



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* bakterijų
technologija**

Baigiamasis magistro projektas

Erika Davicijonaitė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* bakterijų technologija

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Erika Davicijonaitė
Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė
Vadovė

M. d. dr. Ingrida Tumosienė
Recenzentė

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Erika Davicijonaitė

Ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* bakterijų technologija

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Erika Davicijonaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Davicijonaitė, Erika. Ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* bakterijų technologija. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: ksantanas, *Xanthomonas campestris*, gamybos technologija, mitybiniai šaltiniai, trukmė, koncentracija, schema.

Kaunas, 2022. 64 p.

Santrauka

Pasaulyje siekiant priimti tvaresnius sprendimus, vienas jų yra pakeisti polimerus, gaminamus iš iškastinio kuro, į biopolimerus. Vienas tokių yra ksantanas. Šis biopolimeras gali būti pritaikytas daugelyje pramonės, medicinos, farmacijos, maisto bei kitų sričių dėl savo unikalių reologinių savybių, netoksiškumo ir puikaus suderinamumo su žmogaus organizmu. Optimizuojant pramoninę ksantano gamybą, ateityje galima pakeisti chemine sinteze gaunamus polimerus biopolimeru ksantanu.

Šio tyrimo metu siekta įvertinti įvairių fermentacijos veiksnių įtaką ksantano sintezei, produkto išėigai ir savybėms. Ksantano sintezei iširti pasirinktos *Xanthomonas campestris* bakterijos, nustatyta dešimties anglies mitybinių šaltinių ir trijų azoto mitybinių šaltinių įtaka bakterijų augimui, gaunamo ksantano koncentracijai ir savybėms. Taip pat įvertinta pradinės anglies šaltinio koncentracijos įtaka sintezės procesui bei nustatyta optimali fermentacijos trukmė. Susintetintiems ksantano mėginams atlikti jų savybių tyrimai kaip tirpumas skirtinguose tirpikliuose, struktūros įvertinimas FTIR metodu, bei antioksidacinių savybių įvertinimas Fe (III) redukcijos, FRAP ir DPPH metodais.

Gauti tyrimo rezultatai parodė, kad geriausias alternatyvus gliukozei anglies mitybinis šaltinis buvo stevija, o alternatyvus peptonui azoto mitybinis šaltinis – kalio nitratas. Panaudojus šiuos mitybinius šaltinius ksantano sintezei, po 24 valandų fermentacijos gauta 182,88 g/l ksantano koncentracija. Įvertinus skirtingas fermentacijos trukmes, nuspręsta, kad optimali trukmė buvo 24 valandos. Nustatyta, kad optimali pradinė anglies mitybinio šaltinio koncentracija mitybinėje terpėje buvo 20 g/l.

Antioksidacinių savybių nustatymo metu pastebėta, kad taikant skirtingus redukcinių savybių nustatymo testus gaunami skirtingi rezultatai dėl testo redukcinių savybių nustatymo metodo bei skirtingų terpių. Atlikus FTIR struktūros nustatymą, matyti ksantanui būdingų grupių virpesių absorbcijos juostos: O-H, C-H, C=O, C-O-C ir kitos.

Pagal gautus rezultatus sudaryta rekomenduojama pramoninė ksantano biosintezės schema.

Davicijonaitė, Erika. Technology of Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* Bacteria. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; Chemical Technology Faculty, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological sciences.

Keywords: Xantan, *Xanthomonas campestris*, production technology, nutritional sources, duration, concentration, scheme.

Kaunas, 2022. 64.

Summary

One of the world's most sustainable solutions is to switch from polymers made from fossil fuels to biopolymers. One of these is xanthan. This biopolymer can be applied in many industries, medicine, pharmaceuticals, food and other fields due to its unique rheological properties, non-toxicity and excellent compatibility with the human body. By optimizing the industrial production of xanthan, the replacement of polymers obtained by chemical synthesis with xanthan can be achieved in the future.

The aim of this study was to evaluate the influence of various fermentation factors on xanthan synthesis, product yield and properties. The effect of ten carbon nutrient sources and three nitrogen nutrient sources on bacterial growth, xanthan concentration and properties was determined by study with *Xanthomonas campestris* bacteria. The influence of the initial carbon source concentration on the synthesis process was evaluated and also the optimal fermentation time was determined. The properties of synthesized xanthan samples were investigated as solubility in different solvents, the evaluation of structure by the FTIR method, evaluation of antioxidant properties by Fe (III) reduction, FRAP and DPPH methods.

The results obtained in the study showed that the best alternative source of carbon for glucose was stevia, and the alternative source of nitrogen for peptone is potassium nitrate. Using these nutrient sources for xanthan synthesis, a concentration of 182.88 g/l xanthan was obtained after 24 hours of fermentation. Taking into account the different fermentation times, it was decided that the optimal duration was 24 hours, as longer fermentation does not give significantly better results. The optimal initial concentration of carbon in the nutrient medium was found to be 20 g/l.

During the determination of antioxidant properties, it was observed that the application of different tests for the determination of reducing properties gives different results due to the method of determination of these properties in the test and different operating media. Vibration absorption bands for xanthan - specific groups can be seen from resulting FTIR structure determination: O-H, C-H, C=O, C-O-C and others groups.

Based on the obtained results, a recommended industrial scheme for xanthan synthesis was developed.

Turinys

Paveikslų sąrašas	8
Lentelių sąrašas	9
Santrumpų ir terminų sąrašas	10
Įvadas.....	11
1. Literatūros apžvalga	12
1.1. Biopolimerų apibūdinimas ir jų rūšys	12
1.2. Mikroorganizmai naudojami biopolimerų sintezei	12
1.2.1. <i>Xanthomonas campestris</i> apibūdinimas	12
1.3. Biopolimerų gavimo būdai.....	13
1.4. Ksantano apibūdinimas	14
1.5. Struktūra.....	14
1.6. Savybės.....	15
1.7. Ksantano sintezė ląstelėje.....	17
1.8. Gamybos technologija.....	18
1.8.1. Žaliavos	18
1.8.2. Proceso eiga.....	18
1.8.3. Veiksniai.....	20
1.8.3.1. Mitybinės medžiagos.....	20
1.8.3.2. Naudojamo inokulianto kiekis	22
1.8.3.3. Temperatūros reikšmė procesui	22
1.8.3.4. pH įtaka procesui.....	22
1.8.3.5. Ksantano sintezės kinetika	22
1.8.4. Išgavimas ir gryninimas	23
1.8.5. Imobilizavimas	24
1.9. Alternatyvios žaliavos	25
1.10. Biopolimerų panaudojimas	26
1.10.1. Maisto pramonėje.....	27
1.10.2. Panaudojimas medicinoje ir farmacijoje	28
1.10.3. Kitos ksantano panaudojimo sritys pramonėje	30
1.10.4. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas.....	31
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	32
2.1. Naudojama įranga	32
2.2. Mitybiniai šaltiniai naudoti tyrimui.....	32
2.3. Medžiagos, reagentai naudoti tyrimui.....	34
2.4. Tyrimo eiga	34
2.4.1. Terpių ruošimas.....	34
2.4.2. <i>Xanthomonas</i> mikroorganizmų kultūros padauginimas.....	35
2.5. <i>Xanthomonas</i> kultūros inokulianto paruošimas	35
2.6. Fermentacija	35
2.7. Biomasės koncentracijos nustatymas	36
2.8. pH matavimas.....	36
2.9. Sausos biomasės koncentracijos nustatymas	36

2.10.	Pagaminto ksantano išskyrimas ir masės nustatymas	36
2.11.	Ksantano savybių tyrimai.....	36
2.11.1.	Tirpumas.....	37
2.11.2.	Redukcinių savybių tyrimai	37
2.11.2.1.	Redukuojančių Fe III savybių tyrimas.....	37
2.11.2.2.	Ksantano DPPH radikalo slopinimo bandymas.....	37
2.11.2.3.	Antioksidacinio aktyvumo tyrimas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną.....	38
2.12.	Ksantano struktūros FTIR tyrimas	38
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....		39
3.1.	Biomasės koncentracijos priklausomybės nuo anglies mitybinio šaltinio įvertinimas...	39
3.2.	pH kitimo priklausomybės nuo naudojamo anglies mitybinio šaltinio įvertinimas.....	41
3.3.	Sausos biomasės koncentracijos nuo naudojamo anglies mitybinio šaltinio įvertinimas	41
3.4.	Biosintezės būdu gauto ksantano koncentracijos priklausomybės nuo naudojamo anglies mitybinio šaltinio įvertinimas.....	43
3.5.	Rodiklių priklausomybės nuo azoto mitybinio šaltinio įvertinimas.....	44
3.6.	Mitybinio anglies šaltinio koncentracijos įtakos ksantano gamybai įvertinimas.....	46
3.6.1.	Koncentracijos įtakos biomasės augimui įvertinimas	46
3.6.2.	Anglies mitybinio šaltinio koncentracijos įtakos susintetintam ksantano koncentracijai įvertinimas... ..	48
3.7.	Ksantano mėginių redukcinių savybių tyrimai.....	49
3.7.1.	Fe III redukuojančių savybių įvertinimas.....	49
3.7.2.	Antioksidacinių savybių tyrimas slopinant DPPH junginį.....	50
3.7.3.	Antioksidacinių savybių nustatymas FRAP metodu.....	52
3.8.	FTIR tyrimo rezultatai.....	53
4. Rekomendacijų dalis		55
Išvados		57
Literatūros sąrašas		58
Informacijos šaltinių sąrašas		62
Priedai.....		63
1	Priedas. Ksantano, susintetinto panaudojant sorbitolį kaip anglies mitybinį šaltinį, FTIR spektras.....	63
2	Priedas. Ksantano, susintetinto panaudojant kokosų palmių žiedų cukrų kaip anglies mitybinį šaltinį, FTIR spektras.....	64

Paveikslų sąrašas

1.1 pav. Natūraliai susidarančių polimerų klasifikavimas [1]	13
1.2 pav. Ksantano struktūra [9]	14
1.3 pav. Ksantano ir jo biodegradacijos produkto FTIR spektras [17].....	15
1.4 pav. Ksantano sintezės kelias <i>Xanthomonas campestris</i> mikroorganizmuose [26]	17
1.5 pav. Pramoninė ksantano gamybos schema	20
1.6 pav. Biopolimerų panaudojimo sritys Europoje procentais.....	27
2.1 pav. DPPH radikalo slopinimo reakcija [41].....	38
2.2 pav. FRAP metodo metu vykstantis junginio redukavimas [42].....	38
3.1 pav. Šviesos sugerties ir biomasės koncentracija fermentacinėje terpėje po 24 valandų.....	39
3.2 pav. Šviesos sugerties ir biomasės koncentracija fermentacinėje terpėje po 48 valandų.....	40
3.3 pav. Šviesos sugerties ir biomasės koncentracija fermentacinėje terpėje po 72 valandų.....	40
3.4 pav. Sausos biomasės koncentracija po 24 valandų fermentacijos	41
3.5 pav. Sausos biomasės koncentracija po 48 valandų fermentacijos	42
3.6 pav. Sausos biomasės koncentracija po 72 valandų fermentacijos	42
3.7 pav. Ksantano koncentracija po 24 valandų fermentacijos	43
3.8 pav. Ksantano koncentracija po 48 valandų fermentacijos	43
3.9 pav. Ksantano koncentracija po 72 valandų fermentacijos	44
3.10 pav. Biomasės koncentracijos priklausomybė nuo naudojamo azoto mitybinio šaltinio fermentacijos metu	45
3.11 pav. Sausos biomasės koncentracijos priklausomybė nuo naudojamo azoto mitybinio šaltinio fermentacijos metu	45
3.12 pav. Ksantano koncentracijos priklausomybė nuo naudojamo azoto mitybinio šaltinio fermentacijos metu	46
3.13 pav. Stevijos koncentracijos įtaka biomasės koncentracijos kitimui fermentacijoje.....	47
3.14 pav. Kokosų palmių žiedų cukraus koncentracijos įtaka biomasės koncentracijos kitimui fermentacijoje	47
3.15 pav. Stevijos koncentracijos įtaka sausos biomasės kiekio kitimui fermentacijoje	47
3.16 pav. Kokosų palmių žiedų cukraus koncentracijos įtaka sausos biomasės kiekio kitimui fermentacijoje	48
3.17 pav. Biosintezės būdu gauto ksantano koncentracijos priklausomybė nuo stevijos koncentracijos fermentacijos terpėje.....	48
3.18 pav. Biosintezės būdu gauto ksantano koncentracijos priklausomybė nuo kokosų palmių žiedų cukraus koncentracijos fermentacijos terpėje.....	49
3.19 pav. Redukcinių savybių tyrimo rezultatai anglies šaltinio įtakos vertinimui.....	49
3.20 pav. Redukcinių savybių tyrimo rezultatai azoto šaltinio įtakos vertinimui	50
3.21 pav. DPPH tyrimo rezultatai įvertinant anglies mitybinio šaltinio įtaką.....	51
3.22 pav. DPPH tyrimo rezultatai įvertinant azoto mitybinio šaltinio įtaką	51
3.23 pav. FRAP tyrimo kalibracinė kreivė (FeSO ₄).....	52
3.24 pav. FRAP tyrimo rezultatai įvertinti anglies mitybinio šaltinio įtaką.....	52
3.25 pav. FRAP tyrimo rezultatai įvertinti azoto mitybinio šaltinio įtaką	53
3.26 pav. Ksantano FTIR spektras	53
4.1 pav. Ksantano gamybos principinė aparatūrinė schema.....	56

Lentelių sąrašas

1.1 lentelė. Ksantano panaudojimas maisto pramonėje [2,13].....	28
2.1 lentelė. Medžiagos ir reagentai naudoti tyrimui	34
4.1 lentelė. Ksantano gamybos principinės aparatūrinės schemos žymėjimas.....	55

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos

CoA – kofermentas A;

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;

FRAP – geležies jonus redukuojantis potencialas (angliškai: *ferric ion reducing antioxidant power*).
Parodo junginio antioksidacines savybes redukuojant geležies jonus iš Fe^{3+} į Fe^{2+} ;

FTIR – Furje transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija;

GDP-manozė – guanozindifosfato manozė;

IR – infraraudonieji spinduliai;

YDA terpė – mielių dekstrozės agaro mitybinė terpė (angliškai *Yeast Dextrose Agar*);

LB terpė – mitybinė terpė (angliškai *Luria Broth*);

OD – optinis tankis (angliškai *Optical Density*);

UDP-gliukozė – uridino difosfato gliukozė;

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas;

X. campestris – *Xanthomonas campestris*.

Įvadas

Polimerinės medžiagos, sintetamos panaudojant iškastinius šaltinius, yra plačiai gaminamos, išgaunant įvairius produktus su reikiamomis savybėmis ir pritaikomos nuo kasdienio gyvenimo iki pramonės ir aukštųjų technologijų. Bėgant laikui vis labiau atsigręžiama į iškastinio kuro išteklių mažėjimo ir aplinkosaugos problemas, kurioms turi įtakos minėtųjų polimerų gamyba. Tobulėjant biotechnologijų sričiai, atliekama vis daugiau tyrimų palankių gamtai ir naudojančių atsinaujinančius šaltinius reikiamiems produktams gauti – tai galioja ir polimerų pramonei. Nuo seno žinomi įvairūs augaliniai polimerai. Platus jų pritaikomumas iškėlė idėją, kad natūraliais būdais gali būti gaunami biopolimerai, kurie, ateityje pilnai pakeis gaunamus iš iškastinio kuro polimerus.

Biopolimerai yra draugiški aplinkai, gaminami iš atsinaujinančių medžiagų ir jų irimo metu išsiskiriantis CO₂ nedidina jo kiekio aplinkoje, nes gamyboje naudojami atsinaujinantys šaltiniai formuodamiesi anglį paima būtent iš atmosferinio CO₂. Taip pat biopolimerų gyvavimo laikas yra beveik toks pats kaip ir įprastų polimerų ir jie suyra tik esant tam tikroms sąlygoms aktyvuojančioms jų yrimą. Jų nereikia perdirbti, kam reikalingos sudėtingos ir brangios technologijos. Vienas biopolimerų trūkumas – jų išgavimo ir gamybos technologijų sudėtingumas ir dėl to didesnė gaunamo produkto kaina.

Šiame projekte nagrinėjamas biopolimeras ksantanas, kuris yra gaunamas biosintezės būdu iš mikroorganizmų. Plačiau aptarsime mikroorganizmus, polimerinių medžiagų susidarymą juose, tam reikiamas sąlygas, jų kitimo aspektus, polimerinių medžiagų išgavimą ir polimerų gamybą bei panaudojimą [1].

Tyrimo tikslas – optimizuoti ksantano gamybos technologiją, panaudojant *Xanthomonas campestris* bakterijas.

Tyrimo uždaviniai:

1. optimizuoti ksantano gamybą *X. campestris* bakterijomis, parenkant skirtingus anglies ir azoto mitybinius šaltinius fermentacinėje terpėje;
2. įvertinti ksantano gamybą *X. campestris* bakterijomis, parenkant skirtingą fermentacijos trukmę;
3. ištirti ksantano gamybą *X. campestris* bakterijomis, parenkant skirtingą pradinę anglies mitybinio šaltinio koncentraciją;
4. išanalizuoti skirtingai susintetinto ksantano mėginių antioksidacinį aktyvumą Fe (III) redukcijos, DPPH ir FRAP metodais;
5. atlikti ksantano struktūros įvertinimą FTIR metodu.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Biopolimerų apibūdinimas ir jų rūšys

Biopolimerais vadinami tokie polimerai, kurie yra gaunami iš augalų, gyvūnų ar mikroorganizmų arba yra bioskaidūs, t. y. per kurį laiką gali pilnai suirti gamtoje, veikiant mikroorganizmams ar vykstant cheminėms irimo reakcijoms. Biopolimerai skirstomi į gaunamus iš atsinaujinančių šaltinių, bioskaidžius ir tuos, kuriems būdingos abi šios savybės [1].

Biopolimerai gaunami iš didelės įvairovės medžiagų: nuo vėžiagyvių pagaminto chitozano, augalinės ar mikrobiologinės kilmės ksantano dervos iki krakmolo ir baltymų, kaip kazeinas bei želatina, pagrindu pagamintų polimerų [1].

Bioskaidūs polimerai dar yra skirstomi į:

- tiesiogiai biologiškai skaidomi polimerai;
- autooksiduojami polimerai, kurie paskui biologiškai suyra;
- vandenyje tirpūs polimerai;
- naujos natūralių polimerų formos;
- fotodegraduojami polimerai [1].

Vienas iš bioskaidumo standartų yra ISO/IEC 17025:2017.

Šiame darbe nagrinėjamas polimeras – ksantanas – yra polisacharidas. Polisacharidai gali būti homopolisacharidai – sudaryti iš vienos rūšies monosacharidų, ir heteropolisacharidai – sudaryti daugiau nei iš vienos rūšies monosacharidų. Ksantanas yra heteropolisacharidas. Polisacharidai gali pasižymėti priešvėžinėmis, antimikrobinėmis, imunoreguliacinėmis, hipoglikeminėmis savybėmis. Taip pat jie gali būti plačiai pritaikomi įvairiose pramonės šakose [2].

1.2. Mikroorganizmai naudojami biopolimerų sintezei

Biopolimerų sintezei gali būti pritaikomos įvairios ląstelės: bakterijos, dubliai, grybai, mielės ir t. t. Tam pačiam tiksliniam produktui gauti gali būti naudojami skirtingi mikroorganizmai, priklausomai nuo siekiamos produkto sudėties, struktūros, savybių ar procesui vykdyti parankiausių sąlygų, prieinamų mikroorganizmų ar ekonominių sumetimų.

Ksantano gamybai naudojamos *Xanthomonas* kamienų fitopatogeninės bakterijos. Tai gali būti *X. campestris*, *X. axonopodis*, *X. hortorum* ir kiti kamieniai. Nuo naudojamo kamieno priklauso gaunamo ksantano struktūra – monomerų santykis joje. Pramonėje plačiausiai naudojamos *Xanthomonas campestris* bakterijos [3,4].

1.2.1. *Xanthomonas campestris* apibūdinimas

Xanthomonas campestris yra dažniausiai pramonėje naudojamos iš *Xanthomonas* rūšies bakterijų, nes jos išsiskiria tuo, kad kaip anglies šaltinį gali naudoti platų angliavandenių spektrą [5].

Xanthomonas campestris priklauso *Pseudomonaceae* šeimai. Jie yra augalų patogenai, sukeltys įvairių augalų ligas, dėl kurių kasmet yra prarandamas didelis kiekis derliaus. Tai pailgos formos ląstelės, judrios, gramneigiamos bakterijos, turinčios vienpolį žiuželį.

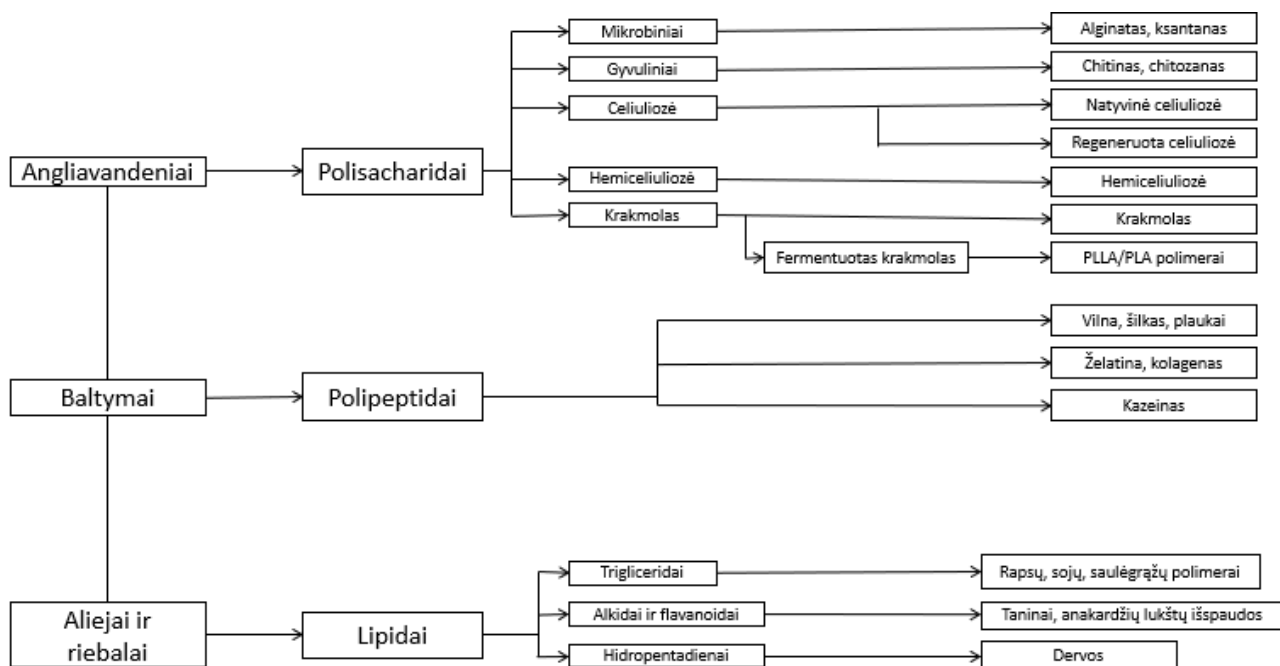
Bakterijos yra chemoorganotrofės, kurių metabolizmui yra būtinas deguonis, panaudojamas kaip galutinis elektronų akceptorius. *Xanthomonas campestris* yra teigiamos katalazei, neigiamos oksidazei, ant standžios terpės sudaro geltonas, lygias, blizgias kolonijas. Sugeba oksiduoti gliukozę pentozės-fosfatiniu keliu. Pagrindinis sintetinamas polisacharidas – ksantanas.

