

УДК 543.5

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙТРАЛЬНЫХ САХАРОВ И ГЛЮКУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В СОСТАВЕ МИКРОБНОГО ПОЛИСАХАРИДА КСАНТАНА****Гашевская А.С.***Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, e-mail: asg30@tpu.ru*

На сегодняшний день микробные полисахариды находят широкое применение в самых различных сферах человеческой деятельности, от медицины до металлургии. Наиболее известным является ксантан – внеклеточный полисахарид бактерии *Xanthomonas Campestris*. Ксантан используют как добавку, улучшающую качество самых различных продуктов и технологических операций. Проведено исследование химического состава коммерческого образца пищевого ксантана («Company Plasma Product Specification», Китай). Для идентификации коммерческого образца ксантана использовался метод ИК-спектроскопии. Проведено количественное определение нейтральных сахаров, а также глюкуроновой кислоты инструментальными методами анализа: потенциометрическое титрование, УФ-спектроскопия, ИК-спектроскопия в коммерческом образце пищевого ксантана. Подобраны оптимальные условия определения нейтральных сахаров фенол-серным методом и кислых сахаров карбазол-серным методом. Предложен новый метод определения глюкуроновой кислоты, а также предложены дополнительные условия для более точного определения нейтральных сахаров.

**Ключевые слова:** углеводы, ксантан, глюкуроновая кислота, УФ-спектроскопия, фенол-серный метод, карбазол-серный метод

**DETERMINATION OF NEUTRAL SUGARS AND HYALURONIC ACID IN THE COMPOSITION OF THE XANTHAN MICROBIAL POLYSACCHARIDE****Gashevskaya A.S.***National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, e-mail: asg30@tpu.ru*

Currently, microbial polysaccharides are widely used in most diverse areas of human activity, from medicine to metallurgy. One of the best known amongst them is xanthan, an extracellular polysaccharide, produced by the bacterium *Xanthomonas Campestris*. Xanthan is used as an additive, improving the quality of most diverse products and technological processes. The chemical composition of a commercial xanthan food sample was studied («Company Plasma Product Specification», China). The method of IR spectroscopy was used to identify the commercial xanthan sample. Quantitative determination of neutral sugars as well as glucuronic acid by instrumental methods of analysis was carried out: potentiometric titration, UV spectroscopy, IR spectroscopy in a commercial xanthan food sample. Optimal conditions for the determination of neutral sugars by the phenol-sulfur method and acid sugars by the carbazole-sulfur method have been selected. A new method for the determination of glucuronic acid has been proposed, and additional conditions have been proposed for more accurate determination of neutral sugars.

**Keywords:** carbohydrates, xanthan, glucuronic acid, UV spectroscopy, phenol-sulfur method, carbazole-sulfur method

Биополимеры полисахаридной структуры – важнейший класс природных соединений, находящихся практическое использование в различных областях науки и техники [10].

Сегодня микробные полисахариды находят широкое применение в самых различных сферах человеческой деятельности, от медицины до металлургии. Наиболее известным является ксантан – внеклеточный полисахарид бактерии *Xanthomonas Campestris*. Ксантан используют как добавку, улучшающую качество самых различных продуктов и технологических операций. Чаще всего его применяют для повышения нефтедобычи, при буровых работах, для повышения урожайности, а также в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности [5].

Известно, что ксантан состоит из двух D-глюкопиранозильных звеньев, двух D-маннопиранозильных звеньев и звена D-глюкопиранозилуруновой кислоты [9], степень ветвления и ацетилирования полисахарида зависит от штамма продуцен-

та, благодаря чему биополимер приобретает различные характеристики и свойства. В чистом виде ксантан представляет собой мягкий пушистый порошок белого или кремового цвета. Неорганические элементы составляют около 5,5% [7]. Процентный состав нейтральных и кислых сахаров зависит от способа выделения ксантана [12], поэтому для его использования в пищевой, медицинской и косметической промышленности важно контролировать количество нейтральных и кислых сахаров.

Для определения кислых сахаров в образце ксантана используют карбазол-серный метод, основанный на цветной реакции карбазола с продуктами окисления моносахаров, образующихся после разрушения полимерных молекул полисахаридов концентрированной серной кислотой. Данный метод обладает рядом недостатков, таких как длительность подготовки эксперимента, использование вредных и концентрированных кислот и щелочей [6].

