultrafiltration process for xanthan gum production from whey lactose [Dissertation]. Athens: Ohio State University; 2011.
- (23) Griffiths PR., de Hasseth JA. *Fourier transform infrared spectrometry*. 2nd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2007
- (24) Koniček J., Lasík J., Šafář H. Xanthan gum produced from whey by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. *Folia Microbiologica* 1993; 38: 403-405.
- (25) Warmerdam A., Boom RM., Janseen AEM. β -galactosidase stability at high substrate concentrations. *Springerplus* 2013; 2(1): 402.
- (26) Erten T., Adams GG., Foster TG., Harding SE. Comparative heterogeneity, molecular weights and viscosities of xanthan of different pyruvate and acetate content. *Food Hydrocolloids* 2014; 1-7.
- (27) Bourne MC. *Food texture and viscosity concept and measurement*. 2nd ed. New York: Academic Press; 1997.
- (28) De Vuyst L., Vermeire A. Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1994; 42: 187-191.
- (29) Silva MF., Fornari RCG., Mazutti M de Oliveira D., Padilha FF., Cichoski AJ., Cansian RL., et al. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering* 2009; 90: 119-123.
- (30) Cheetham NWH., Nik Norma NM. The effect of pyruvate on viscosity properties of xanthan. *Carbohydrate Polymer* 1989; 10: 55-60.
- (31) Rodriguez H., Aguilar L., Lao M. Variations in xanthan production by antibiotic-resistant mutants of *Xanthomonas campestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1997; 48(5): 626-629.
- (32) Sandford PA., Pittsley JE., Knutson CA., Watson PR., Cadmus MC., Jeanes A. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: Characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. Extracellular microbial polysaccharide. *ACS Symposium Series* 1977; 45: 192-210.
- (33) Rehm B. *Microbial production of biopolymers and polymer precursors: Applications and perspectives*. 1st ed. Horizon Scientific Press; 2009.
- (34) Mesomo M., Silva MF., Boni G., Padilha FF., Mazutti M., Mossi M., et al. Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* from cheese whey: Production optimisation and rheological characterisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2009; 89: 2440-2445.
- (35) Savvides AL., Katsifas EA., Hatzinikolaou DG., Karagouni AD. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium. *World Journal Microbiology Biotechnology* 2012; 28: 2759-2764.

¹- *Xanthomonas*

²- Xanthomonadaceae

³- *Xanthomonas campestris*

⁴- *Xanthomonas citri*

⁵- National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

⁶- Freeze Dryer

⁷- Ortho nitrophenyl galacto pyranoside

⁸- 3,5- dinirosalicylic acid

⁹- Ostwald viscometers

¹⁰- Fourier Transform Infrared- spectroscopy

¹¹- Koniček

¹²- Ramezani

¹³- Rodriguez

¹⁴- Da Silva