Išskiriami trys *X. campestris* kamienai – mažos (angliškai: *small* – s), labai mažos (angliškai: *very small* – vs) ir didelės ląstelės (angliškai: *large* – l). Didelių ląstelių kamienas yra dažniausiai naudojamas pramoniniais tikslais.

Xanthomonas bakterijas galima ilgą laiką išsaugoti jas liofilizuojant arba šaldant su gliceroliu. Bakterijoms reikalinga kompleksinė mitybinė terpė. Mikroorganizmai gali augti nuo 25 °C iki 30 °C temperatūroje, bet optimali – 28 °C temperatūra [4].

1.3. Biopolimerų gavimo būdai

Biopolimerų sintezė skirstoma į du tipus – tai natūraliai susidarantys ir žmogaus pagaminami biopolimerai. Natūraliai susidarantys biopolimerai yra makromolekulės sintetamos gyvoje organizmo ląstelėje, susijungiant kelioms mažesnėms molekulėms, pavyzdžiui baltymo sintezė iš aminorūgščių bei DNR susidarymas iš nukleotidų. Natūralių polimerų susidarymas vyksta fermentams katalizuojant polimerinės grandinės augimo reakcijas. Natūralūs polimerai apima angliavandenius, baltymus, aliejus ir lipidus. Gyvūnų sintetinami biopolimerai yra audinius jungiantis heliuronas, keratino sulfatai ir kt. [1].



1.1 pav. Natūraliai susidarantių polimerų klasifikavimas [1]

Biopolimerų gamybos sąlygas apunkina tai, kad biologinės struktūros, iš kurių jie yra gaminami, turi apibrėžtas aplinkos sąlygas, kurioms esant jos išlieka nepakitusios. Toks pavyzdys būtų temperatūra:

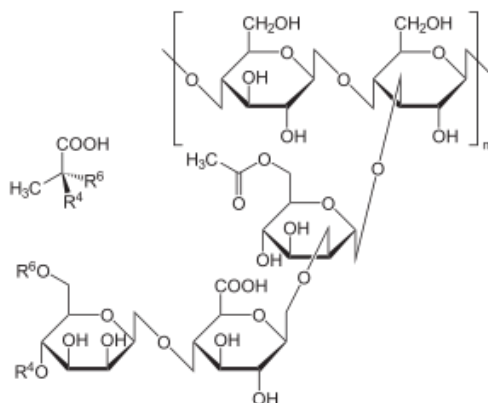
norint, kad vyktų polimerizacija, reikia pasiekti tam tikrą temperatūrą, kurioje gali vykti reakcija, bet jei temperatūra pakils per daug – įvyksta junginio denatūracija [1].

1.4. Ksantano apibūdinimas

Ksantanas yra pirmasis susintetintas bakterinis heteropolisacharidas. Pramonėje pagrinde gaunamas aerobinės fermentacijos keliu, panaudojant *Xanthomonas campestris* mikroorganizmus. Tai anijoninis polisacharidas, kuriam būdinga didelė molekulinė masė [3,6,7].

1.5. Struktūra

Ksantanas yra pentasacharidas, sudarytas iš *D*-gliukozės, *D*-manozės ir *D*-gliukurono rūgšties santykiu 2:2:1 [8]. Pagrindinė grandinė susideda iš β -*D*-(1,4)-gliukozės, prie kurios prisijungusios išsišakojusios trisacharidinės grandinės, sudarytos iš β -*D*-(1,2)-manozės ir β -*D*-(1,4)-gliukurono rūgšties [7]. Funkcinės ksantano acetato ir piruvato grupės gali būti prijungtos prie *D*-manozės vienetų [8]. Vienas iš ksantano privalumų yra tas, kad jo monomerinę sudėtį galima kontroliuoti pasirenkant skirtingus *Xanthomonas* kamienus ir fermentacijos sąlygas [3].



1.2 pav. Ksantano struktūra [9]

Sintetinio ksantano struktūra priklauso nuo pasirinkto mikroorganizmo, nes kiekvieno kamieno sintetinė struktūra yra savita. Ji gali kisti nuo netvarkingai susivyniojusios viengrandės struktūros iki dvigrandžių šakotų spiralių [10,11].

Skirtingos augimo fazės, augimo terpės sudėties pasikeitimas (skirtingi anglies ir azoto substratai), nedaro įtakos pirminei ksantano pagrindo struktūrai, tačiau turi įtakos šoninių grandinių struktūrai, molekulinėi masei ir išėigai [12,13].

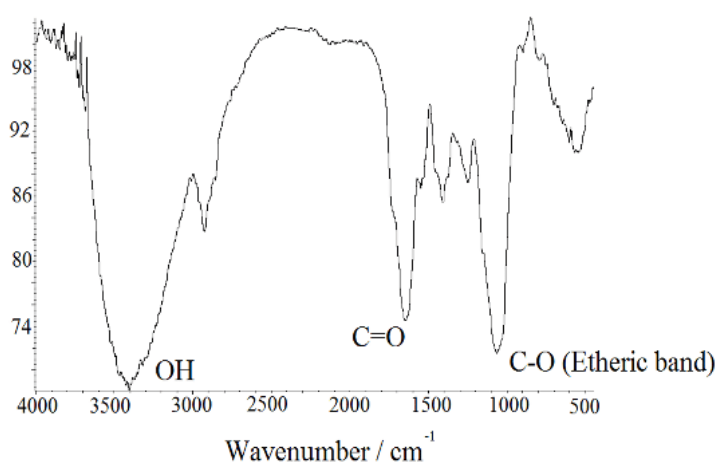
Proceso metu gaunamo polimero molekulinė masė priklauso nuo susidarančių ryšių tarp grandinių, suformuojant iš kelių molekulių vieną. Ksantanui būdingos įvairios molekulinės konfigūracijos ir dėl savito anijoninio pobūdžio. Įprastai molekulinė masė svyruoja nuo 2×10^6 iki 20×10^6 Da (apie 933 g/mol), bet gali siekti ir 13-15 milijonų Da. Gamyboje naudojami fermentacijos sąlygų pokyčiai yra vieni iš veiksnių, nulemiančių susidarančios molekulės dydį [4,13,14,15].

Ksantano molekulė gali turėti dvi konformacijas – spiralinę ir atsitiktinai susivyniojusią (netvarkingą). Spiralinė struktūra stabilizuojama nekovalentinėmis jungtinėmis ir gali susidaryti keičiant temperatūrą ar jonines jėgas, dažniausiai pasireiškia vandeniniuose tirpaluose [4,7,8].

Ksantanas turi daug reaktyvių funkcinių grupių, tokių kaip hidroksilo ir karboksi grupės. Jos gali dalyvauti įvairiose reakcijose, šias grupes galima modifikuoti, taip pagerinant fizikines ir chemines savybes bei padidinti šios medžiagos pritaikomumą [8].

Dėl minėtųjų priežasčių periodinio kultivavimo metu gaunamas ksantanas yra įvairių jo formų mišinys, nes gaunamas panaudojant skirtingus mikroorganizmus, iš skirtingų augimo etapų ir kintančių mitybinės terpės ir aplinkos savybių. Pavyzdžiui, ribojant magnį ar fosfatą, gaunamas ksantanas turi mažą kiekį piruvato. Kadangi skirtingos sąlygos reikalingos mikroorganizmų augimui ir ksantano sintezei, ieškoma optimalios terpės, kuri tenkintų abiejų stadijų poreikius [13].

Ksantano struktūra gali būti patvirtinta naudojant FTIR tyrimą. Tiriant ksantano struktūrą FTIR metodu matuojama mėginio sugertis IR spektre tarp 400 cm^{-1} ir 4000 cm^{-1} bangos ilgyje [16].



1.3 pav. Ksantano ir jo biodegradacijos produkto FTIR spektras [17]

Spektre matoma plati absorbcijos juosta apie 3400 cm^{-1} , kuri būdinga hidroksi- grupės O-H jungties virpesiams. Apie 2900 cm^{-1} esanti absorbcijos juosta priklauso alifatiniams C-H virpesiams. Absorbcijos juosta apie 1700 cm^{-1} gali rodyti karboksilo grupės virpesius, o apie 1600 cm^{-1} priklauso C=O jungčiai piruvato grupėse. Sugerties juostos esančios apie 1500 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} ir 1100 cm^{-1} gali rodyti atitinkamai C=C, C-H ir C-O-C jungčių virpesius. Absorbcijos juostos tarp 1000 cm^{-1} ir 500 cm^{-1} gali priklausyti =C-H, C-O, O-H ir C-C jungtims [16].

1.6.Savybės

Ksantanas yra hidrokoloidas ir puikiai tirpsta tiek šaltame, tiek karštame vandenyje, bet jam būdingas didelis klampumas. Sausas ksantanas yra kreminės spalvos ir bekvapis. Polimeras yra stabilus plačiame temperatūros ir pH diapazone, taip pat didelėse druskų koncentracijose, be to gali būti gerai suderinamas su daugeliu metalų druskų, biologiniais audiniais. Ksantanas pakankamai atsparus mechaniniam ardymui. Šis polimeras yra netoksiškas, biologiškai skaidus, nesunkiai išgaunamas. Taip pat pasižymi antioksidacinėmis savybėmis [7,8,13,14,16,18].

Dėl natūralios kilmės šis hidrokoloidas yra biologiškai skaidomas vykdant fermentinę hidrolizę. Jo neveikia celiuliazės, nors pastarasis ir yra labai panašios struktūros į celiuliozę. Lengviau ksantanas suardomas kai būna netvarkingos konformacijos. Esant neutralioms ar rūgštinėms sąlygoms jis išlieka

stabilus, bet šarminėje aplinkoje hidrolizuojasi esterinės jungtys. Jis nevirškinamas žmogaus organizme, bet kaip maisto priedas gali sumažinti kalorijų kiekį ir pagerinti medžiagų keliavimą per virškinamąjį traktą [8,19].

Nuo kitų biopolimerų skiriasi tuo, kad pasižymi aukštu pseudoplastiniu laipsniu. Jo tirpalai yra didelės klampos (600–2000 ppm) kambario temperatūroje, net esant ir mažoms koncentracijoms [3,13,20]. Temperatūra daro įtaką tirpalo klampai, kontroliuodama molekulių konformaciją ir struktūrą [4]. Įprastai klampumas mažėja temperatūrai didėjant, bet susiduriama su atvirkščiu procesu temperatūrai kylant nuo 10 °C iki 80 °C. Tai siejama su tvarkingos struktūros, egzistuojančios prie mažesnės temperatūros, perėjimu į netvarkingą struktūrą. Šio proceso metu šoninės grandinės plečiasi, tolsta nuo pagrindinės grandies ir didėja polimero tūris [19,21]. Pseudoplastinės reologinės savybės susijusios su natūraliai susidarantiomis standžiomis jungtinis tarp ksantano grandinių. Dėl šių savybių ksantano tirpalai dažnai elgiasi kaip niutoniniai skysčiai. Norint gauti stabilius gelius ar emulsijas, skatinamas tokių jungčių susidarymas ir tinklinės struktūros suformavimas [8].

Ksantano toksikologinės savybės yra plačiai ištirtos ir nustatyta, kad jis nėra toksiškas ir neslopina augimo, nesukelia odos ir akių jautrumo ar sudirginimo. Dėl to gali būti naudojamas maisto ir farmacijos pramonėje be jokių konkrečių kiekio ribojimų [8].

Ksantano hidrogeliai yra trimačiai hidrofiliniai polimeriniai tinklai, turintys įvairias hidrofilines grupes prijungtas prie pagrindinės grandinės, todėl jie gali išbrinkti, bet neištirpti. Gebėjimas brinkti yra svarbiausia hidrogelių savybė, kuri tiesiogiai priklauso nuo krūvių tankių ir jungčių kiekio tarp molekulių. Hidrogeliai pasižymi savybėmis kaip struktūros grįžtamumas ir biosuderinamumas. Dėl didelio lankstumo jie labai panašūs į natūralius audinius. Absorbavę didelį kiekį vandens jie gali sąveikauti su biologinėmis sistemomis. Taip pat dideliame tūryje vandens hidrogelis gali jį sorbuotis, kol galiausiai ištirpsta ir vėl tampa tirpalu [4,22].

Dėl unikalios savo sudėties, ksantanas pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Prie to prisideda ksantano struktūroje esančios laisvos piruvo liekanos. Nustatyta, kad mažos molekulinės masės ksantano derva gali sumažinti oksidacinį stresą ląstelėse. Taip pat, ksantano oligosacharidai, pagaminti hidrolizuojant komercinį ksantaną su vandenilio peroksidu šarminiame tirpale, pasižymi dideliu hidroksilo radikalų sulaikymo aktyvumu. Moksliniuose straipsniuose tiriamos ksantano redukcinės savybės DPPH, superoksido jonų ir geležies jonų redukcijos metodais. Redukcinių savybių pasireiškimas didėjo keliant ksantano koncentraciją tirpale, bei mažinant ksantano molekulių dydį [16].

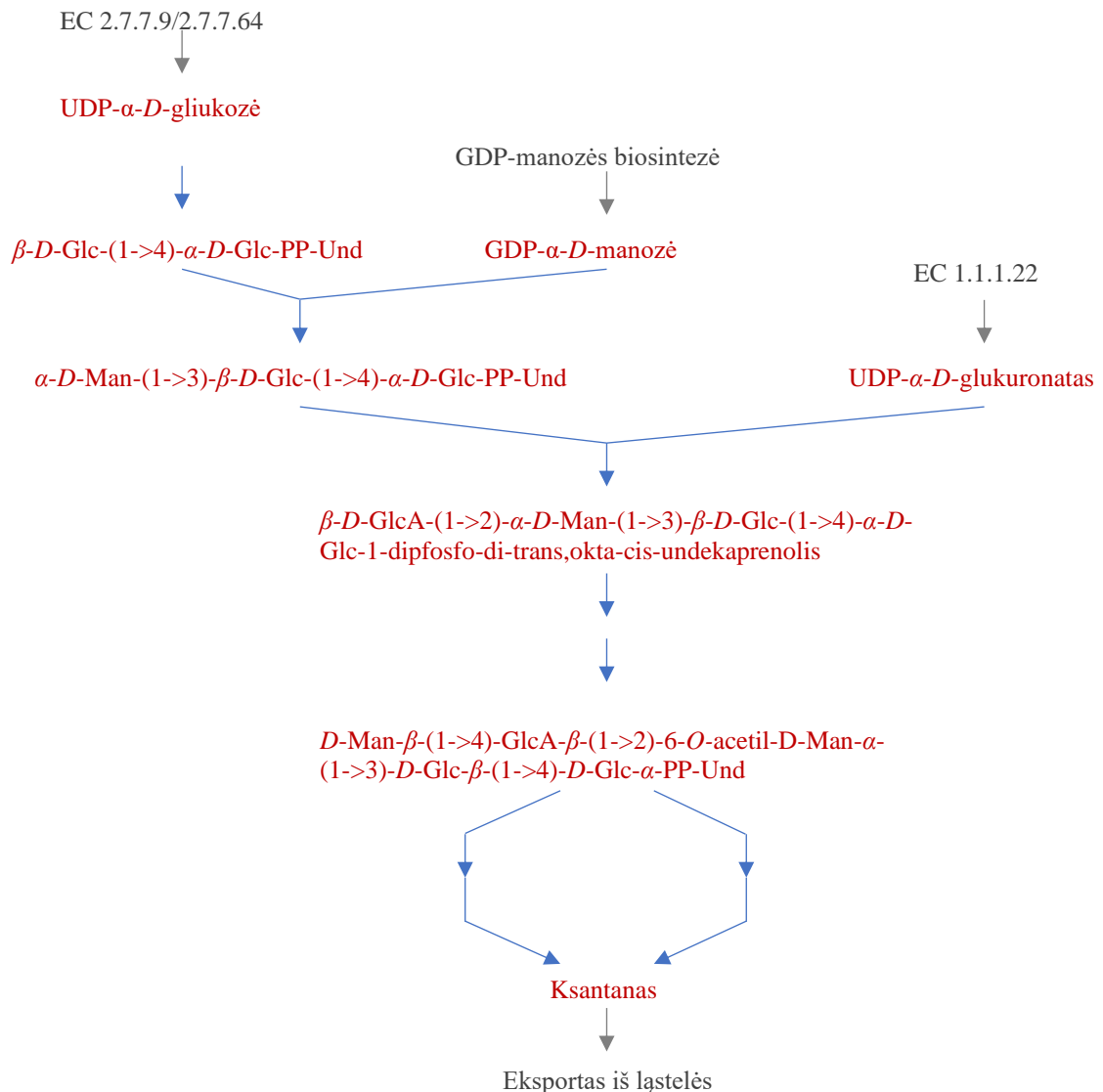
Ksantano plėvelės pasižymi nestipriomis antibakterinėmis savybėmis. Tai gali būti dėl polimerizacijos metu likusių laisvų citrinų rūgšties molekulių, kurios naudojamos sudaryti skersinius ryšius ksantano tinkle – kuo daugiau citrinų rūgšties panaudojama tinklinimo reakcijai, tuo tankesnis hidrogelis gaunamas [23,24]. Ksantano sudėtyje gali būti ir imidazolo žiedų, kurie yra katijonai ir suteikia antibakterinių savybių, nes hidrofobiškai ir elektrostatiškai sąveikauja su bakterijų citoplazmine membrana: žiedo struktūra prasiskverbia į bakterijos ląstelę ir gali prisijungti bei destabilizuoti bakterinę DNR. Ksantanas gali paveikti ir bakterijų membranos pralaidumą bei neleisti susiformuoti bakterijų plėvelėms [21,25].

1.7. Ksantano sintezė ląstelėje

Ksantano sintezė panaši į kitų egzopolisacharidų sintezę gramneigiamose bakterijose. Sintezės kelias gali būti suskirstomas į tris pagrindines dalis:

- 1) paprastųjų cukrų įsisavinimas ir jų pavertimas nukleotidiniais dariniais;
- 2) pentasacharido subvienetų, pritvirtintų prie izopentilo pirofosfato nešiklio, surinkimas;
- 3) pentasacharidų polimerizacija ir jų sekrecija [13].

Ksantano struktūros pagrindas susidaro nuosekliai jungiantis *D*-gliukozės-1-fosfatui ir *D*-gliukozei iš uridino difosfato gliukozės (UDP-*D*-gliukozė). Po to *D*-manozė ir *D*-gliukurono rūgštis prijungiamos atitinkamai iš guanozindifosfato manozės (GDP-manozės) ir UDP-gliukurono rūgšties. *O*-acetilo grupės perkeliamos iš acetil-CoA prie vidinės manozės liekanos, o piruvatas iš fosfoenolpiruvato pridedamas prie galinės manozės. Kiekvienam iš šių etapų reikia specifinių substratų ir fermentų. Jei substrato ar fermento nėra, tai tas žingsnis nevyks [10,13].



1.4 pav. Ksantano sintezės kelias *Xanthomonas campestris* mikroorganizmuose [26]

X. campestris gliukozės katabolizmo mechanizmas dažniausiai vyksta per Enterio-Douderoffo kelią kartu su trikarboksirūgšties ciklo keliu. Susidaręs polisacharidas yra gabenamas per periplazmą bei išorinę membraną ir galiausiai pašalinamas į tarpląstelinę aplinką [10,13].

1.8. Gamybos technologija

Pramonėje ksantano gamyba dažniausiai atliekama paprastuose maišymo fermentatoriuose. Komerciniams tikslams ksantanas įprastai gaunamas panaudojant sacharozę ir gliukozę kaip mitybinius anglies šaltinius. Jų kainos yra tendencingai kylančios, todėl neretai ieškoma ir alternatyvių žaliavų, kurios galėtų būti pritaikytos šiam procesui [5].

Ksantano gamyba plačiam pramoniniam pritaikymui turi pranašumų prieš kitus cheminius junginius, nes nevyksta tokia didelė įrangos korozija, taikomos švelnios reakcijos sąlygos, mažesnė tarša, gaunamas bioskaidus produktas, procesas nereikalauja didelio energijos suvartojimo, taip pat nėra reikalinga labai sudėtinga įranga [16].

Fermentacija pramonėje vykdoma dažniausiai naudojant *Xanthomonas* rūšies mikroorganizmus, o proceso metu yra nustatytos dvi fazės:

- trofofazė – kai ląstelių augimas yra greitas, bet ksantano susidarymas lėtas;
- idiofazė – kai ląstelių augimas lėtas, bet didelis ksantano susidarymas [7].

Pirmosios fazės metu yra skatinamas biomasės augimas, o antrosios – ksantano gamyba. Šie procesai priklauso nuo daugelio veiksnių, taikomos skirtingos technologijos, žaliavos ir proceso sąlygos. Visa tai plačiau aptarsime šiame skyriuje.

1.8.1. Žaliavos

Dažniausiai pramoninėje ksantano gamyboje, kaip mitybiniai anglies šaltiniai yra naudojamos gliukozė ir sacharozė. Jas naudojant gaunamas aukštos kokybės produktas bei didelė jo išeiga [6]. Šiuo metu ksantano gamyba yra vystoma kaip anglies šaltinių naudojant ir įvairius alternatyvius angliavandenius: krakmolą bei jo hidrolizatus, kukurūzų sirupą, hidrolizuotus ryžius, miežių ir kukurūzų miltus, rūgščias išrūgas, cukranendrių melasą, kokosų sultis, cukranendres, burokėlių melasą ir kt. [20]. Deja, ir toliau kylant įvairių substratų kainoms, didėja susidarantys ksantano produkcijos kaštai, todėl šiuo metu atliekama alternatyvių šaltinių paieška ir įvairūs tyrimai, siekiant rasti pigesnes ir svarbiausias, tvarias žaliavas [6].

Prieš pradėdant fermentaciją, substratas yra apdorojamas – dažniausiai taikoma rūgštinė arba fermentinė hidrolizė [6]. Jei žaliava yra krakmolinga ar turinti celiuliozės, tai vykdamas jos fermentinę hidrolizę yra pasitelkiami pektinazių ir celiuliazų mišiniai, vėliau amilazės ir gliukamilazės [5].