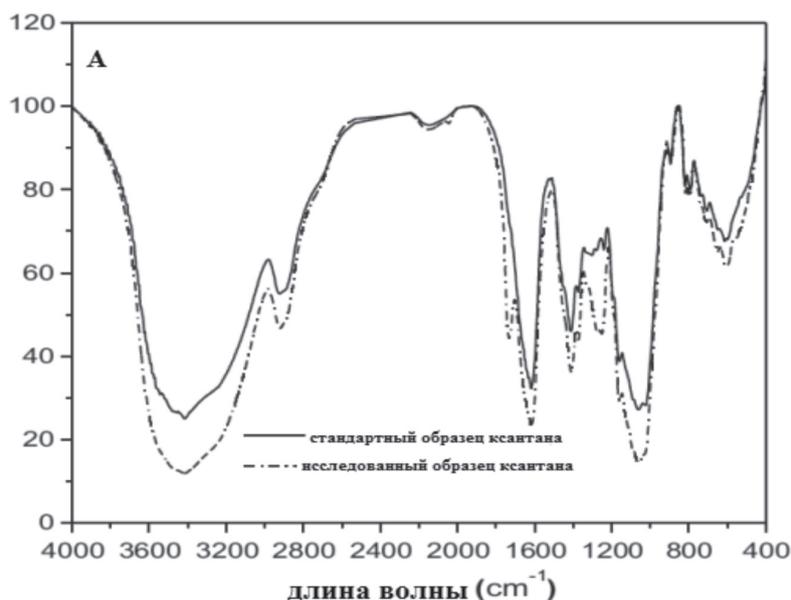


Рис. 1. ИК-спектры стандартного и исследуемого образцов ксантана

Существующие методы анализа, такие как фенол-серный, карбазол-серный методы и др., не всегда обладают хорошей воспроизводимостью результатов, трудоемки, дорогостоящи и часто малопригодны для использования в надлежащей лабораторной практике [2, 11, 8]. На сегодняшний день отсутствуют комплексные подходы по исследованию ксантана инструментальными методами анализа для его использования в медицинской, пищевой и технической сферах. В этой связи востребованными являются комплексные экспериментальные исследования, обладающие удовлетворительными валидационными параметрами.

Цель работы – исследование химического состава ксантана инструментальными методами анализа, а именно определение нейтральных и кислых сахаров.

#### Материалы и методы исследования

В качестве модельного объекта исследования использовался коммерческий образец пищевого ксантана («Companu Plasma Product Specification», Китай).

Измерения оптической плотности проводили на УФ-спектрофотометре Cary 60 (Agilent Technologies, Германия) в кварцевых кюветах 10 мм.

Регистрацию ИК-спектров проводили на ИК-спектрометре Agilent 660 FTIR (Agilent Technologies, Германия).

#### Определение нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу в ксантане

При определении нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу в образце ксантана использовали

фенол-серный метод, основанный на реакции взаимодействия оксиметилфурфузола с фенолом в концентрированной серной кислоте [4]. Сначала под воздействием концентрированной серной кислоты глюкоза дегидратируется в течение 45 минут до образования оксиметилфурфузола. А далее при действии фенола на оксиметилфурфузол образуется ауриновый краситель, имеющий спектр поглощения в видимой области. Для определения нейтральных сахаров готовили растворы с концентрациями 20 мг/см<sup>3</sup>, 50 мг/см<sup>3</sup>, 80 мг/см<sup>3</sup>, 100 мг/см<sup>3</sup>. Затем к полученным растворам добавляли по 5 см<sup>3</sup> воды и проводили измерение оптической плотности при 483±2 нм [16].

#### Определение кислых сахаров в пересчете на глюкуроновую кислоту в ксантане

При определении кислых сахаров в пересчете на глюкуроновую кислоту в образце ксантана использовали карбазол-серный метод, основанный на цветной реакции карбазола с продуктами окисления моносахаров, образующихся после разрушения полимерных молекул концентрированной серной кислотой [15]. Для определения кислых сахаров в пересчете на глюкуроновую кислоту в образце ксантана готовили раствор с концентрацией 100 мг/см<sup>3</sup>. Измерение оптической плотности проводили при 525 ± 2 нм [16].