1.8.2. Proceso eiga

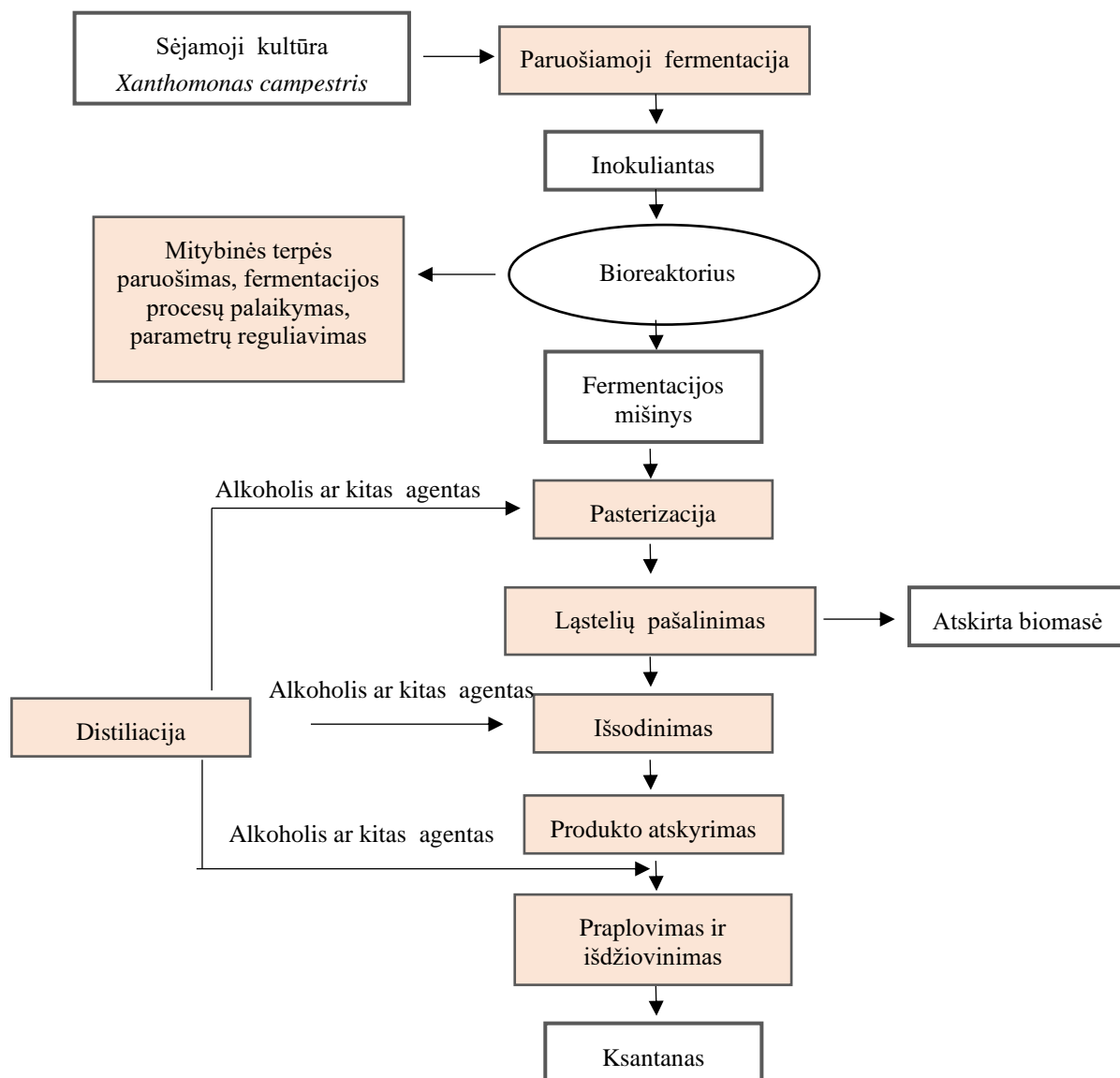
Pramoninė ksantano gamyba susideda iš keleto stadijų. Pirmiausia pasirenkamas mikroorganizmas, kuris bus naudojamas gamybai. Kamienas yra paruošiamas ilgalaikiam saugojimui, kad būtų galima bakterijas vėliau padauginti ir toliau naudoti. Tai daroma įvairiais patikrintais metodais, tinkančiais konkrečiam mikroorganizmui, taip išsaugant norimas jo savybes [4].

Ruošiant *Xanthomonas* inokuliantą tolesniam procesui, svarbus ksantano sintezės slopinimas. Ksantanas sudaro bakterijų kapsules, todėl jo kiekis tiesiogiai priklauso nuo mikroorganizmų dauginimosi ir augimo. Ruošiant inokuliantą stengiamasi didinti ląstelių dauginimosi spartą ir sumažinti ksantano produkciją jose. Tai atliekama siekiant sumažinti maistinių medžiagų pernašos į ląstelės vidų slopinimą, nes susintetintas ksantanas išskiriamas į tarpląstelinę terpę ir didina jos klampą. Dėl terpės klampėjimo dažniausiai taikomi keli etapai inokulianto paruošimui.

Nuo standžios terpės paviršiaus mikroorganizmai perkeliama į kompleksinę mitybinę, nedidelio tūrio terpę (dažniausiai YDA) ir inkubuojami iki 7 valandų, siekiant išvengti didelės ksantano produkcijos. Pradinis inokuliantas tada perkeliama į didesnę mitybinę terpę tūrį, kurioje yra daugiau neorganinių druskų. Ląstelės prisitaiko prie naujų sąlygų ir prasideda ksantano gamyba. Pilnas inokulianto paruošimas užtrunka apie 48 valandas, proceso metu palaikant 30 °C temperatūrą. Dažniausiai tolesnei produkcijai naudojamas 5-10% nuo viso fermentacijos tūrio inokulianto kiekis [4,27].

Ksantano gamybai galima naudoti periodinę, pusiau nepertraukiamą arba nepertraukiamą fermentaciją. Paruoštas inokuliantas perkeliama į bioreaktorių, kuriame gali vykti fermentacija imobilizuotomis arba neimobilizuotomis bakterijų ląstelėmis. Fermentacija dažniausiai vykdoma apie 30 °C temperatūroje 72 valandas maišant. Dažnai reikalingas šviežios maistinės terpės papildymas. Neretai taikoma ir fermentacijos terpės aeracija, kuri palaikoma didesnė nei 0,3 (v/v) [13,27,28]. Ksantano gamybai ir mikroorganizmų augimui bioreaktoriuje įtaką daro tokie veiksniai kaip bioreaktoriaus tipas, pradinė terpės sudėtis, fermentacijos sąlygos (pH, temperatūra, ištirpusio deguonis koncentracija) ir naudojamas kamienas [4].

Pasibaigus fermentacijai yra gaunamas mišinys, kuriame yra produktas, nesunaudotos mitybinės medžiagos, ląstelės ir šalutiniai produktai. Fermentacijos mišinys gali būti pasterizuojamas. Tada yra atskiriamos ląstelės nuo terpės, dažniausiai panaudojant centrifugavimą – išsodinimą išcentrine jėga. Gautas supernatantas yra paveikiamas su vandeniu nesimaišančiu tirpikliu ir sukeliama polimerinių ksantano molekulių išsėdimas. Gautas mišinys gali būti centrifuguojamas dar kartą arba nusėdęs ksantanas atskiriamas filtracija. Išgautas ksantanas yra surenkamas, perplaunamas, išdžiovinamas, smulkinamas ir supakuojamas [27]. Pagrindiniai vykdomi proceso žingsniai pateikti schemoje (žiūrėti 1.5 pav).



1.5 pav. Pramoninė ksantano gamybos schema

1.8.3. Veiksniai

Ksantano gamybos produktyvumui daro įtaką tokie veiksniai kaip anglies ir azoto šaltiniai, jų santykis, temperatūra, pH ir fermentacijos trukmė, inokulianto kiekis, maišymo greitis, ištirpusio deguonies koncentracija, oro srauto greitis ir bioreaktoriaus dizainas. Visi šie veiksniai nulemia gaunamo ksantano sudėtį, tankį ir molekulinę masę [3,6,7].

1.8.3.1. Mitybinės medžiagos

X. campestris augimui terpėje turi būti keletas mitybinių medžiagų, tarp jų mikroelementų (kalis, kalcis, geležis) ir makroelementų, kaip anglis ir azotas. Anglies šaltiniais dažniausiai naudojami gliukozė ir sacharozė [4], bet gali būti naudojamos ir kitos alternatyvios mitybinės medžiagos ar jų hidrolizatai. Vykdamt žaliavų hidrolizę į redukuotus cukrus, svarbu atsižvelgti ne tik į susidarantių cukrų kiekį, bet ir į kitus junginius, kurie gali veikti kaip inhibitoriai fermentacijos procese –

pavyzdžiui furfurolas, įvairios rūgštys ir fenolinės medžiagos. Jiems pašalinti po fermentacijos yra vykdoma detoksikacija – jos metu pašalinama apie 80-90% pašalinių junginių [6].

Skirtingi anglies šaltiniai turi įtakos ksantano sintezei ir galutinei jo struktūrai. Įvairiuose moksliniuose straipsniuose geri rezultatai buvo pasiekti panaudojant skirtingus anglies šaltinius. Rezultatai nėra vienodi dėl naudojamų skirtingų mikroorganizmų kamienų, skirtingos mitybinės terpės sudėties (nevertinant anglies šaltinio) bei fermentacijos sąlygų. Nagrinėtuose straipsniuose geriausi rezultatai gauti naudojant sacharozę, gliukozę, maltozę ar krakmolą [12,13].

Viena iš mitybinės terpės sudėties charakteristikų turinti įtakos ksantano produkcijai yra anglies šaltinio koncentracija pradinėje fermentacijos terpėje [4]. Siekiant nustatyti cukraus koncentracijos poveikį šiam procesui, iširtos įvairios jo pradinės koncentracijos fermentacijos terpėje. Cukrūs yra naudojami ląstelių augimui ir formavimuisi kaip statybinė medžiaga, taip pat energijai reikalingai biosintzei vykdyti ir pačio ksantano gamybai. Didėjant cukrų koncentracijai, didėja gaunamo produkto kiekis, bet kai pasiekama tam tikra substrato koncentracija, jis pradeda inhibuoti vykstančią reakciją ir produkto sintezė sumažėja. Geriausi rezultatai pasiekti, kai buvo naudojama apie 20 g/l cukrų koncentracija [3,5]. Kituose šaltiniuose minima, kad geriausi rezultatai pasiekiami su 2-4 % pradine koncentracija nuo visos terpės tūrio. Didesnė koncentracija pradeda slopinti mikroorganizmų augimą [4].

Maistinių medžiagų koncentracija turi įtakos ne tik susidarančio produkto kiekiui, bet ir jo savybėms bei struktūrai. Didžiausias ksantano tankis pasiekiamas, kai yra maža substrato koncentracija. Procesas vysta daug lėčiau, bet, formuojantis struktūrai, į ją mažai įsiterpia substrato molekulių, todėl gaunamas didesnis tinklinės struktūros tankis. Naudojant apie 4 % substrato koncentraciją pradinėje terpėje pasiektas didžiausias ksantano tankis [3].

Kitas svarbus elementas ksantano sintezėje yra azotas. Jo šaltinis gali būti mineralinis arba organinis [4]. Panaudojant skirtingus azoto šaltinius taip pat gaunami skirtingi produkcijos kiekio ir savybių rezultatai. Gali būti naudojami organiniai (mielių, mėsos ekstraktai, kazeino hidrolizatas ar peptonas) arba neorganiniai (NH_4Cl , NaNO_3 , KNO_3 ir $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) azoto šaltiniai. Nagrinėtame moksliniame straipsnyje geriausi rezultatai gauti naudojant natrio nitrata kaip pagrindinį azoto šaltinį. Įvairiuose šaltiniuose dažnai minima, kad natrio nitratas ir amonio fosfatas gali būti lengvai pritaikomi ksantano sintezei ir gaunami geri rezultatai. Iš organinių šaltinių geriausiai pasirodantis yra peptonas, nes susidaro daugiausiai biopolimero. Panaudojant peptoną ir mielių ekstraktą gaunamos geriausios reologinės polimero savybės [12]. Vieno mokslinio tyrimo metu nustatyta, kad vienas potencialiausių dirbtinių azoto šaltinių ksantano gamybai yra glutamatas [4]. Azoto koncentracija mitybinėje terpėje fermentacijos metu taip pat turi įtakos ksantano išėigai [29].

Pramoninėje ksantano gamyboje yra svarbus ir anglies/azoto santykis pradinėje fermentacijos terpėje. Paprastai C/N santykis ksantano sintezės terpėje yra naudojamas mažesnis, nei tas kuris naudojamas mikroorganizmams auginti. Nustatyta, kad naudojant mažesnę anglies ir azoto santykį terpėje padidėja gaunamo ksantano produkcijos kiekis [4]. Vieno tyrimo metu geriausi rezultatai pasiekti, kai buvo naudojamas 60:1 santykis, kadangi azotas yra svarbus tik biomasės augimui, bet nereikalingas pačio ksantano sintezei. Esant dideliame azoto kiekiui vyksta spartus biomasės augimas, bet ne tokia efektyvi ksantano sintezė, o sumažinus azoto kiekį, pristabdomas biomasės augimas ir labiau skatinama produkto gamyba [5,19].

1.8.3.2. Naudojamo inokulianto kiekis

Didžiausias tikslinio produkto išgavimas pasiektas naudojant 10 % inokulianto tūrio nuo visos terpės [5]. Tyrimai parodė, kad inokulianto kiekis ir maišymo greitis šiame procese yra tiesiogiai susiję. Didinant inokulianto kiekį geriausi rezultatai pasiekiami didinant ir maišymo greitį, o sumažinus inokulianto kiekį geriausia yra sumažinti ir maišymo greitį. Tai gali būti paaiškinama tuo, kad esant didesniam inokulianto kiekiui, maišymas labiau reikalingas mikroorganizmams pasiekti maistines medžiagas, terpę labiau prisotinti deguonimi. Šie rodikliai priklauso nuo mikroorganizmo kamienų, kurie naudojami fermentacijai ir kinta tarp jų [3].

1.8.3.3. Temperatūros reikšmė procesui

Svarbus veiksnys yra temperatūros įtaka ksantano gamybai. Naudojamos temperatūros ribos yra nuo 24 °C iki 35 °C. Dažniausiai taikoma 28 °C ir 30 °C temperatūra. Tyrimais nustatyta, kad daugiausia ksantano susidaro esant 28 °C. Nors buvo nustatyta, kad, temperatūrai kylant nuo 25 °C iki 35 °C, ksantano produkcija gali padidėti iki 10 kartų, tačiau reikia paminėti, kad mažėja acetatų ir piruvato kiekis galutinėje struktūroje. Kai kuriais atvejais siekiama, kad produkto sudėtyje būtų didesnis kiekis piruvatų, todėl reikia atsižvelgti kokį produktą norima gauti ir pagal tai pasirinkti tinkamesnę temperatūrą. Naudojant aukštesnę fermentacijos temperatūrą (34 °C), gaunamas mažos molekulinės masės produktas, kurio vandeniniai tirpalai turės mažesnę klampumą. 27-30 °C temperatūroje gaunama geresnė ksantano struktūra nei esant 25 °C temperatūrai [4,6,10,19].

1.8.3.4. pH įtaka procesui

Daugelis straipsnių autorių sutaria, kad ksantano gamybai yra tinkamiausias neutralus pH 7,0-7,2. Jo gamybos metu, nekontroliuojant fermentacijos terpės kitimų, pH reikšmė gali sumažėti iki 5 dėl susidarancio ksantane esančių rūgštinių grupių. Vieni autoriai teigia, kad neutralaus pH palaikymas nėra būtinas, o kiti rekomenduoja taikyti terpės kontrolę šarmais (NaOH, KOH). Tyrimais nustatyta, kad terpės kontrolė labiau veikia ląstelių formavimosi ir augimo fazę, nei susidarancio ksantano koncentraciją. Labai svarbu atsižvelgti į polimerizacijoje dalyvaujančius fermentus, kuriems taip pat turi būti palaikoma optimali pH reikšmė [3,4,6]. Geriausi rezultatai pasiekiami vykdant pH kontrolę viso proceso metu. Optimalu biomasės augimo etape palaikyti 6-7,5 pH, o ksantano sintezės etape išlaikyti 7-8 pH. Žemas pH palankesnis bakterijų dauginimuisi, o neutralus – ksantano gamybai [10,12,19].

1.8.3.5. Ksantano sintezės kinetika

Norint suprojektuoti ir pagerinti ksantano gamybą, reikia suprasti jo proceso kinetiką. Kinetiniai modeliai bando numatyti mikroorganizmų augimo ir produkto susidarymo profilius. Kadangi šioms bakterijoms reikalingas deguonis, o proceso metu susidarantis ksantanas didina terpės klampumą, todėl keičiasi deguonies perdavimo masės greitis ir tai turi didelės įtakos visam procesui.

Vienas pagrindinių parametrų yra deguonies masės perdavimo koeficientas, kuris aprašomas tokiais kintamaisiais kaip oro srauto greitis, tariamasis klampumas, maišymo greitis. Pastarasis parametras taip pat priklauso nuo bioreaktoriaus tipo. Maišomuose bioreaktoriuose deguonies masės perdavimo greičiui įtakos turi oro srautas ir maišymo greitis. Kai kurie straipsnių autoriai naudoja pastovų maišymo greitį visos fermentacijos metu, kiti jį keičia proceso metu. Nustatyta, kad palaikant vienodą

maišymo greitį, ksantano gamyba laikui bėgant sumažėja, nes terpės klampa tampa didesnė, dėl produkto koncentracijos didėjimo joje. Dėl šios priežasties maistinės medžiagos bei deguonis sunkiau pasiekia ląsteles (naudojant iki 500 apsisukimų per minutę), bet taikant didesnę greitį viso proceso metu buvo pažeistos ląstelės. Iš tokių rezultatų nustatyta, kad geriausia yra maišymo greitį didinti proceso eigoje. Didėjant terpės klampumui ir nedidinant oro srauto ar maišymo greičio, deguonies stygius gali tapti limituojančiu veiksniu visam sintezės procesui [4,10].

Kinetika apima ir masės perdavimo ribojimus, kuriuos sukelia padidėjęs terpės klampumas, mechaninis įrangos dizainas ir nepalankių sąlygų atsiradimas laikui bėgant, pvz. ląstelių populiacijos tankis, kuris sukelia ląstelių stresą [13].

Tiriant skirtingų fermentacinės terpės maišymo greičių bei deguonies srautų poveikį išgaunamo ksantano reologinių savybių kitimui, vienuose šaltiniuose teigiama, kad kuo didesnis ištirpusio deguonies kiekis, tuo didesnę ksantano produkciją gauname, kituose aprašoma tai, kad siekiant didelės ištirpusio deguonies koncentracijos turi būti naudojamas stiprus maišymas, kas sukelia hidrodinaminį stresą ląstelėms, jų pažeidimus ir sumažina ksantano produkciją [10,29].

Ksantano gamyba gali būti atliekama keliais skirtingais kinetiniais modeliais – periodinės, pusiau nepertraukiamos arba nenutrūkstamos fermentacijos metodais. Nors periodinės fermentacijos metu yra mažiau skirtingų parametrų ir lengviau ją valdyti, bet problema kyla tame, kad terpės sudėtis ir sąlygos pastoviai kinta viso proceso metu. To pasekoje gali susidaryti sąlygos, kurios yra toksiškos bakterijoms, nepalankios jų augimui bei ksantano sintezei. Nepertraukiamame procese tokios situacijos išvengiama, nes pastovios sudėties mitybinė terpė yra vis tiekama į fermentacijos „sultinį“ ir dalis jo yra pašalinama, taip praskiedžiant fermentacijos terpę ir išlaikant pastovius parametrus. Nepertraukiamo proceso metu gali būti gaunami didesni kiekiai ksantano, tačiau padidėja galimybė prarasti sterilumą ar gali išsivystyti greitai augantis pakitusių savybių mikroorganizmas, kuris neprodukuos numatyto ksantano kiekio [13].

1.8.4. Išgavimas ir gryninimas

Ksantano išgavimas po fermentacijos susideda iš daug žingsnių ir sudaro apie 70% polimero gamybos išlaidų. Proceso kaštus šiek tiek sumažina tai, kad ksantanas yra egzopolisacharidas, t.y. jis kaupiamas ne ląstelės viduje, o išskiriamas į aplinką [19]. Suformuoti galutiniam ksantano produktui taikomi tokie pagrindiniai žingsniai: ląstelių deaktyvavimas ir pašalinimas, biopolimero nusodinimas, vandens bei kitų tirpiklių pašalinimas, džiovinimas ir malimas.

Atlikus procesus, vykstančius bioreaktoriuje, fermentacijos terpėje yra ksantano, bakterijų ląstelių, jų nuolaužų ir kitų cheminių junginių. Įprastai terpė yra pasterizuojama, kad žūtų ląstelės, tuo pačiu iš jų pašalinama likęs ksantanas, įvyksta pašalinių polisacharidų terminis skaidymas, padidėja ksantano tirpumas. Didinant temperatūrą taip pat sumažinamas terpės klampumas ir ją lengviau apdirbti tolimesniuose etapuose. Dažniausiai naudojamos pasterizacijos sąlygos: 10-20 minučių palaikoma 80-130 °C temperatūra ir pH tarp 6,3 ir 6,9. Terpėje po fermentacijos būna 10-30 g/L⁻¹ ksantano – dėl tokios jo koncentracijos terpė yra didelio tankio ir sunkiai apdorojama. Kad palengvinti išgavimo procesą, terpė yra skiedžiama vandeniu ar alkoholiu [4,19].

Norint išgauti ir išgryninti ksantaną pirmasis žingsnis yra atskirti ir pašalinti ląsteles. Tam gali būti taikomas apdorojimas chemikalais, mechaninėmis priemonėmis ar terminis apdorojimas. Cheminio apdorojimo metu, pasikeitus pH, gali vykti polimero pakitimai, o naudojant fermentus, juos po to reikia pašalinti iš mišinio ir tai apsunkina gryninimą. Mechaninėmis priemonėmis tai galima padaryti centrifuguojant ir filtruojant. Būtent šie procesai yra plačiausiai taikomi tiek laboratoriniais, tiek pramoniniais tikslais [4].

Išsodinus ir atskyrus ląsteles ir jų nuolaužas, gaunamas supernatantas. Tolesnis ksantano gryninimas gali būti jo nusodinimas naudojant su vandeniu nesimaišančius tirpiklius (izopropanolis, etanolis arba acetonas), taip pat tam tikrų druskų pridėjimas ar pH reguliavimas. Taikant išsodinimą izopropanoliu ar etanoliu, procesas laikomas ekonomiškiausiu, nes šiuos tirpiklius galima nesunkiai regeneruoti. Gaminant maisto pramonei skirtą ksantaną yra naudojamas nusodinimas izopropanoliu [3,4,5,7,8].