#### Результаты исследования и их обсуждение

##### Определение структуры ксантана

Для установления структуры ксантана и его идентификации использовали метод ИК-спектроскопии.

В качестве стандартного вещества был использован ксантан («Sigma-Aldrich», США) с высокой стабилизирующей активностью, высокой растворимостью, вы-

сокой вязкостью даже при маленьких концентрациях.

На рис. 1 представлены ИК-спектры стандартного вещества ксантана и исследуемого образца ксантана.

При сравнении стандартного образца ксантана и исследуемого образца ксантана очевидно, что некоторые полосы поглощения образца коммерческого ксантана и стандартного образца ксантана совпадают, что указывает на идентичность стандартного образца ксантана исследуемому.

Так, на ИК-спектре имеется область отпечатков пальцев при  $1200\text{--}850\text{ см}^{-1}$ , которая соответствует области «отпечатков пальцев» пектиновых веществ как для стандартного образца ксантана, так и для исследуемого образца.

Кроме того, ИК-спектр исследуемого образца ксантана показывает наличие свободных, а также неэтерифицированных карбоксильных групп.

Кроме того, имеются полосы поглощения  $1416$ ,  $1331$  и  $1240\text{ см}^{-1}$ , которые являются областью «отпечатков пальцев» глюкуроновой кислоты, которые характерны как для стандартного образца ксантана, так и для исследуемого образца. Использованный

метод ИК-спектроскопии позволяет судить о том, что ксантан является кислым сахаром, содержащим глюкуроновую кислоту.

Определение глюкозы и глюкуроновой кислоты является обязательным этапом контроля образца ксантана, для установления его состава, также по количеству процентного содержания глюкозы в образце ксантана, говорит о том, что при его получении источником углеродного питания являлись глюкоза и глюкуроновая кислота [3, 13].

#### *Определение нейтральных сахаров*

Определение нейтральных сахаров в образцах ксантана проводили при помощи фенол-серного метода. В основу количественного определения нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу в исследуемом образце положена реакция взаимодействия оксиметилфурфуrolа с фенолом в среде серной концентрированной кислоты. Сначала под воздействием концентрированной серной кислоты глюкоза дегидратируется в течение 45 минут до образования оксиметилфурфуrolа. А далее при действии фенола на оксиметилфурфуrol образуется ауриновый краситель, имеющий в видимой области спектра максимум поглощения  $\lambda_{\text{max}}$  483–485 нм [16].

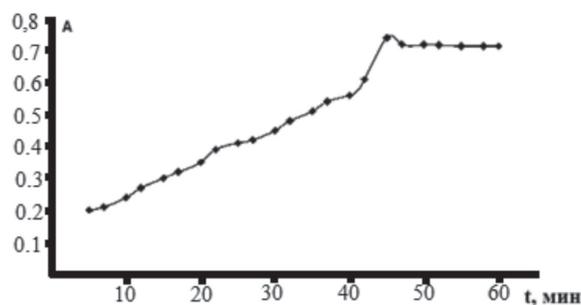


Рис. 2. Зависимость величины оптической плотности оксиметилфурфуrolа от времени его формирования

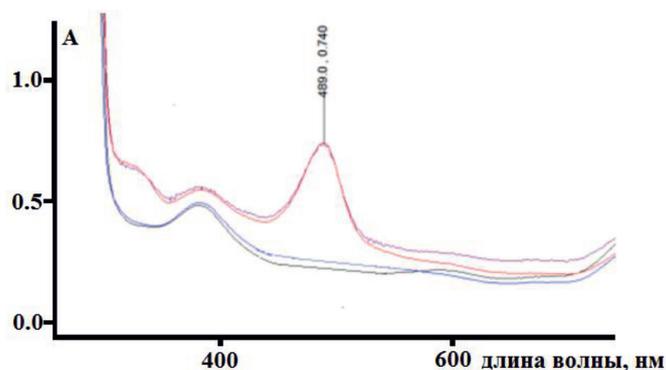


Рис. 3. Спектр поглощения в видимой области ауринового красителя с концентрацией глюкозы  $0\text{ мг/см}^3$  (1),  $25\text{ мг/см}^3$  (2)