Nusėdus ksantano molekulėms yra nupilamas tirpalas, gaunamos drėgnos ksantano nuosėdos, jos perplaunamos. Toliau jos mechaniškai nusausinamos ir išdžiovinamos periodinėse arba nepertraukiamo džiovavimo kamerose esant 50-60 °C temperatūrai, 24 valandas. Kai kur taikomas džiovinimas šalčiu - liofilizavimas. Daugumos komercinio ksantano galutinė drėgmė yra apie 10 % [3,4,6,7].

Išdžiovintas ksantanas yra malamas iki reikiamo dydžio dalelių. Šio proceso metu reikia būti atsargiems su temperatūra, kad ji nebūtų per aukšta ir nesuardytų ksantano struktūros. Produktas supakuojamas į vandens nepraleidžiančias pakuotes [4].

1.8.5. Imobilizavimas

Ekonomiškesnis ksantano sintezės procesas pasiekiamas naudojant metodus, kai gaunama terpė su produktu, nuo kurios jau nebereikia atskirti ląstelių ir jų nuolaužų. Tam panaudojama ląstelių imobilizacija [13]. Siekiant padidinti gaunamo ksantano kiekį ir sumažinti gamybos kaštus yra naudojami įvairūs mikroorganizmų imobilizacijos būdai – adsorbicija, įterpimas į gelius, kovalentinis imobilizavimas ir kita. Imobilizuojant savaimine ląstelių adsorbicija, šis metodas pasižymi didesniu ląstelių tankiu, geresniu maistinių medžiagų pasiekiamumu, taip pat pasiekiamas geresnis metabolinis aktyvumas, ilgesnis panaudojimo laikas ir lengva naudoti mikroorganizmus pakartotinai, nesunku išskirti iš fermentacijos terpės, gaunama mažesnė proceso kaina, lengvas tokio proceso pritaikomumas. Procesas gaunamas netoksiškas, lengva produkto biodegradacija, ląstelių atsparumas inhibuojančioms medžiagoms ir toksiškiems komponentams [7,30]. Imobilizavus mikroorganizmus galima nuolatos tiekti substratą ant besisukančio būgno, judančio diržo, plėvelės ar panašaus įtaiso paviršiaus ir vykdyti nepertraukiamą procesą [13].

Moksliniuose straipsniuose aprašytų tyrimų metu buvo vykdoma natūrali savi-imobilizacija susidarant bioplėvelei ant įvairių paviršių. Toks adsorbicijos būdu imobilizuotų ląstelių privalumas – užtikrinamas tiesioginis kontaktas tarp ląstelių ir joms reikalingų maistinių medžiagų. Kaip paviršiai gali būti taikoma keramikinės dalelės, medžio drožlės, natūralūs polimerai, gelių mikrokapsulės (pvz. kalcio alginatas), metalinės ar plastikinės atramos ar tinkleliai, bei pluoštinės medžiagos [7,30].

Viename šaltinių imobilizavimui tirti naudotos 4 skirtingos medžiagos: lygus mažų porų metalinis tinklelis, banguotas didelių porų metalinis tinklelis, plastikinė atrama-tinklelis ir kalcio alginato

granulės. Vykiant 72 valandų fermentaciją, nustatyta, kad imobilizuojant mikroorganizmus padidėjo gaunamo produkto kiekis. Didžiausia produkto išeiga pasiekta naudojant plastikinį tinklelį, taip pat susintetintas ksantanas pasižymėjo dideliu elastingumu. Maždaug po 48 valandų pasiekta ląstelių augimo stacionari fazė ir pradėta ksantano sintezė. Visas procesas trunka apie 72 valandas. Manoma, kad ant plastikinio tinklelio pasiekti geriausi rezultatai, nes ten nesukeliamas turbulentinis maišymasis, pati medžiaga yra elektrostatinė, hidrofobinė ir šiurkštesnio paviršiaus, todėl pasiekama geresnė ląstelių absorbcija [7].

Kitame šaltinyje, atlikus panašų tyrimą, fermentacija buvo atliekama ciklais ir geresni rezultatai pasiekti naudojant metalinę atramą, tačiau panaudojant plastikinę atramą vyksta greitesnis gliukozės sunaudojimas. Naudojant pusiau nepertraukiamą procesą nustatyta privalumų prieš pertraukiamą procesą – nereikalingas inokulianto atnaujinimas po kiekvieno fermentacijos ciklo, mažesnės energijos sąnaudos, dažnai gaunamas didesnis produkto kiekis. Geresnis bakterijų augimas pastebėtas naudojant polietileno tinklelį, tačiau didesnė ksantano išeiga gauta naudojant metalinį [30].

1.9. Alternatyvios žaliavos

Nors polimerinių medžiagų gamybai naudojant atsinaujinančius šaltinius padidėja jų produkcijos ir išgryninimo kaštai, bet panaudojant alternatyvius mitybinius šaltinius, kurie yra kitų produktų produkcijos atliekos, sumažinami kaštai sunaudojami žaliavoms. Pramonėje paprastai naudojama yra gliukozė, kurios kaina vis auga ir ją naudoti tampa neekonomiška [13].

Norint ksantano gamybą padaryti ekonomiškėse, galima naudoti pigesnius substratus. Tai įvairios alternatyvios žaliavos, kurios yra atsinaujinančios arba gaunamos kaip kitų pramoninių procesų šalutiniai produktai. Tokiam tvaresniam ir ekonomiškėsniam procesui vykdyti kaip substratas gali būti naudojami hidrolizuoti ryžiai, miežiai, kukurūzų miltai, kokosų sultys, cukranendrės ir kitos daug cukrų turinčios žaliavos. Šiuo metu pramonėje yra taikoma gamyba iš cukranendrių melasos, išrūgų, žaliojo glicerolio, virtuvės atliekų, alyvuogių aliejaus išgavimo atliekų [6].

Atlikta nemažai mokslinių tyrimų, kuriuose aprašomi bandymai pritaikyti ksantano polimero gamybai tvarias žaliavas. Keletas pavyzdžių:

- Cukranendrės gali būti puiki žaliava ksantano sintezei, nes turi didelį kiekį cukrų, mineralinių druskų ir vitaminų, kurie suteikia labai geras mitybinės terpės savybes, reikalingas vykdyti fermentacijai. Naudojant šį substratą, fermentacija vykdoma 28 °C temperatūroje, palaikant pH 7,5, jos trukmė – 24 valandos. Po fermentacijos terpė nucentrifuguota, supernatantas perfiltruotas, apdorojamas KCl, polimeras nusodintas su etanoliu ir išdžiovintas [20].
- Atlikti tyrimai ksantano gamybai kaip žaliavą naudojant kasavos išspaudas. Jose yra apie 55-60 % krakmolo ir labai nedidelis kiekis lignino. Vykdyta krakmolo hidrolizė pektinazių ir celiulazių mišiniu, vėliau α -amilazėmis ir gliukamilazėmis, gauti redukuoti sacharidai. Gauta apie 68% redukuotų cukrų nuo visos žaliavos masės. Jie toliau panaudoti ksantano gamybai pasitelkiant *Xanthomonas campestris* [5,10].
- Tvariai ksantano gamybai galima panaudoti apelsinų žieveles. Nors apelsino žievelė yra laikoma atliekomis, bet ji yra gausus tirpių ir netirpių angliavandenių, ypač fermentuojamų cukrų, šaltinis. Kinijoje plačiai išvystyta pramonės šaka, kurioje yra gaminami produktai iš apelsinų ir lieka didelis kiekis jų žievelių, tad yra galimybė panaudoti jas kaip substratą šiam

procesui. Substrato hidrolizė vykdoma su 0,5-2,5 % sieros rūgštimi. Proceso trukmė 60 minučių, naudojama 121 °C temperatūra. Optimalios sąlygos maksimaliai ksantano gamybai: naudojama 85 % nuo viso fermentacijos tūrio apelsino žievelės hidrolizato ir palaikoma 30,4 °C temperatūra. Tokiomis sąlygomis gaunama apie 22,05 g/l ksantano [6].

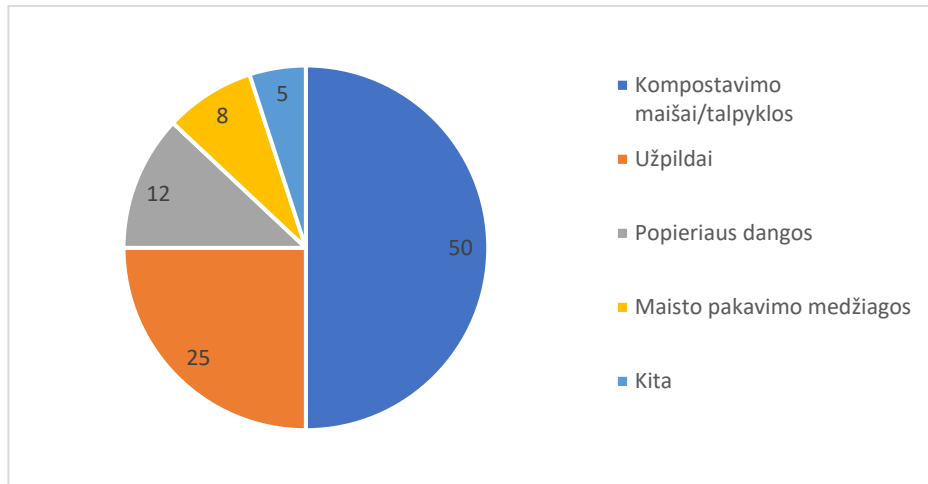
- Taip pat gali būti pritaikytas duonos atliekų hidrolizatas. Tyrimams naudota sužiedėjusi duona, batonas, kurie neturėjo pelėsio. Jų hidrolizavimui naudota fermentinė hidrolizė α -amilaze ir amilogliukozidaze. Tokioje išdžiovintoje duonoje krakmolą sudarė apie 85 % visos masės. *Xanthomonas axonopodis vesicatoria* ir *Xanthomonas hortorum pv pelargonii* naudojant pasiekta didžiausia išėiga, kaip substratą naudojant duonos atliekų hidrolizatą [3].
- Gali būti naudojamas išrūgų hidrolizatas. Pačių išrūgų panaudojimas ksantano gamybai yra sunkiai pritaikomas, nes mikroorganizmai tiesioginio jų panaudojimo nevykdo efektyviai. Naudojant hidrolizatą, gautas ksantanas turi nedidelį kiekį β -galaktozidazės. Reikia rasti optimalų naudojamą kiekį rūgšties, kuris pakankamai suhidrolizuotų išrūgas, bet nebūtų perteklinis ir paskui nepaveiktų ksantano sintezės bei galutinio produkto [12].

Yra atlikta ir dar daugiau tyrimų panaudojant įvairias alternatyvias žaliavas, kurios ateityje turi galimybę būti pritaikytos pramoniniais mastais.

1.10. Biopolimerų panaudojimas

Dauguma gaunamų skirtingų biopolimerų turi panašių cheminių, fizikinių bei mechaninių savybių kaip ir įprasti polimerai, dėl to jie gali būti naudojami tose pačiose srityse ir ateityje juos pakeisti. Deja to nepavyksta pritaikyti visose srityse, nes susintetinti biopolimerai pasižymi aukštesne kaina ir kai kurios jų savybės gali skirtis nuo įprastinių polimerų. Taip pat gali būti tiksliai nežinomas biopolimero atsparumas ilgą laiką jį naudojant konkrečiomis sąlygomis [1].

Šiuo metu viena plačiausiai pritaikomų biopolimerų sričių Europoje yra kompostavimo maišų ir talpyklų gamyba. Surinkus kompostavimui tinkamas atliekas, jas galima kompostuoti su visu maišeliu, ar kita talpa, pagaminta iš bioskaidžios medžiagos. Taip pat galima pritaikyti nuotekų valyme. Biopolimerai plačiai naudojami kaip įvairūs užpildai, popieriaus dangos, lakų ir dažų gamybai, maisto produktų pakavimo plėvelių gamybai bei pakuotėms kitose srityse. Žemės ūkyje galima pritaikyti mulčiavimo plėvelių gamyboje, skaidiems vazonom, kuriuos galima su visu augalu įsodinti į žemę. Medicinoje panaudojama skaidžių-absorbuojamų siūlų gamybai bei pažangiame vaistų ir baltymų tiekime žmogaus organizme, audinių inžinerijoje [1,8]. Maisto pramonėje ksantanas gali būti naudojama kremuose, vaisių sultyse, salotų užpiluose, mėsoje, žuvyje, taip pat sirupuose, ledų ar desertų glajuje, dėl savo stabilizuojančių ir tirštinančių savybių [3]. Biopolimerai pritaikomi flokuliuoti maisto, naftos, farmacijos, kosmetikos, dažų, tekstilės ir žemės ūkio produktus, pavyzdžiui kaip emulsijos stabilizatorius pesticiduose [20].



1.6 pav. Biopolimerų panaudojimo sritys Europoje procentais

Toks platus biopolimerų panaudojimas galimas dėl išskirtinių fizikinių ir cheminių savybių, bioskaidumo ir netoksiškumo, kvapo ir skonio nebuvimo. Deja, bet ne visose srityse galima efektyviai pakeisti sintetinius polimerus dėl ksantano mažo paviršiaus ploto bei prastų mechaninių savybių stabilumo kintant temperatūrai. Dėl to dažnai naudojami modifikuoti ksantano polimerai su medžiagomis pagerinančiomis reikiamas savybes. Modifikuojant polimerus galima pasiekti geresnių jo fizikinių, cheminių bei mikrobiologinių savybių [8].

Dėl unikalių reologinių savybių, ksantanas gali būti reikiamo klampumo/tankio, panaudojant skirtingas jo koncentracijas, jis būti pritaikomas skirtingiems procesams. Taip pat gali išlaikyti stabilumą plačiame pH ir temperatūrų diapazone [10]. Didelio klampumo ksantano tirpalai naudojami naftoje, žemės ūkio pramonėje ir vandens pagrindo dažuose. Mažo klampumo tirpalai pasižymi didelio pralaidumo savybėmis, kurios gali būti pritaikytos maisto pramonėje, pakavimo plėvelėms gaminti. Be to mažo klampumo ksantano tirpalai pasižymi geresnėmis sinerginėmis savybėmis ir geriau veikia su įvairiais priedais ir kitomis gumomis [3].

Plačiau aptarsime keletą ksantano panaudojimo sričių.

1.10.1. Maisto pramonėje

Maisto pramonėje ksantanas panaudojamas kaip tirštiklis, stabilizatorius, emulsiklis ar gelio struktūrą suteikiantis agentas [7]. Pseudoplastinės ksantano savybės pagerina maisto produktų juslines savybes tokias kaip pilamumą, maišomumą, pumpuojamumą, todėl jį lengviau apdirbti, jis yra malonesnės konsistencijos ir išvaizdos galutiniam vartotojui [8]. Užtenka labai nedidelės ksantano koncentracijos produktams suteikti norimą konsistenciją, todėl tai nepaveikia produktų skonio [13].

1.1 lentelė. Ksantano panaudojimas maisto pramonėje [2,13]

Produktai	Panaudojimas	Ksantano koncentracija, %
Gėrimai	Suteikia gėrimams malonesnę konsistenciją ir kokybę	0,05-0,20
Greitai paruošiamos sriubos	Užtikrina pakankamą klampumą tiek rūgštiniame, tiek neutraliame pH	0,30-0,50
Salotų padažai	Stabilizuoja konsistenciją įprastuose, mažai aliejaus turinčiuose, arba visai neturinčiuose aliejaus padažuose. Padeda suspenduoti komponentus ir stabilizuoti emulsijas	0,15-0,50
Pyragų mišiniai	Suteikia glotnumo, padeda geriau prisotinti tešlą oru ir jį išlaikyti. Mišiniai lengviau maišosi su šaltu ar karštu vandeniu	0,05-0,25
Padažai	Suteikia reikiamą klampumą	0,10-0,30
Pagardai	Pagerina svorio išlaikymą ir sumažina skysčių praradimą apdirbimo procese. Išlaikoma produkto forma ir klampumas	0,05-0,25
Šaldyti produktai	Padeda išlaikyti formą ir stabilumą užšaldymo - atšildymo procesų metu	0,05-0,20

Ksantano mišinys kartu su kitais biopolimerais gali būti taikomas maistui tinkamų pakavimo plėvelių pramoninei gamybai. Judant link tvaresnės ekonomikos, ieškoma kuo natūralesnių pakavimo medžiagų, kurios prailgintų perdirbto maisto vartojimo tinkamumą ir išlaikytų jį ilgiau šviežią, taip pat pačios pakuotės būtų bioskaidžios. Šios pakuotės turi pasižymėti geromis fizikocheminėmis ir mikrobiologinėmis savybėmis, nepraleisti deguonies ir drėgmės. Grynos ksantano plėvelės nepasižymi labai geromis mechaninėmis savybėmis, todėl dažnai sintetinami jų kompozitai su kitais biopolimerais ar ksantanais modifikuojamas įvairiomis papildomomis cheminėmis grupėmis [27].

Ksantano kompozitų plėvelės yra permatomos, mažai pralaidžios drėgmei, apsaugo produktus nuo ultravioletinių spindulių. Pačioje plėvelėje yra mažas drėgmės kiekis ir nedaug tirpių medžiagų, sustiprintos termostabilumo ir mechaninės savybės. Dėl savo fizikinių savybių – tirpumo vandenyje, lengva formuoti plėveles. Pridėjus papildomų medžiagų galima pagaminti antimikrobiškai aktyvias pakavimo medžiagas [8].

Viename iš straipsnių aptariamas ksantano mišinys su kurdlanu. Kurdlanas yra netirpus vandenyje ar alkoholyje, jis turi geras mechanines savybes ir tuo papildo ksantano biopolimerą. Jų kompozitų bioplėvelės pasižymi termostabilumu ir yra geras barjeras nuo drėgmės [27]. Modifikuotas ksantanais su prijungtu imidazolo žiedu ar įterptomis sidabro nanodalelėmis pasižymi stipriomis antimikrobinėmis savybėmis, ypač prieš *Escherichia coli* ir *Staphylococcus aureus*, kuriais dažnai būna užteršti maisto produktai ir jie sukelia maisto gedimą [14,31].

1.10.2. Panaudojimas medicinoje ir farmacijoje

Medicininis ksantano panaudojimas gali būti skirstomas į dvi kryptis: kaip medžiaga preparatų gamyboje (farmacinis) bei polimeras vaistų pernešimui į organizmą, audinių regeneracijos skatinimui (medicininis).

Farmacijoje naudojamas kaip vaistų ir papildų tablečių rišiklis, stabilizatorius, tirštiklis, emulsiklis ir gelį formuojanti medžiaga. Iš kitų biopolimerų išsiskiria tuo, kad yra netoksiškas, bioskaidus, stabilus

plačiame pH ir temperatūrų diapazone ir gerai suderinamas su daugeliu farmacinių medžiagų. Gali būti taikomas tokiems komponentams kaip β -karotenui, mėlynių anticianinams ar kitoms medžiagoms įkapsuliuoti emulsijose, taip palengvinant jų vartojimo būdą ir įsisavinimą į organizmą. Į tokias emulsijas pridedant ksantano pagerėjo jų stabilumas laikant ilgesnį laiką, atsparumas temperatūros pokyčiams bei termininei sterilizacijai. Plačiai taikomas vaistinių sirupų gamybai kaip emulsikliai ir emulsijų stabilizatoriai [8].

Bioskaidūs polimerai gali sąveikauti su gyvomis sistemomis nesukeldami žalingų pasekmių. Ksantanas gali būti naudojamas kapsulėms sudaryti, kuriose imobilizuojamos vaistinės medžiagos. Ksantano kapsulės geba atpalaiduoti junginius patekus į reikiamą organizmo terpę. Jis veikiamas aplinkos sąlygų iš lėto atpalaiduoja medžiagas į organizmą ir taip vykdo jų dozavimą. Gali būti naudojamas aspirino, paracetamolio, baltymų, fermentų ar hormonų pernešimui į žarnyną ar kitą tikslinę vietą, taip pat antiseptinių medžiagų nugabenimui į veikimo vietas, bei visa tai gali būti pritaikoma terapiniam gydymui [8]. Kartu kaip vaistų pernešimo sistema labai efektyviai veikia ksantanas su įterptomis cinko oksido dalelėmis. Cinko dalelės ilgiau išlieka stabilios su imobilizuotomis vaisto dalelėmis ir gali jas pernešti į tikslines ląsteles. Vaistas atpalaiduojamas palaipsniui esant tinkamoms sąlygoms, taip išvengiant perdozavimo. Šiuo metodu gali būti atliekamos chemoterapijos, genų terapijos ir fototerminės terapijos [32]. Ksantanu gali būti dengiamos vaistų liposomos, kurios į organizmą patenka per plaučius jas įkvėpus – inhaliuojami vaistai. Ksantanas pagerina bendrą vaisto masę ir nusėdimą plaučių paviršiuje [33].

Probiotinės bakterijos yra svarbios mūsų organizmui, tad jų patekimas į organizmą ir gyvybingumo išlaikymas yra labai aktuali tema. Jų įtvirtinimas, saugojimas vartojimui tinkamu pavidalu ir perėjimas žmogaus žarnynu iki reikiamos vietos, išlaikant bakterijų gyvybingumą yra itin svarbus. Vykdamt mikrokapsuliuojimą galima pasiekti šių rezultatų, nes bakterijos apsaugomos nuo žalingų aplinkos veiksnių iki tol kol jos būna atpalaiduojamos reikiamoje žarnyno vietoje. Alginatinės probiotikų kapsulės gali būti padengtos įvairiomis natūraliomis dangomis, bet geriausias rezultatas buvo gautas naudojant ksantaną. Gyvybingomis išliko apie 83,6 % bakterijų, lyginant su laisva bakterijų forma, kurių gyvybingumas buvo 49,4 % [34].

Audiniams atstatyti po įvairių sužeidimų, traumų ar ligų, gali būti naudojami audinių ląstelių ir biopolimerų, šiuo atveju, ksantano mišiniai, kurie naudojami kaip audinių atstatymo šablonai, nukreipiantys ir skatinantys organizmo naujų audinių susidarymą. Gali būti naudojami ne tik kūno išorėje, bet ir viduje, kaip injekciniai geliai. Dėl savo gebėjimo lengvai užpildyti įvairių formų pažeidimus ir ertmes, jų panaudojimas turi pranašumą, nes nebereikia invazinės operacijos. Tokiu metodu gali būti atstatomi net kauliniai audiniai. Paminėtina tai, kad ksantano turintys biomedžiagų kompozitai gali būti naudojami gydant burnos ligas, pavyzdžiui, periodontitą ar alveolinio kaulo praradimą [8,19,35]. Operacijų metu ksantano ir kitų polimerų plėvelės gali būti naudojamos kaip prevencinės priemonės, kad po jų audiniai gydami nesuaugtų tarpusavyje. Pavyzdžiui sausgyslių operacijos metu jos aptraukiamos minėtąja membrana, kad neprikibtų prie kitų audinių ir sugijusių sausgyslių funkcionalumas nesuprastėtų [35]. Atlikti tyrimai parodė, kad vietinės ksantano injekcijos sumažina osteoartrito sukeltą skausmą ir kartu apsaugo sąnarių kremzles bei sumažina jų degradaciją [36].

Šiuo metu negyjančių žaizdų gydymui yra atliekami išsamūs tyrimai. Žaizdų komplikacijos gali atsirasti dėl virulentinių bakterijų, kurių daugelis yra atsparios antibiotikams. Ieškoma tokių medžiagų, kurios absorbuotų išskiriamus skysčius, apsaugotų žaizdą nuo aplinkos poveikio, neleistų veistis mikroorganizmams ir spartintų gijimą. Ksantanas dėl savo hidrofilinės prigimties gali laikyti didelį kiekį vandens savo tinklinėje struktūroje ir neleisti džiūti žaizdos aplinkai. Taip pat jis yra gerai suderinamas su žmogaus organizmu ir nesukelia alerginių reakcijų. Antioksidacinės ksantano savybės apsaugo nuo oksidacinio streso ir padeda stabilizuoti kitas medžiagas jo struktūroje. Ksantano su imobilizuotomis sidabro nanodalelėmis plėvelės – pleistrai gerai veikia prieš infekcines ligas sukeltas bakterijų. Porėta struktūra leidžia vyksti dujų apykaitai ir skysčių išgaravimui [23].

Higienos priemonių srityje ksantanas taikomas kaip agentas, kuris pagerina šampūnų, dantų pastų, skystų muilų, odos priežiūros priemonių reologines ir takumo savybes, pagerina medžiagų dispersiją, sumažina jų sedimentaciją, suteikia kremingą konsistenciją, malonesnį pojūtį ir lengvesnį padengimą ant odos, įsiskverbimą į jos sluoksnius. Kartu ksantanas padeda palaikyti tolygų pigmentų pasiskirstymą, ilgesnį pH, druskingumo ir temperatūrinį stabilumą. Kadangi pats ksantanas gali polimerizuotis ir kristalizuotis, todėl jis gali emulsuoti suspencijas – ši savybė dažnai naudojama kosmetikos preparatuose, siekiant išsaugoti stabilumą prieš užšaldant ir atšildant [8,18,37].

1.10.3. Kitos ksantano panaudojimo sritys pramonėje

- 1) Didelė tirpalų klampa ir polimero tirpumas vandenyje yra svarbus ksantano pritaikymas naftos pramonėje, kur jis naudojamas gręžimo skysčiams ir patobulintiems naftos regeneravimo procesams [4]. Gręžimo skysčiai yra pagaminti vandens pagrindu, o ksantano priedai padidina jų klampą, sumažina jautrumą aplinkos druskingumui ir temperatūrų svyravimams [8]. Gręžimo metu ksantanas pagerina grąžto skvarbą per anglių ir sumažina nuolaužų susidarymą. Panaudojant ksantaną šiame procese padidėja išgaunamos naftos kiekis. Deja, bet papildomos ksantano priemonės apsunkina naftos išgryninimo procesus [13,38].
- 2) Taip pat ksantanas naudojamas naftos pramonės vamzdynų valymui. Ksantano tirpalas naudojamas naftos išgavimo operacijoje, kaip skystis, kuris stumia likusią naftą ir neleidžia jai nutekėti su vandeniu į kitus uolienų (grunto) sluoksnius [13].
- 3) Kita sritis kur ksantanas naudojamas – valyti dujotiekio vamzdynuose rūdis, suvirinimo liekanas, šlapius šlakus ir kitas šiukšles [13].
- 4) Įvairių nuotekų valyme gali būti naudojamas ksantano pagrindu pagamintas nanokompozitas ar hidrogelis. Čia jie atlieka adsorbento vaidmenį. Taikant kartu su nanofiltrais, puikiai pašalinamos kenksmingos medžiagos kaip dažai, toksiški sunkieji metalai [8]. Pagamintos plėvelės iš ksantano gali būti naudojamos prisitvirtinti teršalus valančioms bakterijoms ir būtų aplinkai saugus nešiklis [2].
- 5) Ksantanas gali būti naudojamas ir kaip katalitinė medžiaga: dėl turimų aktyvių šoninių grupių, jis gali veikti kaip katalizatorius įvairių nanodalelių dispersijai pagerinti [8].

- 6) Dažų ir lakų gamyboje ksantanas veikia kaip tirštiklis ir emulsijų stabilizatorius. Suteikia norimą tekstūrą ir gerą sukibimą su dengiamu paviršiumi. Veikia kaip ekologiškos dangos prieš metalų ir jų lydinių koroziją [8].
- 7) Popieriaus pramonėje ksantanas suteikia geras reologines savybes ir pagerina popieriaus tvirtumą [8].
- 8) Baterijų gamyboje – veikia kaip vandenyje tirpus rišiklis elektrodimams medžiagoms, ruošiant ekologiškas ir saugias ličio jonų baterijas. Pagerina elektrocheminius rodiklius ir sukibimo stiprumą [8].
- 9) Pritaikymas žemės ūkyje: insekticidų, herbicidų ir pesticidų gamyboje. Pagerina jų konsistenciją, prikibimą-adhesiją prie augalų, bei unikalią ksantano reologinę savybę sumažina jų nupūtumą nuo augalų. Taip pat ksantanas gali būti pritaikytas vandens sulaikymo dirvoje tikslais ir kontroliuojamam trąšų medžiagų dozavimui į dirvą [8,13].

1.10.4. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas

Pramonei palaipsniui judant tvarumo link, siekiama cheminiu keliu sintetintus polimerus pakeisti biopolimerais. Ksantano gamyba pramoniniu būdu tampa vis aktualesnė, nes šis polimeras išsiskiria savo unikaliomis savybėmis ir puikiu suderinamumu su žmogaus organizmu, tad gali būti pritaikytas daugybėje pramonės ir kitų sričių. Optimizavus ksantano gamybą – ją padarius ekonomiškesne, tvaresne ir gaunant maksimalų ksantano kiekį – būtų galima pakeisti įprastai naudojamus polimerus, plastikus, taip siekiant žmonių gyvenimus paversti sveikesniais, tvaresniais, taip pat vystyti technologijas pramonės, maisto ir medicinos srityse, kur nusimato plačios pritaikymo galimybės.

Ksantano sintezei įtakos turi tokie veiksniai kaip naudojamas bakterijų kamienas, pasirinktas gamybos būdas, anglies, azoto mitybiniai šaltiniai, jų koncentracijos, temperatūra, pH ir kiti veiksniai. Taip pat tai turi įtakos ir sintetintam ksantano cheminei sudėčiai, erdvinei struktūrai ir savybėms.

Šio tyrimo metu įvertinta minėtųjų veiksnių įtaka ksantano sintezei ir produkto savybėms. Darbo tikslas – optimizuoti ksantano gamybą ir rekomenduoti jo gavimo aparatūrinę schemą.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Naudojama įranga

- 1) Analitinės svarstyklės *Shimadzu ATX84*;
- 2) Autoklavas *Certoclav CV-EL 10L/12L/18L*;
- 3) Automatinės pipetės *Eppendorf*;
- 4) Centrifuga *Universal 320R*;
- 5) Laminaras *Holter LaminAir* ;
- 6) pH metras *Winlab data line pH-Meter*;
- 7) Rankinis hidraulinis presas;
- 8) Stalinė maišyklė *Biosan BioVortex VI*;
- 9) Spektrometras *PerkinElmer Spectrum GX*;
- 10) Spektrometras *Shimadzu UV-1280*;
- 11) Tabletavimo įrenginys;
- 12) Termostatas *Memmert IN55*;
- 13) Termostinė maišyklė *Biosan ES-20*;
- 14) Vakuuminis siurblys;
- 15) Vandens vonelė *Biosan BWT-U*.

2.2. Mitybiniai šaltiniai naudoti tyrimui

Tyrimo metu ištirta 10 anglies mitybinių šaltinių:

- 1) gliukozė – cheminė formulė $C_6H_{12}O_6$. Saldaus skonio kristalinė medžiaga, kuri pramonėje dažniausiai naudojama ksantano gamybai.
- 2) sorbitolis – tai natūralios kilmės cukraus pakaitalas, kurio cheminė formulė $H(CHOH)_6H$. Pasižymi apie 40% mažesniu saldumu nei sacharozė.
- 3) laktozė – kitaip vadinama pieno cukrumi. Tai disacharidas sudarytas iš gliukozės ir galaktozės. Cheminė formulė $C_{12}H_{22}O_{11}$.
- 4) sacharozė – disacharidas sudarytas iš gliukozės ir β -fruktozės, kurio cheminė formulė $C_{12}H_{22}O_{11}$.
- 5) D-maltozė – gliukozės dimeras, kuriame molekulės sujungtos $\alpha(1\rightarrow4)$ jungtimi.
- 6) Fruktozė – kitaip žinoma kaip vaisių cukrus. Cheminė formulė $C_6H_{12}O_6$.

- 7) stevija - „Stevia“ saldiklių mišinys. Tai saldiklių mišinys, kurio pagrindas yra eritriolis (99,8 %) ir steviolio glikozidai (0,2 %) – tai saldžiosios stevijos lapuose esančių saldiklių grupė, kuri apie 300 kartų saldesnė už sacharozę. Eritriolis yra polihidroksilis, kurio žmogaus organizmas nekonvertuoja į energiją, jis suteikia saldikliui kristalinį pagrindą.
- 8) kokosų palmių žiedų cukrus – cukrus gaminamas iš kokosų palmių žiedpumpurio stiebo sulčių. Pagrindė sudaryta iš sacharozės (70-79 %), gliukozės (3-9 %) ir fruktozės (3-9 %) bei mišinyje gali būti manozės, amino rūgščių, gliuteno, krakmolo ir palmių aliejaus;
- 9) natrio acetatas – $C_2H_3NaO_2$;
- 10) nerafinuotas cukranendrių cukrus– tai cukranendrių cukrus, kuris gaminamas koncentruojant cukranendrių cukrų, neatskiriant melasos nuo cukraus kristalų. Jis sudarytas iš sacharozės ir nedidelio kiekio (3,5-6,5%) melasos.

Taip pat tyrimas atliktas su 3 azoto mitybiniais šaltiniais:

- 1) Peptonas – tai nevisiškos baltymo hidrolizės produktas. Tai tirpūs aminorūgščių ir polipeptidų mišiniai, kurie susidaro hidrolizuojant gyvulinius ar augalinius baltymus.;
- 2) kalio nitratas – KNO_3 ;
- 3) karbamidas – kitaip žinomas kaip šlapalas, urėja, anglies rūgšties diamidas. Cheminė formulė H_2HCONH_2 . Tai žmogaus ir daugumos žinduolių baltymų apykaitos galutinis produktas.

2.3. Medžiagos, reagentai naudoti tyrimui

2.1 lentelė. Medžiagos ir reagentai naudoti tyrimui

Pavadinimas	Cheminė formulė
2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$
2,4,6-tripiridil-s-tiazinas (TPTZ)	$C_{18}H_{12}N$
Acetatinis buferis	$CH_3COOH + CH_3COONa$
Acetonas	C_3H_6O
Agaras	-
Dimetilsulfoksidas (DMSO)	$(CH_3)_2SO$
Distiliuotas vanduo	H_2O
Etanolis	C_2H_5OH
Fosfatinis buferis	$Na_2HPO_4 + H_3PO_4$
Geležies trichloridas	$FeCl_3$
Geležies sulfatas	$FeSO_4$
Izopropanolis	C_3H_8O
Kalio bromidas	KBr
Kalio chloridas	KCl
Kalio heksacianoferatas	$K_3[Fe(CN)_6]$
Metanolis	CH_3OH
Mėsos (jautienos) ekstraktas	-
Mielių ekstraktas	-
Natrio šarmas	NaOH
Sieros rūgštis	H_2SO_4
Trichloracto rūgštis	$C_2HCl_3O_2$

2.4. Tyrimo eiga

2.4.1. Terpių ruošimas

Panaudojant minėtuosius anglies mitybinius šaltinius, buvo pagaminta skysta YDA terpė, kurios sudėtis:

- peptonas 25 g/l;
- mielių ekstraktas 10 g/l;
- mitybinis anglies šaltinis 20 g/l.

Azoto mitybinio šaltinio tyrimui terpės sudėtyje keistas peptonas į kalio nitrata bei karbamidą, kaip anglies mitybinį šaltinį panaudojant steviją.

LB terpės sudėtis:

- gliukozė 20 g/l;
- peptonas 1 g/l;
- mėsos (jautienos) ekstraktas 1g/l;
- mielių ekstraktas 1 g/l.

Pagamintų terpių pH sureguliuojamas iki pH 7,2. Terpės sterilizuojamos jas autoklavuojant. Naudojamas atvėsusios.

2.4.2. *Xanthomonas* mikroorganizmų kultūros padauginimas

Paruošta kieta LB agarų terpė, kuri išpilstyta į sterilias *Petri* lėkšteles ir jai leista sustingti. Naudojant sterilią vienkartinę kilpelę, paimta šiek tiek kultūros iš anksčiau užaugintos naudojamos *Xanthomonas* bakterijos kultūros ir persėjama ant naujai paruoštos LB terpės. Auginta apie parą laiko. Užaugusi kultūra perkelta į 7 ml skystą LB terpę ir 24 valandas auginama termostatinėje maišyklėje maišant 180 apsisukimų per minutę esant 37 °C. Po to išmatuota jos šviesos sugertis ir terpė praskiedžiama taip, kad jos optinis tankis (OD) būtų apie 0,5.

2.5. *Xanthomonas* kultūros inokulianto paruošimas

Pradinė *Xanthomonas campestris* kultūra buvo gauta iš Vokietijos mikroorganizmų ir ląstelių kultūrų kolekcijos (DSMZ). Bakterijos laikomos mėgintuvėliuose ant pasviros agarų terpės, susidedančios iš 10 g/l gliukozės, 3 g/l mielių ekstrakto, 5 g/l peptono ir 15 g/l agarų. Iki jų atgaivinimo laikomos 4 °C laipsnių temperatūroje. Tyrimų metu kultūra kas dvi savaitės perkelta ir atgaivinta, kad išlaikyti bakterijų gyvybingumą ir turėti nuoseklius tyrimo rezultatus.

Bakterijų kultūros atgaivinimui, jos perkeltos nuo gulstaus agarų paviršiaus sterilia kilpele ant mitybinės LB agarų terpės ir apie 24-36 valandas inkubuojamos 30 °C temperatūroje.

Vėliau bakterijos sterilia kilpele perkeltos į mėgintuvėlį su 7 ml skystos LB terpės ir 24 valandas inkubuotos 30 °C temperatūroje inkubatoriuje su purtymo funkcija [39].

Taip paruoštas inokuliantas toliau panaudojamas fermentacijai.

2.6. Fermentacija

Fermentacija vykdyta 500 ml talpos *Erlenmejerio* kolbose. Iš 200 ml paruoštos YDA terpės su tiriamu mitybiniu šaltiniu, nupilti 7 ml, kurie toliau buvo naudojami kaip standartai šviesos sugerties matavimui. Tada supiltos 7 ml atgaivintos *Xanthomonas* bakterijų kultūros ir kolba yra užsandarinta parafilmu.

Paruošta mitybinė terpė su fermentaciją vykdančiais mikroorganizmais patalpinta į termostatą su kratymo/maišymo funkcija, kuriame palaikyta 30 °C temperatūra ir 180 apsisukimų per minutę maišymas.

Ksantano biosintezė atliekama periodiniu (angliškai *batch*) metodu. Kultūra auginta 72 valandas ir kas 24 valandas atlikti numatyti tyrimai.

2.7. Biomassės koncentracijos nustatymas

Naudojant optinę sugertį galima nustatyti biomassės koncentraciją terpėje. Tai parodo mikroorganizmų augimo kinetiką. Šviesos sugertis matuota esant 600 nm bangos ilgiui. Naudoti „nuliniai“ standartai – YDA terpės mėginiai be užsėtų mikroorganizmų. Tiriamieji mėginiai gerai išmaišyti ir prieš matavimą praskiesti 5 kartus pradine YDA terpe be mikroorganizmų.

Biomassės koncentracija apskaičiuota g/l panaudojant formulę:

$$\text{Konc. (g/l)} = 0,2845 \cdot \text{OD} \quad (1)$$

2.8. pH matavimas

Matuoti mėginių pH jų kitimui fermentacijos procese stebėti.

2.9. Sausos biomassės koncentracijos nustatymas

Sausos biomassės koncentracija nustatyta 1 ml mėginio perkėlus į iš anksto pasvertą mėgintuvėlį, jį nucentrifugavus, nupylus supernatantą, perplovus nuosėdas distiliuotu vandeniu ir vėl jas išsodinus centrifuguojant. Dar kartą nupiltas supernatantas, mėgintuvėlis su išsodinta biomase džiovintas apie 24 valandas esant 50 °C. Sausos biomassės koncentracija apskaičiuota pasveriant mėgintuvėlį su išdžiūvusią biomase ir iš jos atėmus tuščio mėgintuvėlio svorį. Kiekvienam mėginiui atlikti trys testo pakartojimai. Biomassės koncentracija perskaičiuota vienam litrai fermentacijos terpės.

2.10. Pagaminto ksantano išskyrimas ir masės nustatymas

Xanthomonas campestris bakterijos pagaminto ksantano nekaupia ląstelėje, o jį išskiria į aplinką, todėl produkto išgavimui nėra reikalingas ląstelių suardymas ir sutrumpėja proceso laikas.

10 ml fermentacijos terpės perkelta į iš anksto pasvertą mėgintuvėlį. Mėginys centrifuguotas 10 minučių 4 °C temperatūroje centrifuga, kad būtų atskirta biomasė. Supernatantas perkeltas į 50 ml iš anksto pasvertą mėgintuvėlį ir įpilta 10 ml 25 % kalio chlorido tirpalo bei 30–35 ml izopropanolio, kol mišinys susidrumstė ir pradėjo kristi nuosėdos. Mėgintuvėliai įdėti į ledo vonią, kad dehidratuotųsi ir pilnai iškristų ksantano nuosėdos [40].

Po 24 valandų iškritusios nuosėdos išsodintos centrifuguojant, nupiltas supernatantas ir išsodintas ksantanas džiovintas apie parą 50 °C termostate. Išdžiovintas ksantanas pasvertas su mėgintuvėliu ir apskaičiuotas išskirto ksantano kiekis. Kiekvienam mėginiui tai daroma du kartus. Išgauto ksantano koncentracija perskaičiuota vienam litrai.

2.11. Ksantano savybių tyrimai

Gauti ksantano mėginiai buvo sutrinti grūstuvėje į smulkius miltelius, pagaminti 1 mg/ml koncentracijos tirpalai ir tirtos gautų produktų savybės.

2.11.1. Tirpumas

Po 10 mg sausų ksantano miltelių patalpinta į mėgintuvėlius ir užpilta 10 ml tiriamųjų tirpiklių:

- vanduo;
- DMSO;
- metanolis;
- acetonas.

Mėgintuvėliai išmaišyti su staline maišykle ir 5 minutėms patalpinti į 40 °C vandeninį termostatą. Po to mėgintuvėliai vėl išmaišyti ir vizualiai stebimas ksantano tirpumas nurodytuose tirpikliuose.

2.11.2. Redukcinių savybių tyrimai

Atlikti skirtingi ksantano mėginių redukcinių savybių įvertinimo tyrimai. Svarbu įvertinti antioksidacinių savybių tyrimus skirtingais būdais, nes nevienodos eksperimentinės sąlygos gali parodyti junginio gebą veikti kitokios cheminės sudėties aplinkoje ar ląstelių viduje [25].

2.11.2.1. Redukuojančių Fe III savybių tyrimas

Paruošti 1 mg/ml koncentracijos ksantano vandeniniai tirpalai ir tyrimai atlikti su kiekvienu iš jų.

Į mėgintuvėlį įpilta 1 ml tiriamojo mėginio, 2,5 ml 0,2 M fosfatinio buferio ir 2,5 ml $K_3[Fe(CN)_6]$. Mėgintuvėliai sumaišyti ir inkubuoti 50 °C temperatūros vandens vonelėje 20 min. Po inkubacijos įpilta 2,5 ml 10% trichloracto rūgšties ir sumaišyta. Centrifuguota 10 minučių, 4 °C temperatūroje 9000 aps/min greičiu.

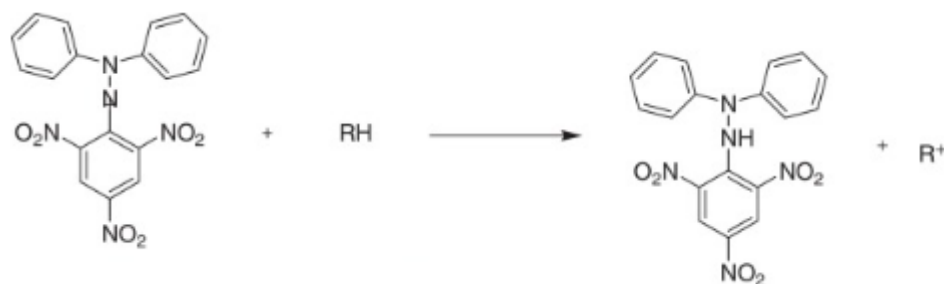
Kiekvieno mėginio 2,5 ml supernatanto sumaišyta su 2,5 ml distiliuoto vandens ir 0,5 ml 0,1% $FeCl_3$ tirpalo. Skirtingiems ksantano mėginiams atlikta po tris pakartojimus. Mėginiai spektrofotometru išmatuoti 700 nm bangos ilgyje. Didesnė šviesos sugertis parodo didesnes redukcines savybes.

Kuo daugiau -O- ir -HO- grupių turi junginys, tuo stipresnėmis redukcinėmis savybėmis jis pasižymi.

2.11.2.2. Ksantano DPPH radikalo slopinimo bandymas

0,1 mM DPPH etanolinio tirpalo sumaišyta su 1 ml tiriamojo ksantano mėginio tirpalu (1 mg/ml) ir inkubuota 20 min tamsoje kambario temperatūroje. Palyginamasis tirpalas paruoštas lygiagrečiai, tik vietoj tiriamojo tirpalo naudojamas distiliuotas vanduo. Po dvidešimties minučių išmatuota šviesos sugertis 517 nm bangos ilgyje. Kaip „tuščias mėginys“ mėginys naudojamas etanolis.

Tyrimo metu matuojamas DPPH radikalo slopinimas, kuris įvyksta, kai nesuporuotas DPPH azoto elektronas prisijungia vandenilio atomą iš antioksidacinių savybių turinčio junginio [25].