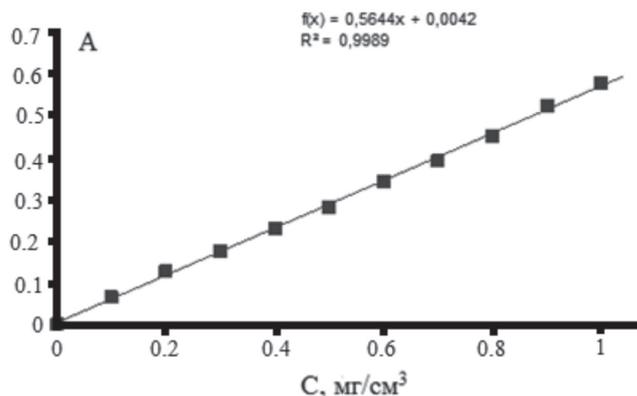


Рис. 4. Зависимости оптической плотности раствора глюкозы от ее концентрации в растворе

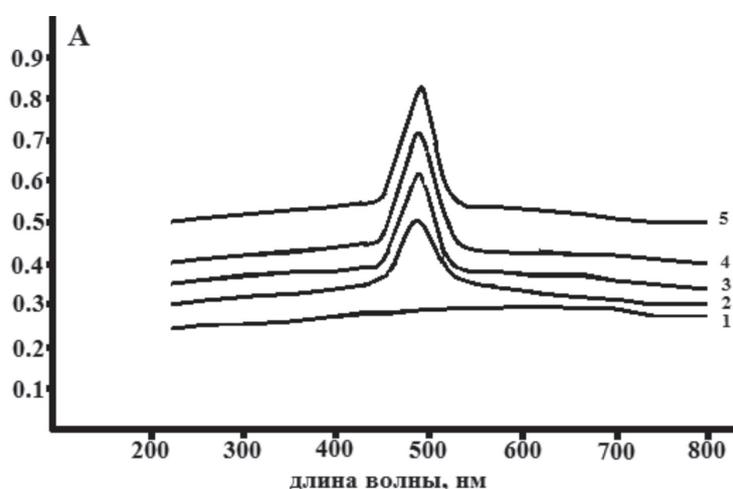


Рис. 5. Спектр поглощения в видимой области исследуемых растворов кантана разных концентраций: 0 мг/см³ (1), 20 мг/см³ (2), 50 мг/см³ (3), 80 мг/см³ (4), 100 мг/см³ (5)

Для точного определения процентного содержания нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу в образце кантана использовали только свежеприготовленные растворы глюкозы, а также раствор 5% фенола, т.к. раствор фенола достаточно быстро окисляется на свету. Использовали метод сравнения со стандартным раствором глюкозы.

На рис. 2 представлена зависимость величины оптической плотности оксиметилфурфуrolа от времени его формирования.

Замечено, что оксиметилфурфуrol формируется в концентрированной серной кислоте в течение 45 мин (рис. 2), тогда как образование ауринового красителя при действии фенола происходит сразу при внесении фенола в реакционную среду. Формирование оксиметилфурфуrolа завершается к 45 мин и сохраняется величиной постоянной.

На рис. 3 представлен спектр поглощения в видимой области ауринового красителя, с концентрацией стандартного раствора глюкозы 25 мг/см³. Полоса поглощения ауринового красителя соответствует 489 нм.

На рис. 4 представлен градуировочный график зависимости оптической плотности раствора глюкозы от ее концентрации при 489 нм. Прямолинейная зависимость наблюдалась в области концентраций глюкозы от 0,1 до 1,0 мг/см³.

На рис. 5 представлен спектр поглощения в видимой области исследуемых образцов кантана, разных концентраций.

Содержание нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу в образце кантана составило  $52,0 \pm 3\%$ . Известно, что содержание нейтральных сахаров в пересчете на

глюкозу в образцах ксантана может варьироваться от 35 до 80%.

Таким образом, рабочими условиями для количественного определения нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу в образце ксантана являются:

- время выдерживания в концентрированной серной кислоте 45 мин;
- максимум поглощения ауринового красителя при 485 нм;
- свежеприготовленные 5% раствор фенола и раствор глюкозы в день эксперимента.

#### *Определение глюкоуроновой кислоты*

Для увеличения селективности определения глюкоуроновой кислоты в образце ксантана и уменьшения влияния нейтральных сахаров на результаты определения глюкоуроновой кислоты карбазол-серным методом разрушение полимерной молекулы

проводили концентрированной серной кислотой в присутствии сульфаминовой кислоты, которая препятствует реакции карбазола с альдозами, образовавшимися при гидролизе полисахаридов.

На рис. 6 представлена зависимость оптической плотности комплекса карбазола с кислыми сахарами при  $\lambda = 525$  нм от концентрации глюкоуроновой кислоты в стандартных растворах. Прямолинейная зависимость наблюдалась в области концентраций глюкоуроновой кислоты от 0,03 до 0,5 мг/см<sup>3</sup>. Общее содержание глюкоуроновой кислоты в исследуемом образце ксантана определяли по методу градуировочного графика. Содержание глюкоуроновой кислоты в исследуемом образце ксантана в пересчете на % составило  $24,79 \pm 1,24\%$ . Известно, что содержание глюкоуроновой кислоты в образце ксантана составляет от 5 до 40%.

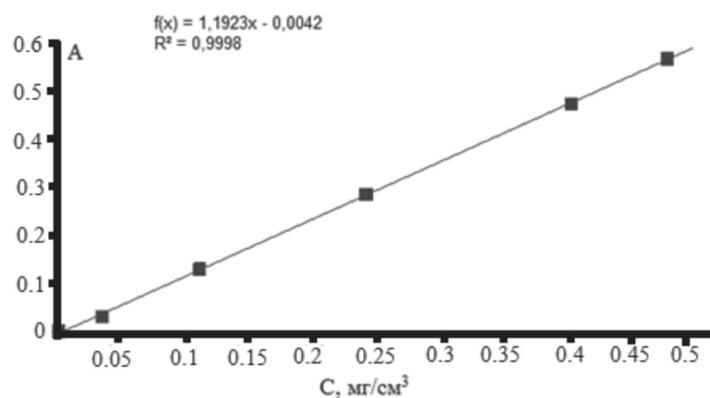


Рис. 6. Зависимость оптической плотности комплекса карбазола с кислыми сахарами при  $\lambda = 525$  нм от концентрации глюкоуроновой кислоты в стандартных растворах