2.1 pav. DPPH radikalo slopinimo reakcija [41]

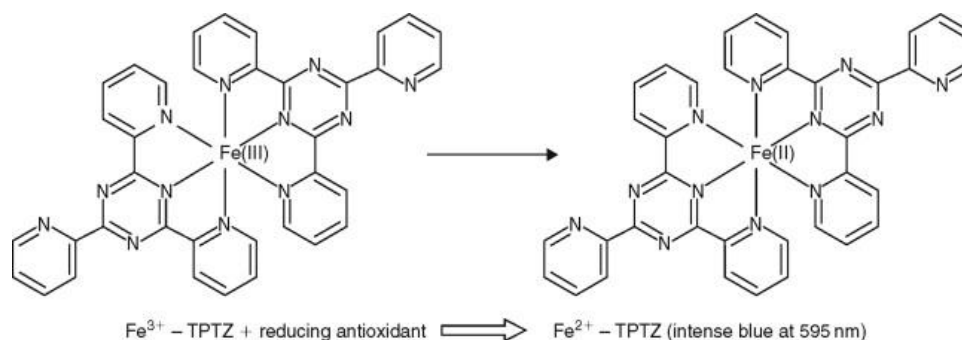
DPPH slopinimas apskaičiuojamas:

$$\% \text{slopinimas} = \left(\frac{A_B - A_A}{A_B} \right) \times 100 \quad (2)$$

Čia: A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugertis; A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis.

2.11.2.3. Antioksidacinio aktyvumo tyrimas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

Šiuo metodu nustatomos ksantano redukuojančios savybės, Fe^{3+} - TPTZ paverčiant į Fe^{2+} -TPTZ ir išmatuojant šviesos sugertį 593 nm bangos ilgyje.



2.2 pav. FRAP metodo metu vykstantis junginio redukavimas [42]

FRAP reagentas ruoštas iš 25 ml 300 mM acetatinio buferio, 2,5 ml 10 mmol 2,4,6-tripiridil-s-tiazino (TPTZ) ir 2,5 ml 20 mmol/l $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Po 100 μl tiriamųjų mėginių sumaišyta su 3 ml FRAP reagentu. Kalibravimo kreivė paruošta iš $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, mišinių galutinės FeSO_4 koncentracijos 5, 10, 15 20 ir 25 $\mu\text{mol/l}$. Kalibracinės kreivės ir tiriamieji mėginiai išmatuoti 593 nm bangos ilgyje. Tiriamųjų mėginių reikšmės apskaičiuotos pagal kalibravimo kreivę.

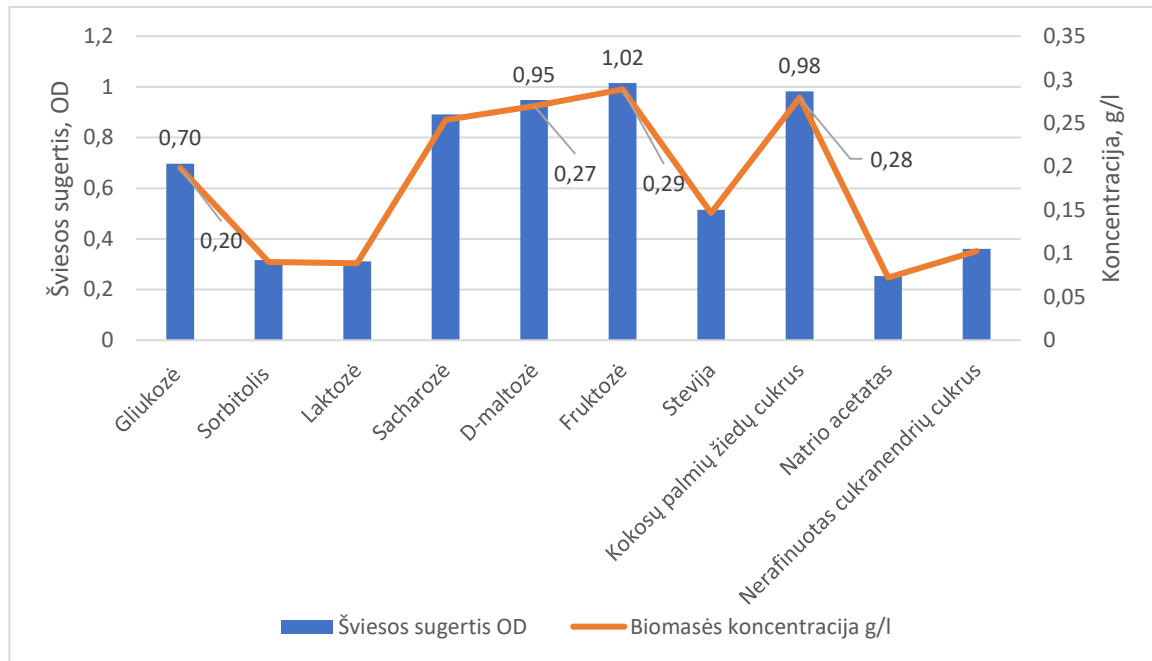
2.12. Ksantano struktūros FTIR tyrimas

Sauso, grūstuvėliu iki miltelių susmulkinto ksantano mėginys ($2 \pm 0,5$ mg) sumaišytas su KBr milteliais (200 ± 10 mg) ir suformuota jų mišinio tabletė. Ji tirama IR spektru $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ bangos ilgio diapazone ir užrašytas spektras [16].

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

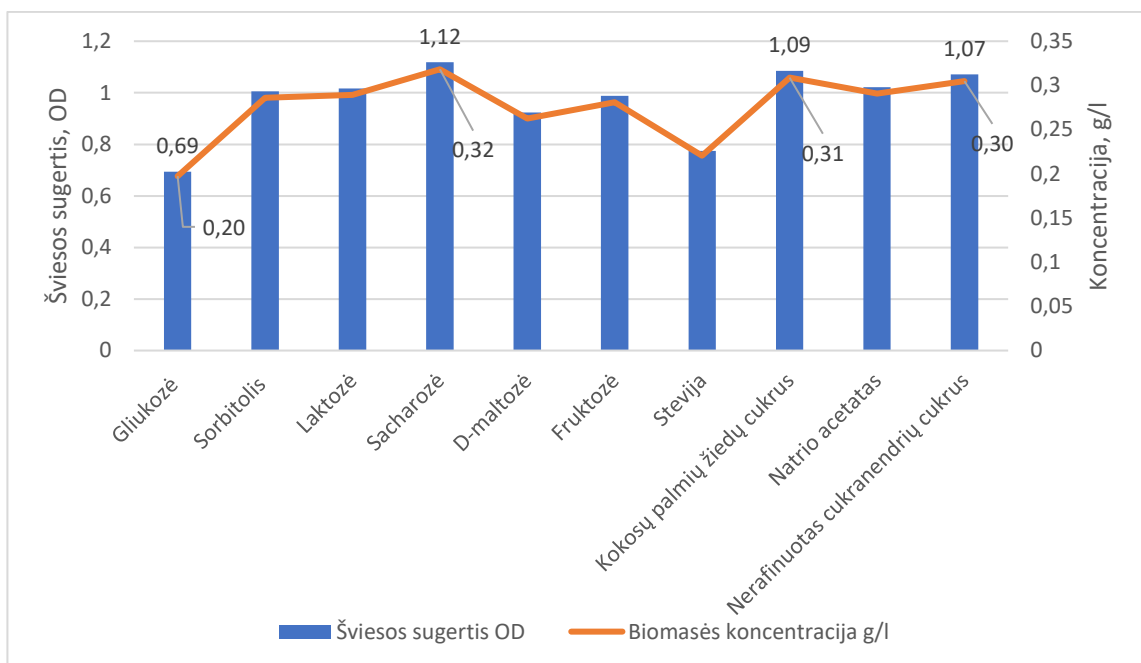
3.1. Biomasės koncentracijos priklausomybės nuo anglies mitybinio šaltinio įvertinimas

Panaudojus šviesos sugerties nustatymą spektrofotometru, galima apskaičiuoti mikroorganizmų biomasės koncentraciją fermentacinėje terpėje. Šviesos sugertis buvo matuota po 24, 48 ir 72 valandų trukmės fermentacijos. Gauti biomasės koncentracijos rezultatai panaudojant skirtingus mitybinius anglies šaltinius ksantano fermentacijai.



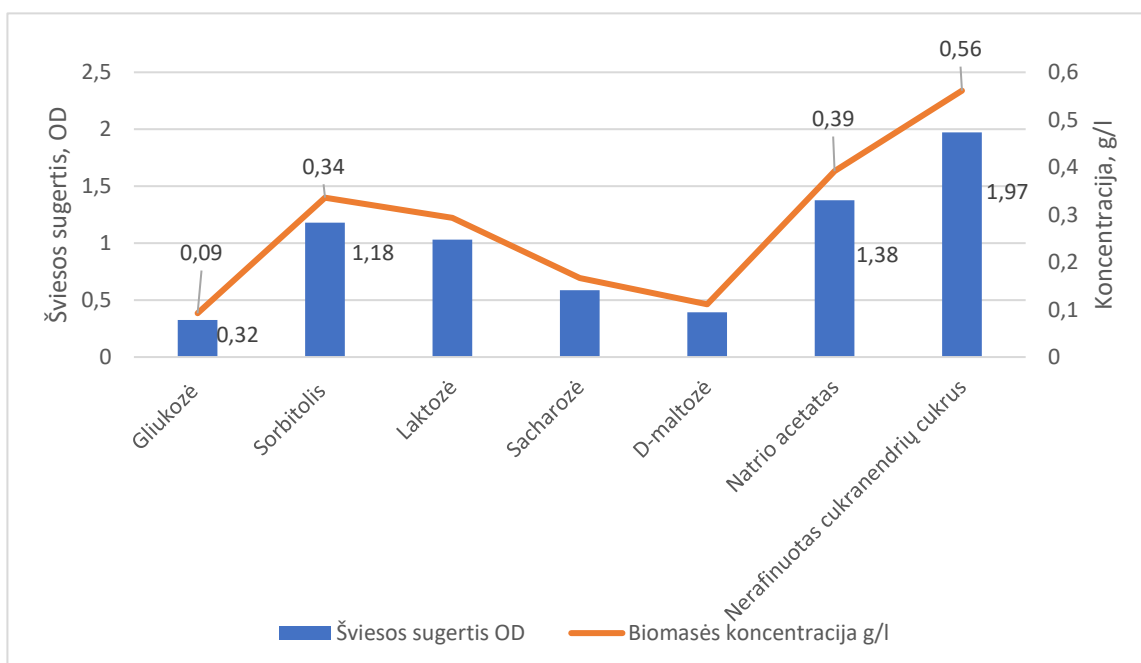
3.1 pav. Šviesos sugerties ir biomasės koncentracija fermentacinėje terpėje po 24 valandų

Iš rezultatų matoma (žr. 3.1 pav.), kad po 24 valandas trukusios fermentacijos, didžiausia biomasės koncentracija, t. y. didžiausias mikroorganizmų augimas pastebimas ten, kur mitybiniais šaltiniais naudoti fruktozė (0,29 g/l), kokosų palmių žiedų cukrus (0,28 g/l) bei D-maltozė (0,27 g/l). Panaudojus šiuos anglies šaltinius, gaunamas didesnis biomasės augimas per 24 valandas, palyginus su įprastai naudojama gliukoze (0,20 g/l).



3.2 pav. Šviesos sugerties ir biomasės koncentracija fermentacinėje terpėje po 48 valandų

Po 48 valandas trukusios fermentacijos (žr. 3.2 pav.), didžiausias biomasės prieaugis pastebėtas naudojant sacharozę (0,32 g/l), kokosų palmių žiedų cukrų (0,31 g/l) ir nerafinuotą cukranendrių cukrų (0,30 g/l). Po 48 valandų visi tirti alternatyvūs gliukozei anglies šaltiniai parodė didesnę biomasės prieaugį.



3.3 pav. Šviesos sugerties ir biomasės koncentracija fermentacinėje terpėje po 72 valandų

Fermentacijos trukmei pasiekus 72 valandas (žr. 3.3 pav.) matomi biomasės prieaugiai, kur geriausi rezultatai pasiekti vykdant fermentaciją su nerafinuotu cukranendrių cukrumi (0,56 g/l), natrio acetatu

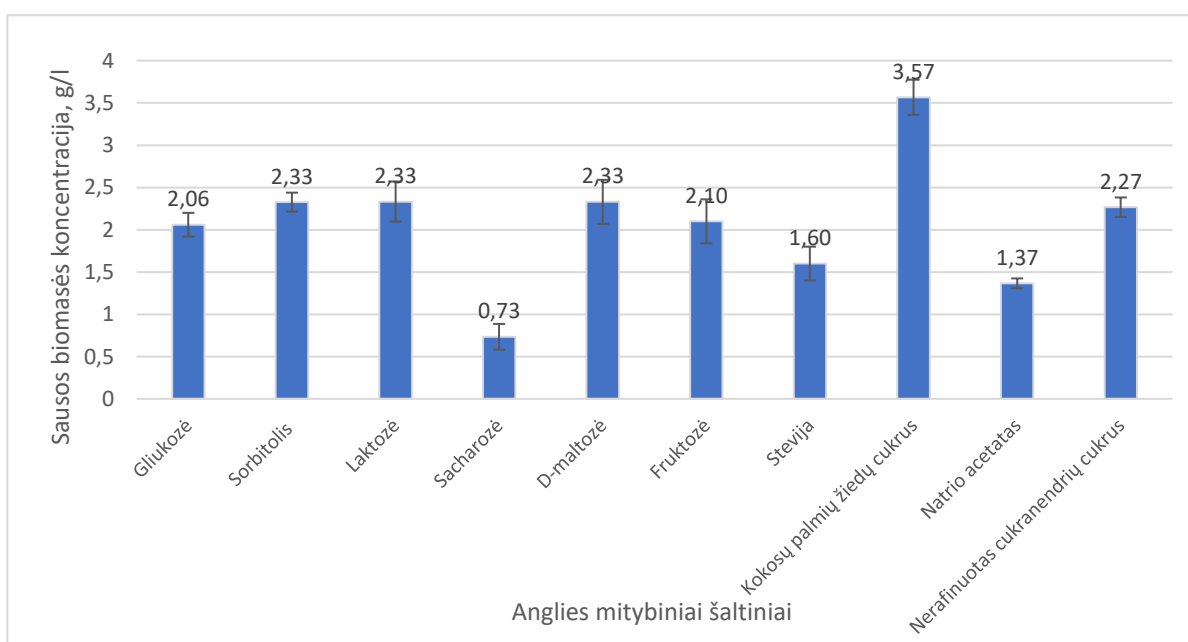
(0,39 g/l) ir sorbitoliu (0,34 g/l). Šių panaudotų anglies šaltinių biomasės prieaugiai yra žymiai didesni, nei panaudojant gliukozę (0,09 g/l).

3.2.pH kitimo priklausomybės nuo naudojamo anglies mitybinio šaltinio įvertinimas

pH kinta proceso metu mažėjimo linkme, t. y. terpė rūgštėja. Daugeliu atveju pastebimas terpės pH sumažėjimas iki pH 5,5–5. Vienas atvejis išsiskiria iš visų tiriamųjų mėginių: naudojant natrio acetatą, kaip mitybinį anglies šaltinį, terpės pH pasiekė 8.

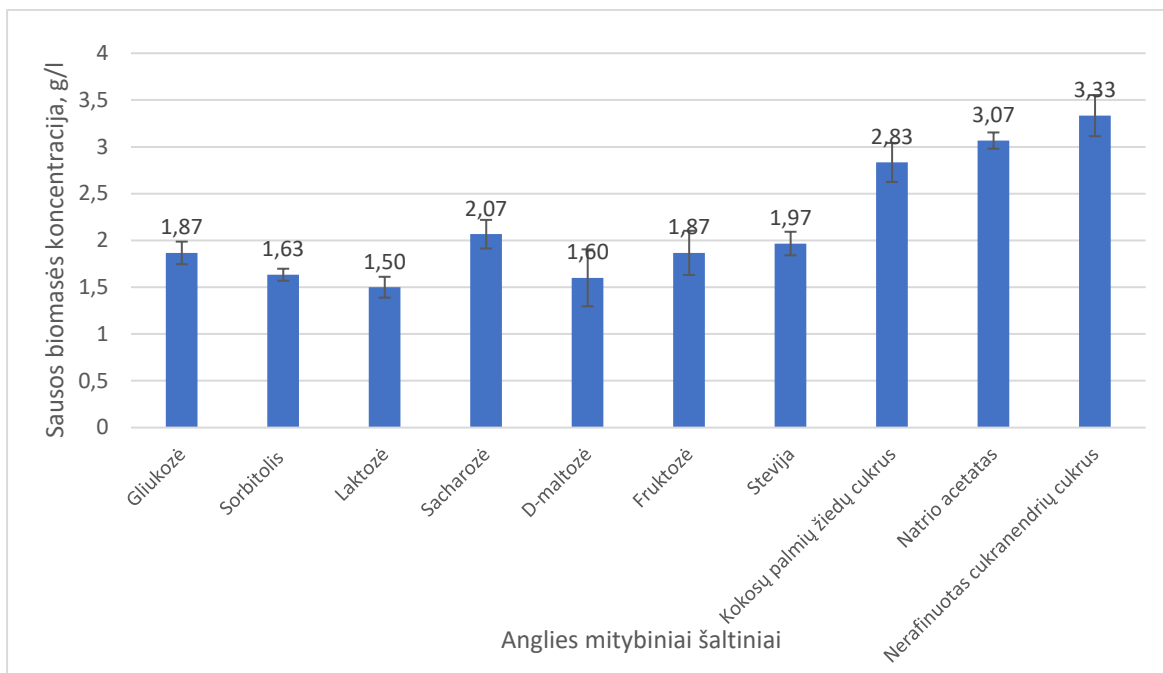
3.3.Sausos biomasės koncentracijos nuo naudojamo anglies mitybinio šaltinio įvertinimas

Sausos biomasės koncentracija buvo matuota po 24, 48 ir 72 valandas trunkančios fermentacijos ir perskaičiuota į gramus viename litre.



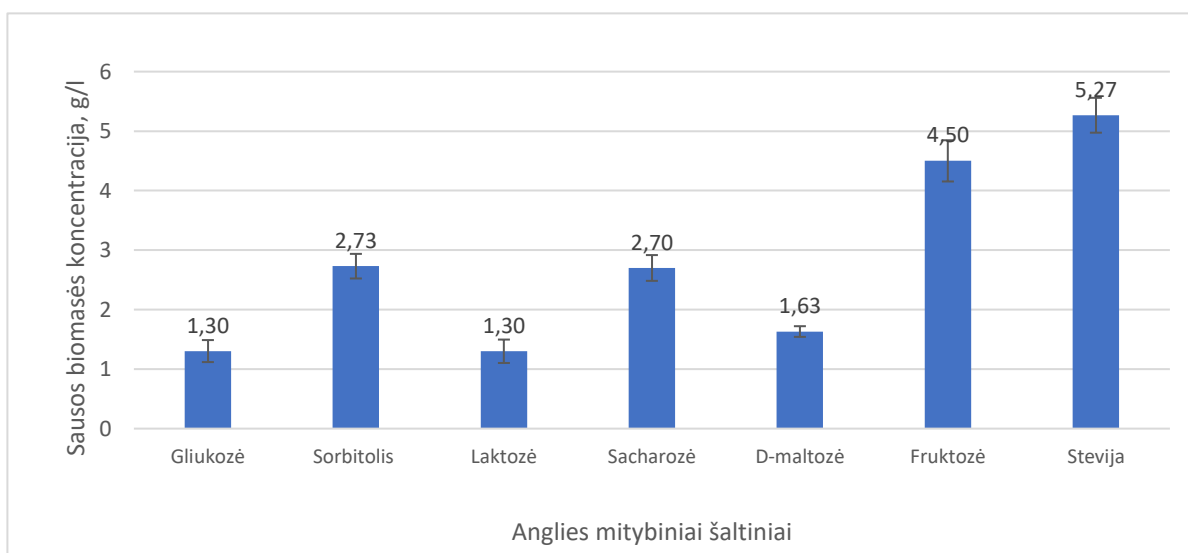
3.4 pav. Sausos biomasės koncentracija po 24 valandų fermentacijos

Pastebima, kad po 24 valandas trukusios fermentacijos (žr. 3.4 pav.), didžiausia sausos biomasės koncentracija gaunama naudojus anglies mitybinius šaltinius: kokosų palmių žiedų cukrų (3,57 g/l) ir sorbitolį (2,33 g/l), laktozę (2,33 g/l) bei D-maltozę (2,33 g/l). Palyginus su sausa biomasės koncentracija po 24 valandų fermentacijos su gliukozę (2,06 g/l), alternatyvūs anglies mitybiniai šaltiniai parodė geresnius rezultatus.



3.5 pav. Sausos biomasės koncentracija po 48 valandų fermentacijos

Po 48 valandų fermentacijos (žr. 3.5 pav.), didžiausia sausos biomasės koncentracija yra pasiekama kaip anglies mitybinius šaltinius naudojant nerafinuotą cukranendrių cukrų (3,33 g/l), natrio acetatą (3,07 g/l) ir kokosų palmių žiedų cukrų (2,83 g/l). Šie rezultatai pranoksta rezultatus gaunamus panaudojant gliukozę (1,87 g/l).

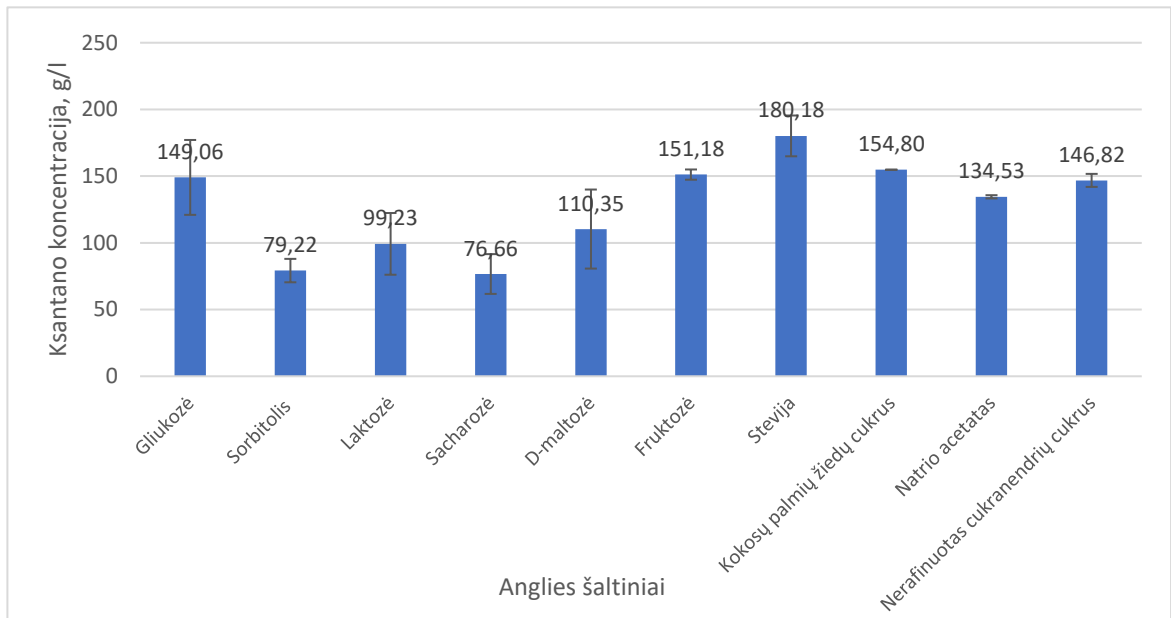


3.6 pav. Sausos biomasės koncentracija po 72 valandų fermentacijos

Po 72 valandas trukusios fermentacijos (žr. 3.6 pav.), geriausi rezultatai pasiekti kaip anglies mitybinį šaltinį panaudojus nerafinuotą cukranendrių cukrų (5,27 g/l), natrio acetatą (4,50 g/l) ir sorbitolį (2,73 g/l).