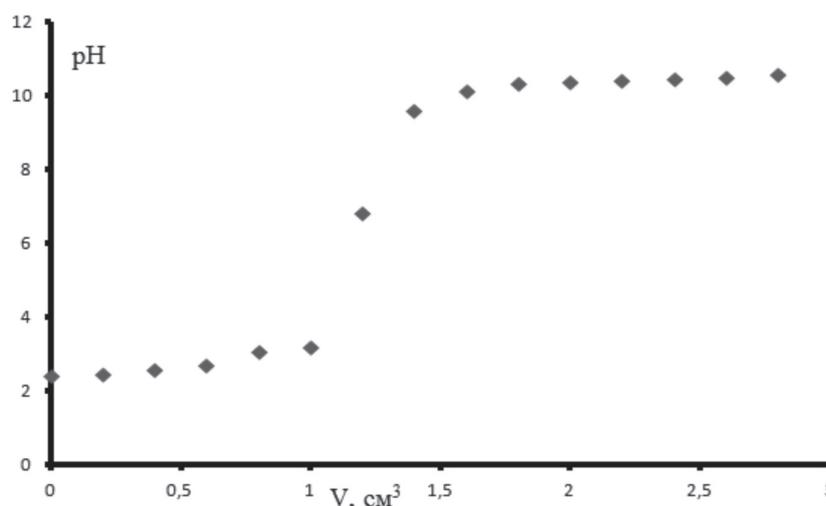


Рис. 7. Кривая потенциометрического титрования образца ксантана

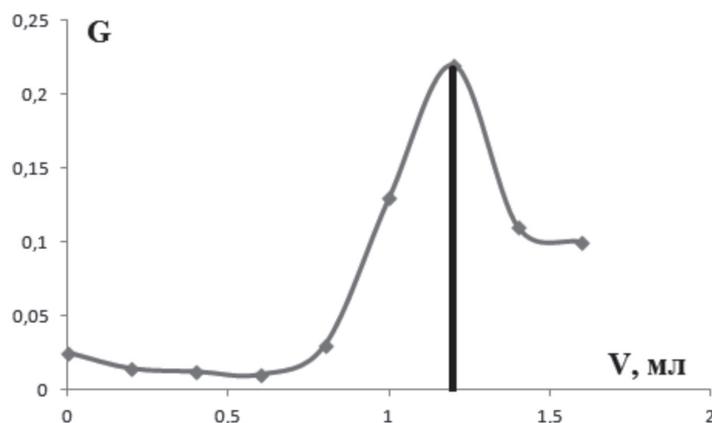


Рис. 8. Определение точки эквивалентности кривой потенциметрического титрования образца ксантана методом Грана

Следует отметить, что данная методика трудоемка, длительна, требует использования вредных концентрированных кислот и щелочей и занимает 6 ч. Кроме того, результаты плохо воспроизводятся.

В связи с этим в качестве альтернативы определения кислых сахаров в ксантане предложен метод потенциметрического титрования раствором 0,1 Н КОН [16].

Потенциметрическое титрование образца ксантана проводили в водном растворе. Методика заключалась в следующем: навеску ксантана 0,0100 г растворяли в 10 мл воды в стакане для титрования емкостью 50 мл. Для непрерывного перемешивания использовали магнитную мешалку. Электрохимическая ячейка состояла из стеклянного и хлоридсеребряного электродов. В качестве титранта использовали 0,1 Н раствор щелочи КОН. Измерение рН производили через каждые 0,2 мл добавки титранта. Точку эквивалентности определяли по методу Грана [1, 14].

На рис. 7 представлена кривая потенциметрического титрования образца ксантана.

При использовании потенциметрической индикации конечной точки титрования возникают трудности, связанные с отсутствием четко выраженных перегибов на кривых титрования функциональных групп кислотного характера, что требует последующей математической обработки результатов, такой как построение кривых Грана [14, 15]. Все кривые потенциметрического титрования образца ксантана обработаны по методу Грана.

На рис. 8 представлен пример определения конечной точки титрования по методу

Грана образца ксантана (зависимость величины  $G$  от объема титранта):

$$G = (W + V) \cdot 10^{-E} \text{ – для кислой среды;}$$

$$G = (W + V) \cdot 10^{(E-14)} \text{ – для щелочной среды,}$$

где  $V$  – объем титранта, мл;  $E$  – значения потенциала, В;  $W$  – начальный объем пробы, мл.

На основании рис. 8 конечная точка титрования равна объему 1,2 мл, что соответствует количеству глюконовой кислоты  $23,13 \pm 1,6 \text{ мг/см}^3$ .

Сравнительное содержание глюконовой кислоты в образце ксантана, полученное потенциметрическим титрованием и карбазол-серным методом, представлено в таблице.

Сравнительное содержание глюконовой кислоты в образце ксантана методом потенциметрического титрования и карбазол-серным методом

Название	Потенциметрическое титрование, мг/см <sup>3</sup>	Карбазол-серный метод, мг/см <sup>3</sup>
Ксантан	$23,12 \pm 1,16$	$24,79 \pm 1,24$

Согласно таблице количество глюконовой кислоты, определенное двумя методами, согласуется между собой, однако результаты определения глюконовой кислоты карбазол-серным методом имеют завышенные значения, что связано с мешающим влиянием нейтральных сахаров на результаты определения глюконовой кислоты. Метод потенциметрического титрования может быть использован для определения количества свободных неэтерифицированных карбоксильных групп, т.к. достаточно прост в исполнении, нет необходимости в использовании дополнительных реактивов.

### Заключение

Методом ИК-спектроскопии проведена идентификация структуры образца ксантана. Выявлено, что ксантан содержит кислые сахара. Подобраны рабочие условия определения нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу в образце ксантана фенол-серным методом. Количество нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу в исследуемом образце ксантана составило  $52,0 \pm 3\%$ . Проведено сравнительное определение кислых сахаров в пересчете на глюкуроновую кислоту в образце ксантана карбазол-серным методом и потенциометрическим титрованием. Количество кислых сахаров в пересчете на глюкуроновую кислоту в исследуемом образце ксантана составило  $24,79 \pm 1,24$  мг/см<sup>3</sup>.

### Список литературы

1. Bo Li. Structural investigation of water-soluble polysaccharides extracted from the fruit bodies of *Coprinus comatus* / Justyna M. Dobruchowska, Gerrit J. Gerwig, Lubbert Dijkhuizen, Johannes P. Kamerling // *Carbohydr. Polym.* – 2013. – № 91. – P. 314–321.
2. Cadmus M.C. Biodegradation of xanthan gum by *Bacillus* sp. / Jackson L.K., Burton K.A. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – № 44. – P. 6–11.
3. Daria Galimberti. IR spectroscopy of crystalline polymers from ab initio calculations / Claudio Quarti, Alberto Milani, Luigi Brambilla, Bartolomeo Civaleri, Chiara Castiglioni. // *Vibrational spectroscopy.* – 2013. – № 66. – P. 83–92.
4. Garcia-Ochoa F. Xanthan gum: Production, recovery, and properties / Santos V. E., Casas J. A., & Gomez E. // *Bio-technol. Adv.* – 2013. – № 18. – P. 549–579.
5. Giovani L. Zabet. Simulation of the xanthan gum production in continuous fermentation systems / Marcell F. Silva, Lisiane de Marsillac Terra, Edson L. Foletto, Sergio L. Jahn, Valeria Dal Pra, J. Vladimir Oliveira, Helen Treichel, Marcio A. Mazutti. // *Biocatal Agric Biotechnol.* – 2015. – № 1. – P. 301–308.
6. Harshal Ashok Pawar. An Overview of Natural Polysaccharides as Biological Macromolecules: Their Chemical Modifications and Pharmaceutical Applications. / Swati Ramesh Kamat and Pritam Dinesh Choudhary // *Biol Med.* – 2015. – № 7(1). – P. 1–9.
7. Higiroy, J. Rheological study of xanthan and locust bean gum interaction in dilute solution / Herald T.J., Alavi S., Bean S. // *Effect of salt. Int. Food Res. J.* – 2007. – № 40. – P. 435–447.
8. Jansson P.E. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Biosynthesis, structure and physical properties / Kenne L., Lindberg B. // *Carbohydr. Res.* – 2014. – № 45(4). – P. 275–282.
9. Luvielmoa M. de M. Structure of xanthan gum and cell ultrastructure at different times of alkali stress / Borges C.D., Toyamac D. de O., Vendruscolod, C.T., Scamparini A.R.P. // *Braz. J. Microbiol.* – 2016. – № 47. – P.102–109.
10. Mollakhalili Meybodi N. Microbial exopolysaccharides: a review of their function and application in food sciences / Mohammadifar M.A. // *J. Food Qual. Hazards Control.* – 2015. – № 2. – P. 112–117.
11. Rosalam S. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. / England R. // *Enzyme Microb. Technol.* – 2006. – № 39. – P. 197–207.
12. Savvides A.L. «Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium» / Katsifas E.A., Hatzinikolaou D.G., and Karagouni A.D. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – № 28(8). – P. 2759–2764.
13. Shaw A. Multianalyte Serum Analysis using Mid-infrared Spectroscopy / Kotowich S., Leroux M., Mantsch H.H. // *Ann. Clin. Biochem.* – 2012. – № 35. – P. 624–632.
14. Southwick J.G.. Solution studies of Xanthan Gum Employing Quasielastic light Scattering. / McDonnel M.E., Jamieson A.M., Blackwell J. // *Anal. Biochem.* – 2014. – № 19. – P. 119–132.
15. Tapan Kumar Singha. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Production, Isolation and Applications // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2012. – № 2. – P. 276–281.
16. Гашевская А.С. Потенциометрический и карбазол-серный методы определения галактуроновой кислоты в растительных полисахаридах // *Успехи современного естествознания.* – 2016. – № 2. – С. 9–15.