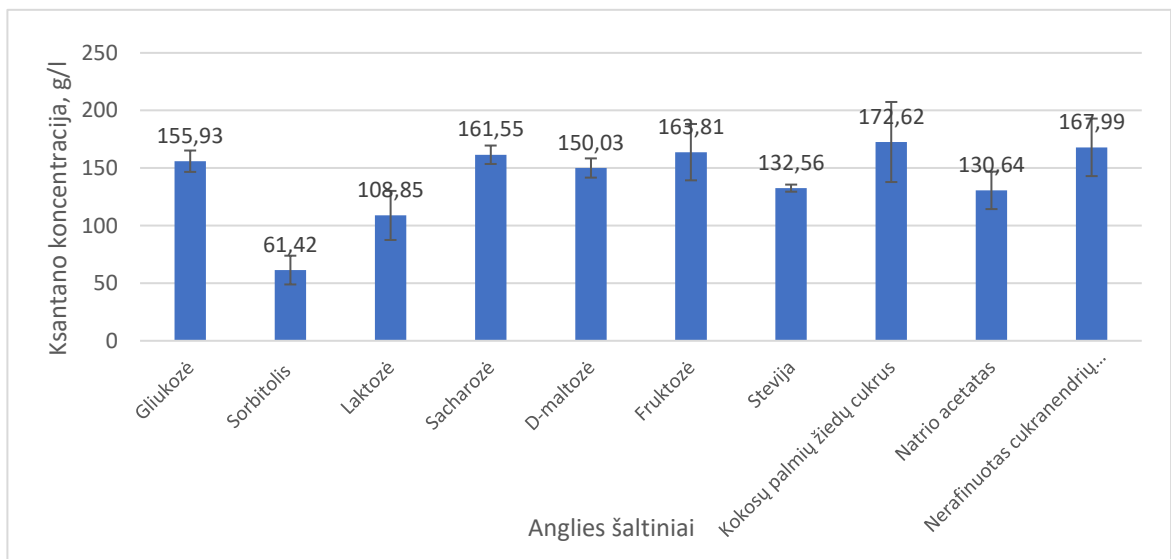
3.4. Biosintezės būdu gauto ksantano koncentracijos priklausomybės nuo naudojamo anglies mitybinio šaltinio įvertinimas

Išsiskyrusio ksantano koncentracija buvo nustatoma po 24, 48 ir 72 valandų fermentacijos ir perskaičiuojama į gramus viename litre.



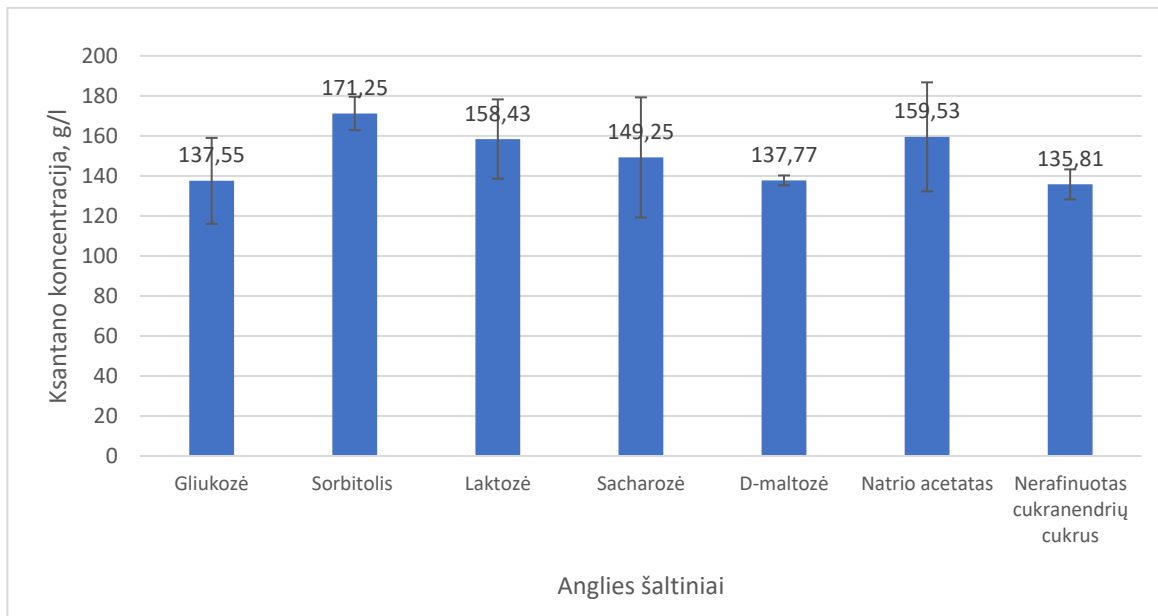
3.7 pav. Ksantano koncentracija po 24 valandų fermentacijos

Pagal gautus duomenis (žr. 3.7 pav.) matyti, kad po 24 valandas trukusios fermentacijos, didžiausia ksantano koncentracija gaunama panaudojant steviją (180,18 g/l), kokosų palmių žiedų cukrų (154,80 g/l) bei fruktozę (151,18 g/l). Tik šie trys alternatyvūs anglies mitybiniai šaltiniai po 24 valandų parodo geresnį ksantano sintezės rezultatą nei panaudojant gliukozę (149,06 g/l).



3.8 pav. Ksantano koncentracija po 48 valandų fermentacijos

Po 48 valandų fermentacijos (žr. 3.8 pav.), daugiausiai ksantano susintetinama kaip anglies mitybinį šaltinį panaudojant kokosų palmių žiedų cukrų (172,62 g/l), nerafinuotą cukranendrių cukrų (167,99 g/l) ir fruktozę (163,81 g/l). Palyginus su rezultatu gaunamu naudojant gliukozę (155,93 g/l) šių anglies šaltinių panaudojimas suteikia šiek tiek geresnius rezultatus.

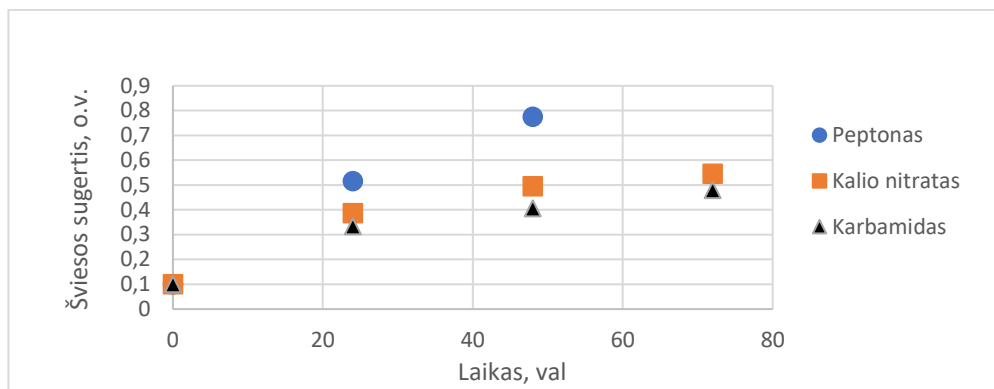


3.9 pav. Ksantano koncentracija po 72 valandų fermentacijos

72 valandas trukusi fermentacija (žr. 3.9 pav.) parodo, kad geriausi rezultatai gauti panaudojant kaip anglies mitybinį šaltinį sorbitolį (171,25 g/l), natrio acetatą (159,53 g/l) bei laktozę (158,43 g/l). Jie visi parodo geresnį rezultatą nei naudojant gliukozę (137,55 g/l).

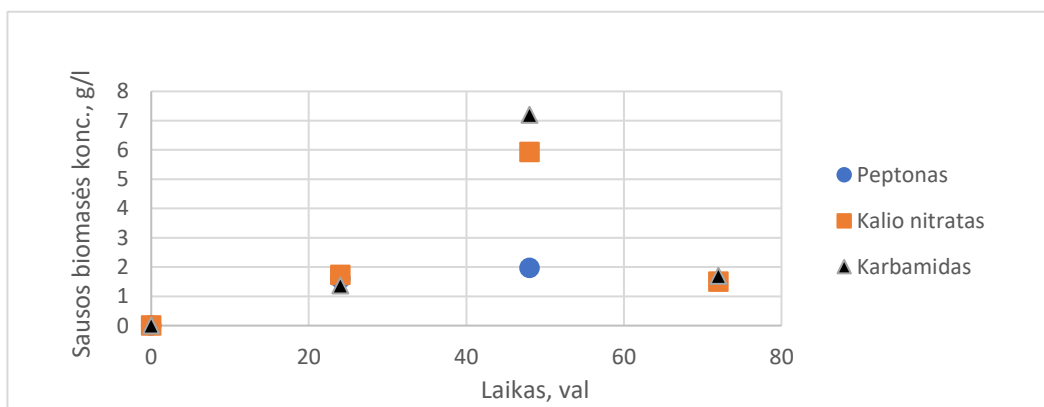
3.5. Rodiklių priklausomybės nuo azoto mitybinio šaltinio įvertinimas

Toliau atlikti tyrimai nustatyti azoto mitybinio šaltinio įtakai ksantano gamybai. Tyrime kaip anglies šaltinis naudota stevija, nes iš prieš tai atliktų anglies mitybinių šaltinių panaudojimo tyrimų, matome, kad po 24 valandų fermentacijos panaudojus šį anglies šaltinį susintetinamos didžiausios ksantano koncentracijos – 180,18 g/l (žr. 3.7 pav.). Kaip mitybinis azoto šaltinis ankstesniuose tyrimuose naudotas peptonas, buvo keičiamas kalio nitratu ir karbamidu.



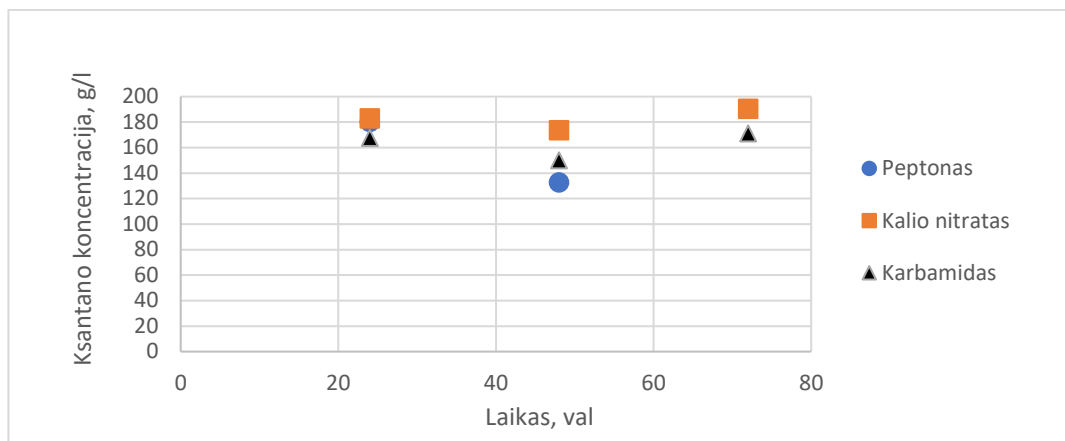
3.10 pav. Biomasės koncentracijos priklausomybė nuo naudojamo azoto mitybinio šaltinio fermentacijos metu

Atlikus tyrimus po 24, 48 ir 72 valandų trukmės fermentacijos, gauti rezultatai (žr. 3.10 pav.) parodo, kad peptonas yra tinkamiausias azoto šaltinis siekiant didžiausios *Xanthomonas* bakterijų biomasės koncentracijos, t. y. didžiausio biomasės augimo.



3.11 pav. Sausos biomasės koncentracijos priklausomybė nuo naudojamo azoto mitybinio šaltinio fermentacijos metu

Pagal gautus rezultatus (žr. 3.11 pav.) matyti, kad po 24 valandų susidariusi sausos biomasės koncentracija tarp naudotų azoto mitybinių šaltinių skiriasi minimaliai. Po 48 valandų didžiausia sausos biomasės koncentracija pasiekta naudojant karbamidą kaip azoto mitybinį šaltinį.



3.12 pav. Ksantano koncentracijos priklausomybė nuo naudojamo azoto mitybinio šaltinio fermentacijos metu

Išgaunamo ksantano koncentracija po 24 valandų (žr. 3.12 pav.) minimaliai skiriasi tarp fermentacijos terpių, kuriose naudojamas peptonas ir kalio nitratas, o panaudojant karbamidą gaunama mažesnė ksantano koncentracija nei su pastaraisiais. Po 48 valandų pastebimas skirtumas tarp kalio nitrato ir peptono panaudojimo – didesnės ksantano koncentracijos susidaro panaudojant kalio nitrata kaip mitybinį azoto šaltinį.

Išanalizavus gautus rezultatus, galime teigti, kad geriausi rezultatai gaunami panaudojant kalio nitrata kaip mitybinį azoto šaltinį. Jį panaudojus fermentacijai, gaunamas mažesnis biomasės augimas ir didesnė tikslinio produkto – ksantano – koncentracija (182,88 g/l).

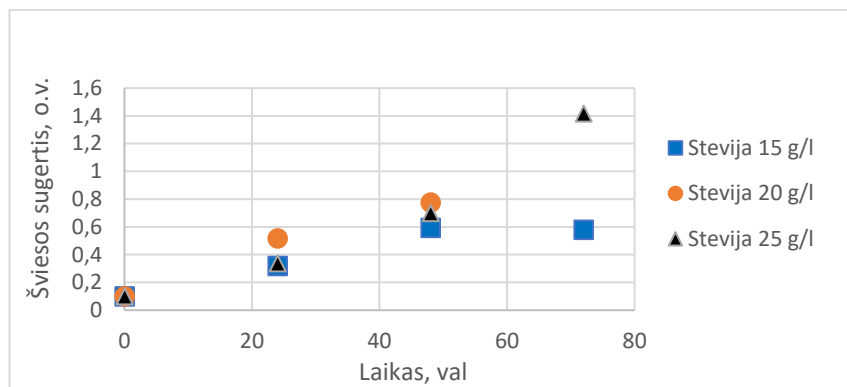
3.6. Mitybinio anglies šaltinio koncentracijos įtakos ksantano gamybai įvertinimas

Iš prieš tai gautų rezultatų nustatyta, kad geriausi proceso rezultatai gaunami kaip anglies mitybinį šaltinį naudojant stviją ir kokosų palmių žiedų cukrų, todėl nustatyti mitybinio anglies šaltinio koncentracijos įtaką ksantano gamybai pasirinkti šie du substratai.

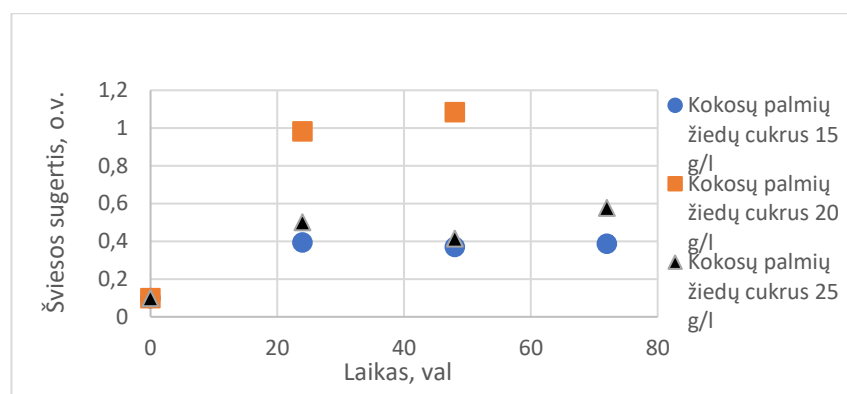
Moksliniuose straipsniuose teigiama, kad optimali koncentracija yra 20 g/l, kuri ir buvo naudojama tirti mitybiniais anglies šaltiniais. Tiriant koncentracijos įtaką pasirinktos dar 15 g/l ir 25 g/l koncentracijos.

3.6.1. Koncentracijos įtakos biomasės augimui įvertinimas

Stvijos ir kokosų palmių žiedų cukraus koncentracijos įtaką biomasės augimui galima vertinti pagal biomasės koncentracijos nustatymą šviesos sugerties tyrimu arba sausos biomasės koncentracijos nustatymu.



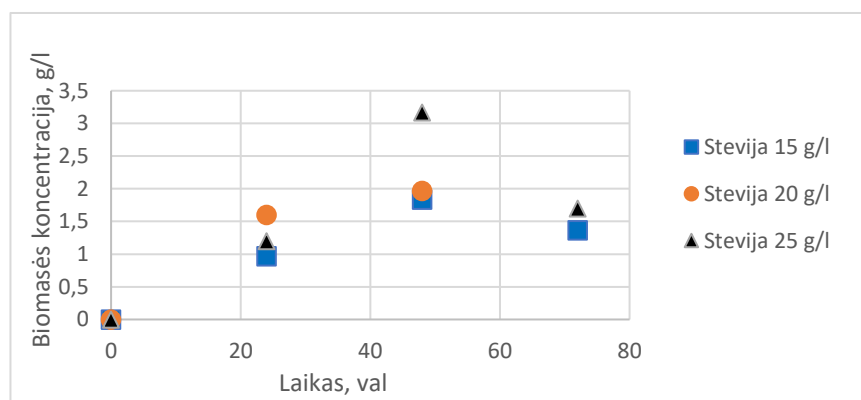
3.13 pav. Stevijos koncentracijos įtaka biomasės koncentracijos kitimui fermentacijoje



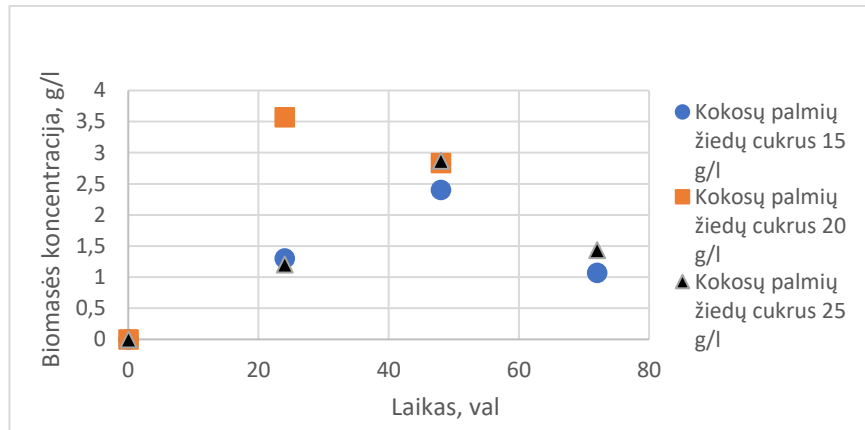
3.14 pav. Kokosų palmių žiedų cukraus koncentracijos įtaka biomasės koncentracijos kitimui fermentacijoje

Iš šių grafikų (žr. 3.13 ir 3.14 pav.) matyti, kad po 24 ir 48 valandų geriausias biomasės augimas pasiekiamas naudojant 20 g/l anglies šaltinio koncentraciją, nepriklausomai ar tai būtų stevijos ar kokosų palmių žiedų cukrus. Naudojant mažesnes ar didesnes anglies šaltinio koncentracijas nepasiekiami tokie geri biomasės koncentracijos rezultatai, kaip naudojant 20 g/l.

Sausos biomasės koncentracijos priklausomybė nuo naudojamos anglies šaltinio koncentracijos fermentacijos terpėje parodyta sekančiuose grafikuose.



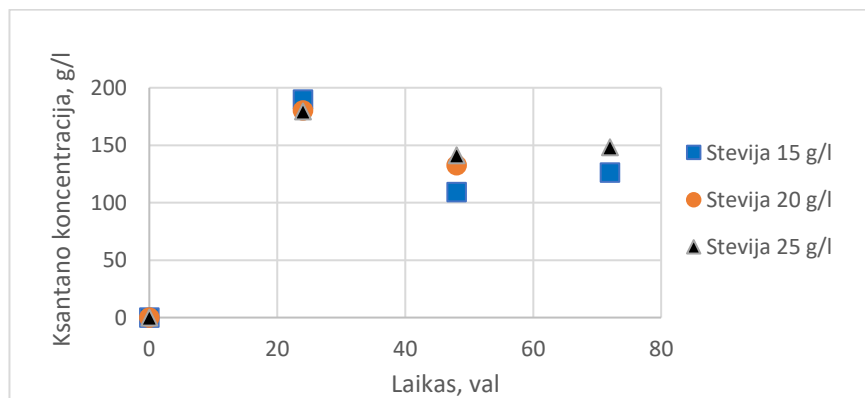
3.15 pav. Stevijos koncentracijos įtaka sausos biomasės kiekio kitimui fermentacijoje



3.16 pav. Kokosų palmių žiedų cukraus koncentracijos įtaka sausos biomasės kiekio kitimui fermentacijoje

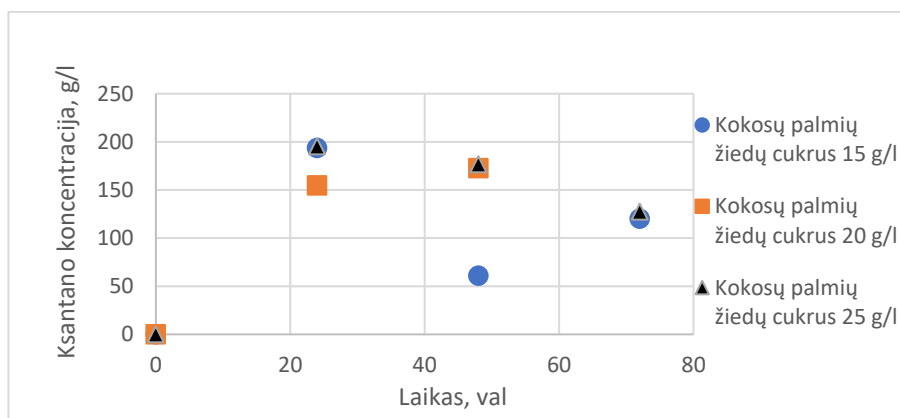
Iš rezultatų (žr. 3.15 ir 3.16 pav.) matyti, kad naudojant didesnę ar mažesnę nei 20 g/l anglies mitybinio šaltinio kiekį, fermentacijos terpėje pasiekama mažesnė sausos biomasės koncentracija po 24 valandų fermentacijos. Po 48 valandų didesnė stevijos koncentracija parodo geresnius rezultatus, bet kokosų palmių žiedų cukraus didesnė koncentracija susilygina su vidutinės koncentracijos rezultatais.

3.6.2. Anglies mitybinio šaltinio koncentracijos įtakos susintetinamo ksantano koncentracijai įvertinimas



3.17 pav. Biosintezės būdu gauto ksantano koncentracijos priklausomybė nuo stevijos koncentracijos fermentacijos terpėje

Stevijos koncentracijos fermentacijos terpėje įtaka susidarancio ksantano koncentracijai matyti grafike (žr. 3.17 pav.). Po 24 valandų panaudotų skirtingų anglies šaltinio koncentracijų rezultatai yra labai panašūs, bet po 48 valandų didesnės stevijos koncentracijos fermentacijos terpėje yra išgaunamas mažesnis produkto kiekis, nei panaudojant 20 g/l ar 15 g/l koncentracijas.



3.18 pav. Biosintezės būdu gauto ksantano koncentracijos priklausomybė nuo kokosų palmių žiedų cukraus koncentracijos fermentacijos terpėje

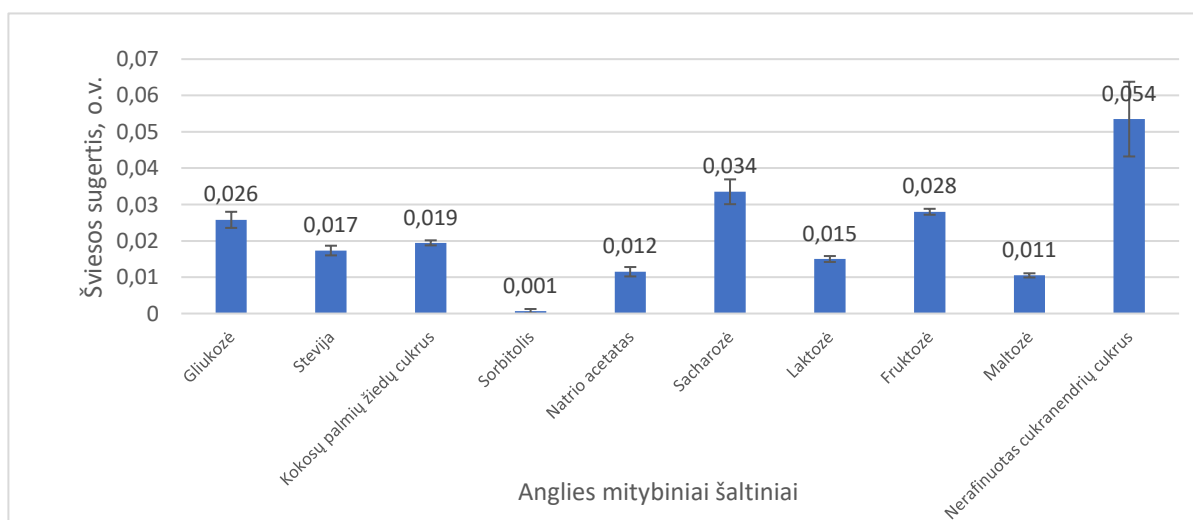
Iš gautų rezultatų (žr. 3.18 pav.) matyti, kad po 24 valandų trukmės fermentacijos, panaudojant 15 g/l ir 25 g/l kokosų palmių žiedų cukraus koncentracijas yra pasiekiami geresni rezultatai, nei su 20 g/l koncentracija. Po 48 valandų fermentacijos terpėje su 15 g/l pradine anglies šaltinio koncentracija matomas stiprus ksantano koncentracijos sumažėjimas, 20 g/l ir 25 g/l pradinių koncentracijų fermentacijos terpės beveik nerodo skirtumo. Iš šių rezultatų galima teigti, kad gaunant tokią pačią galutinio produkto koncentraciją panaudojant 20 g/l ir 25 g/l pradines anglies šaltinio koncentracijas, didesnės koncentracijos naudoti nėra praktiška.

3.7. Ksantano mėginių redukcinių savybių tyrimai

Atlikti skirtingi tyrimai ksantano mėginių savybių įvertinimui ir palyginimui.

3.7.1. Fe III redukuojančių savybių įvertinimas

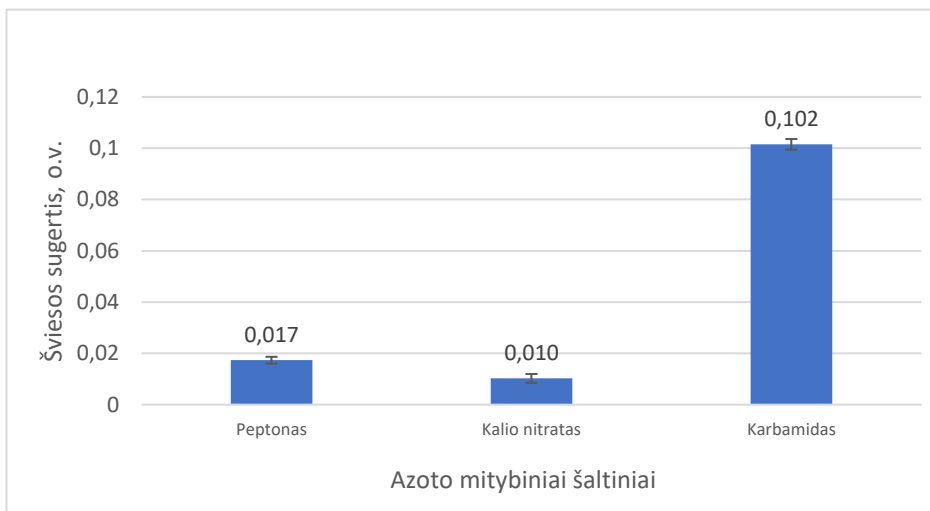
Xsantanas susintetintas panaudojant skirtingus anglies mitybinius šaltinius ir vėliau atliktas redukcinių savybių tyrimas, kurio metu gauti rezultatai pateikti grafike (žr. 3.19 pav).



3.19 pav. Reducinių savybių tyrimo rezultatai anglies šaltinio įtakos vertinimui

Atlikus Fe III redukcinių savybių tyrimą (žr. 3.19 pav.), matyti, kad stipriausiomis redukcinėmis savybėmis, redukuojant Fe III į Fe II, pasižymi ksantanas, susintetintas panaudojant nerafinuotą cukranendrių cukrų (0,054 o.v.) kaip mitybinį anglies šaltinį. Taip pat gerus rezultatus parodė ksantano mėginiai, kuriems sintetinti naudoti sacharozės (0,034 o.v.) bei fruktozės (0,028 o.v.) anglies šaltiniai. Panaudojant šiuos tris anglies mitybinius šaltinius, gaunamas ksantanas, kurio Fe III redukcinės savybės yra geresnės nei panaudojant gliukozę (0,026 o.v.) kaip anglies šaltinį.

Tyrimas atliktas ir išgautam ksantanui panaudojant skirtingus azoto šaltinius.

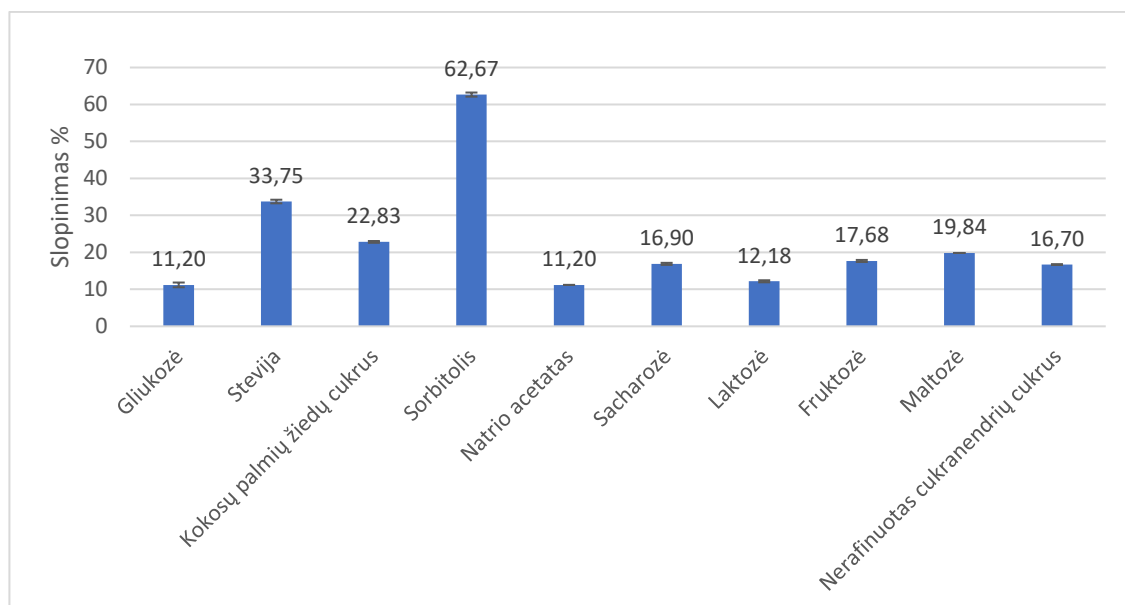


3.20 pav. Reducinių savybių tyrimo rezultatai azoto šaltinio įtakos vertinimui

Vertinant azoto mitybinio šaltinio įtaką gaunamo ksantano Fe III redukuojančioms savybėms (žr. 3.20 pav.), nustatyta, kad stipriausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo ksantano mėginys, susintetintas mitybinėje terpėje kaip azoto šaltinį panaudojant karbamidą (0,10 o.v.). Kalio nitrato panaudojimas suteikė ksantanui silpnesnes redukcines savybes (0,02 o.v.), nei įprastai mitybinėje terpėje naudojamas peptonas (0,02 o.v.).

3.7.2. Antioksidacinių savybių tyrimas slopinant DPPH junginį.

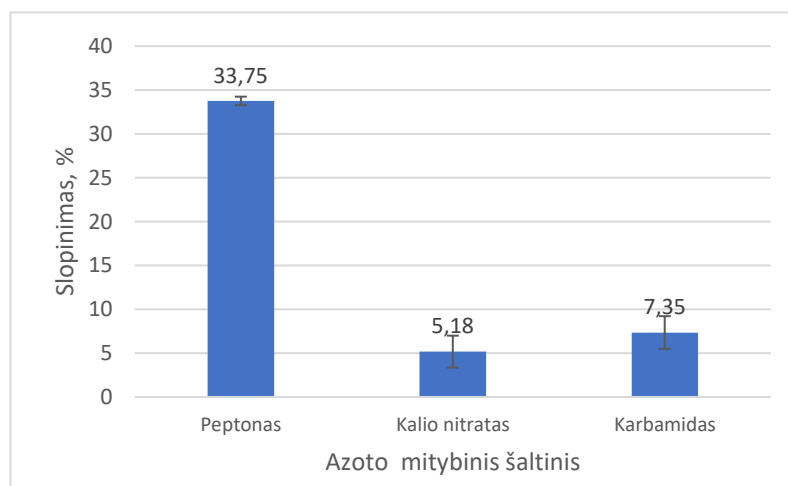
DPPH slopinimo tyrimas iš pradžių atliktas ksantano mėginiams gautiems tiriant skirtingus anglies mitybinius šaltinius jų fermentacijai. Gauti rezultatai pateikti grafike.



3.21 pav. DPPH tyrimo rezultatai įvertinant anglies mitybinio šaltinio įtaką

DPPH slopinimo nustatymo tyrime (žr. 3.21 pav.), geriausias antioksidacinius rezultatus parodė ksantanas, kurio sintezei kaip anglies šaltinis panaudotas sorbitolis (62,67 %). Taip pat geri rezultatai gauti naudojant steviją (33,75 %) bei kokosų palmių žiedų cukrų (22,83 %). Šie ksantano mėginiai pasižymėjo žymiai stipresnėmis antioksidacinėmis savybėmis, nei mėginys, kurio sintezei naudota gliukozė (11,20 %).

Taip pat DPPH tyrimas atliktas ksantano mėginiams tiriant skirtingų azoto mitybinių šaltinių įtaką.

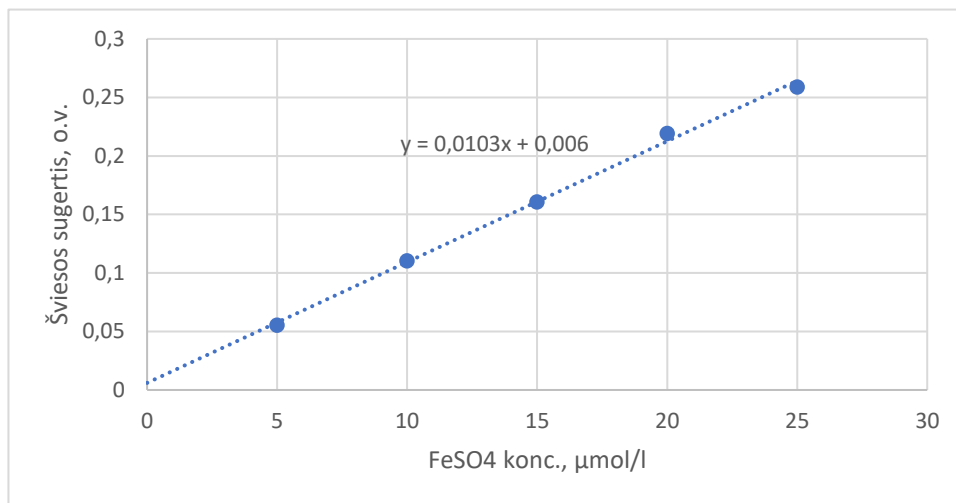


3.22 pav. DPPH tyrimo rezultatai įvertinant azoto mitybinio šaltinio įtaką

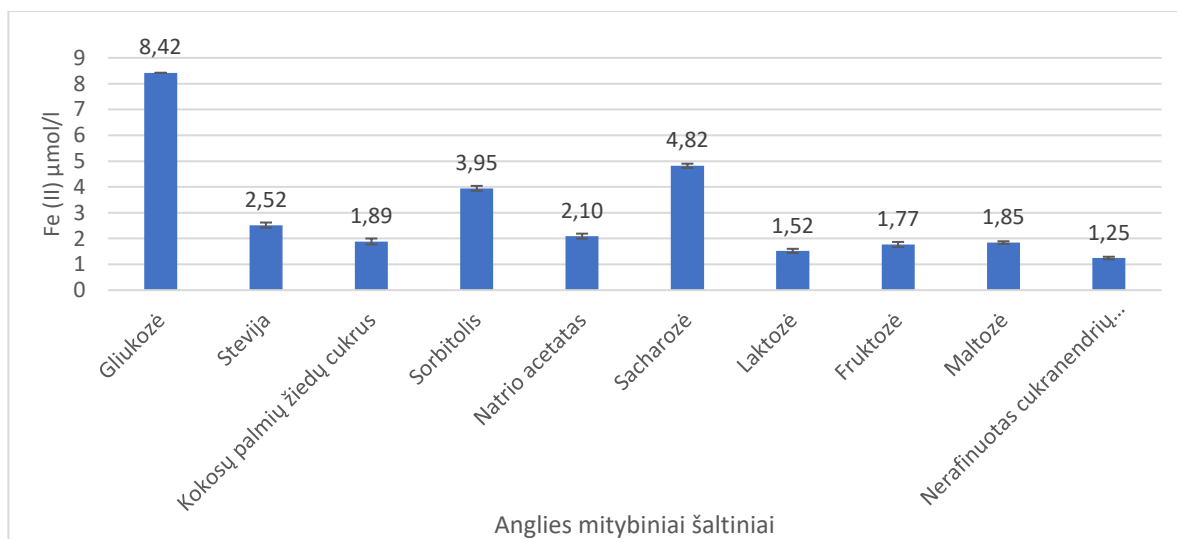
Atlikus DPPH slopinimo tyrimą mėginiams susintetintiems panaudojant skirtingus azoto mitybinius šaltinius, gauti rezultatai parodo (žr. 3.22 pav.), kad pakeitus įprastai naudojamą peptoną (33,75 %) kalio nitratu (5,18 %) ar karbamidu (7,35 %) gautas ksantanas pasižymi prastesnėmis antioksidacinėmis savybėmis.

3.7.3. Antioksidacinių savybių nustatymas FRAP metodu

FRAP tyrimas, kaip ir prieš tai atlikti, pirmiausia atliktas ksantanui gautam panaudojant skirtingus anglies mitybinius šaltinius, vėliau skirtingus azoto mitybinius šaltinius. Tyrimo metu matuota ir vėliau skaičiavimams naudota kalibracinė kreivė pateikta 3.23 grafike.

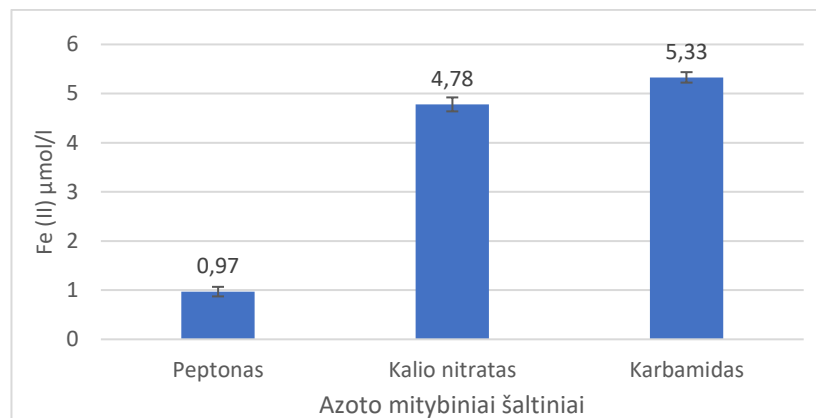


3.23 pav. FRAP tyrimo kalibracinė kreivė (FeSO₄)



3.24 pav. FRAP tyrimo rezultatai įvertinti anglies mitybinio šaltinio įtaką

Atlikus FRAP tyrimą, matyti (žr. 3.24 pav.), kad geriausi antioksidaciniai rezultatai gaunami su ksantanu, kurio sintezei panaudota gliukozė (8,42 μmol/l). Tiriant alternatyvių anglies mitybinių šaltinių įtaką, gauti prastesni rezultatai nei su įprastai naudojama gliukoze. Iš alternatyvų šaltinių labiausiai išsiskyrė ksantano mėginiai, kurių sintezei panaudota sacharozė (4,82 μmol/l) bei sorbitolis (3,95 μmol/l).

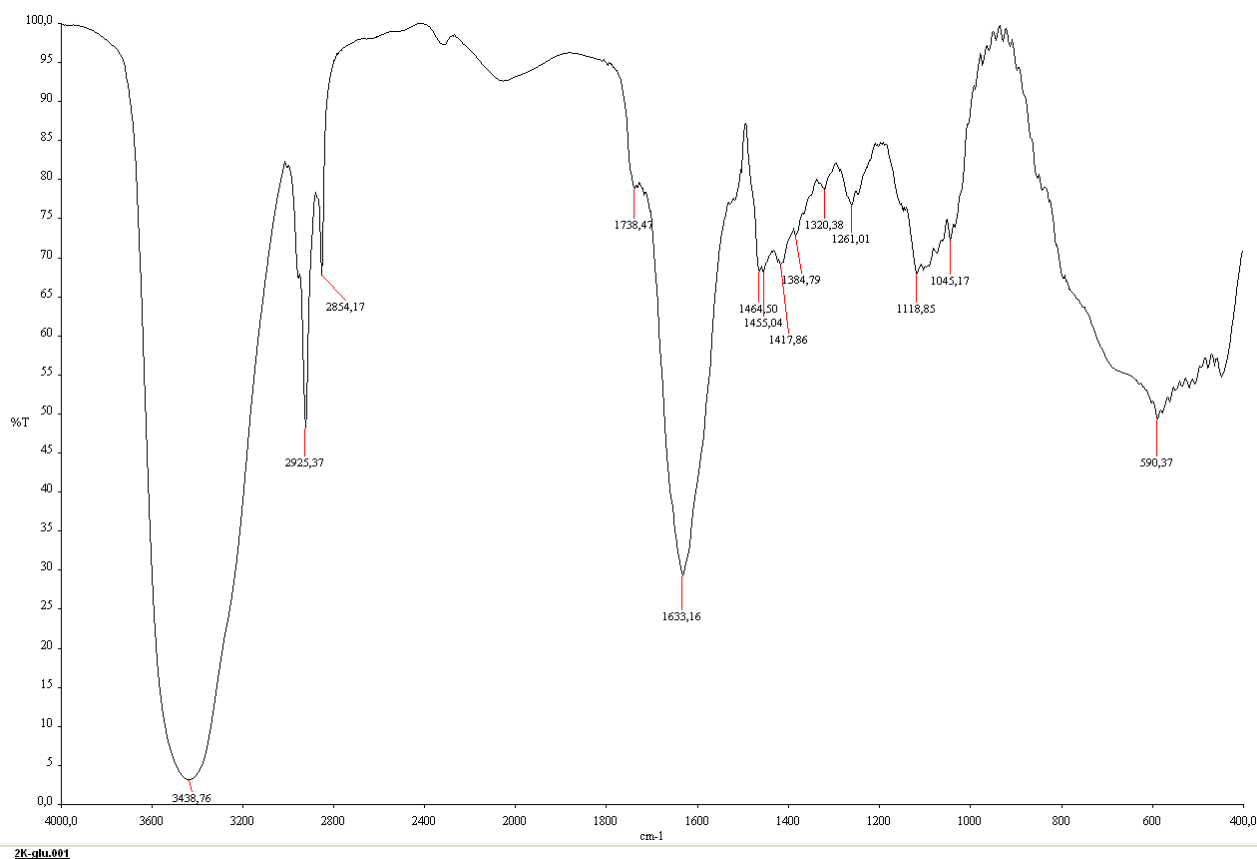


3.25 pav. FRAP tyrimo rezultatai įvertinti azoto mitybinio šaltinio įtaką

FRAP tyrimas skirtingiems azoto šaltiniams parodė (žr. 3.25 pav.), kad tiek kalio nitratas (4,78 $\mu\text{mol/l}$), tiek karbamidas (5,33 $\mu\text{mol/l}$) suteikia stipresnes antioksidacines savybes susintetinamam ksantanui, nei panaudojant peptoną (0,97 $\mu\text{mol/l}$) kaip azoto mitybinį šaltinį .

3.8. FTIR tyrimo rezultatai

Trims ksantano mėginiams – ksantanui gautam panaudojant anglies šaltinius – gliukozę, sorbitolį bei kokosų palmių žiedų cukrų – buvo atliktas FTIR struktūros nustatymo tyrimas.



3.26 pav. Ksantano FTIR spektras

Spektras (žr. 3.26 pav.) gautas tyrimui naudojant mėginį, kurio sintezei panaudota gliukozė. Ties 3438,76 nm esanti plati absorbcijos juosta būdinga O-H jungties virpesiams. Ties 2925,37 nm esanti

absorbcijos juosta priklauso alifatiniams C-H virpesiams. Apie 1738,47 nm esantis signalas gali rodyti karboksilo grupes, o 1633,16 nm signalas gali priklausyti C=O jungčiai esančiai piruvato grupėse. Pirštų antspaudų srityje esantys signalai apie 1400 nm priklauso C-H jungties virpesiams, apie 1100 nm esantys signalai priklauso C-O-C jungtims.

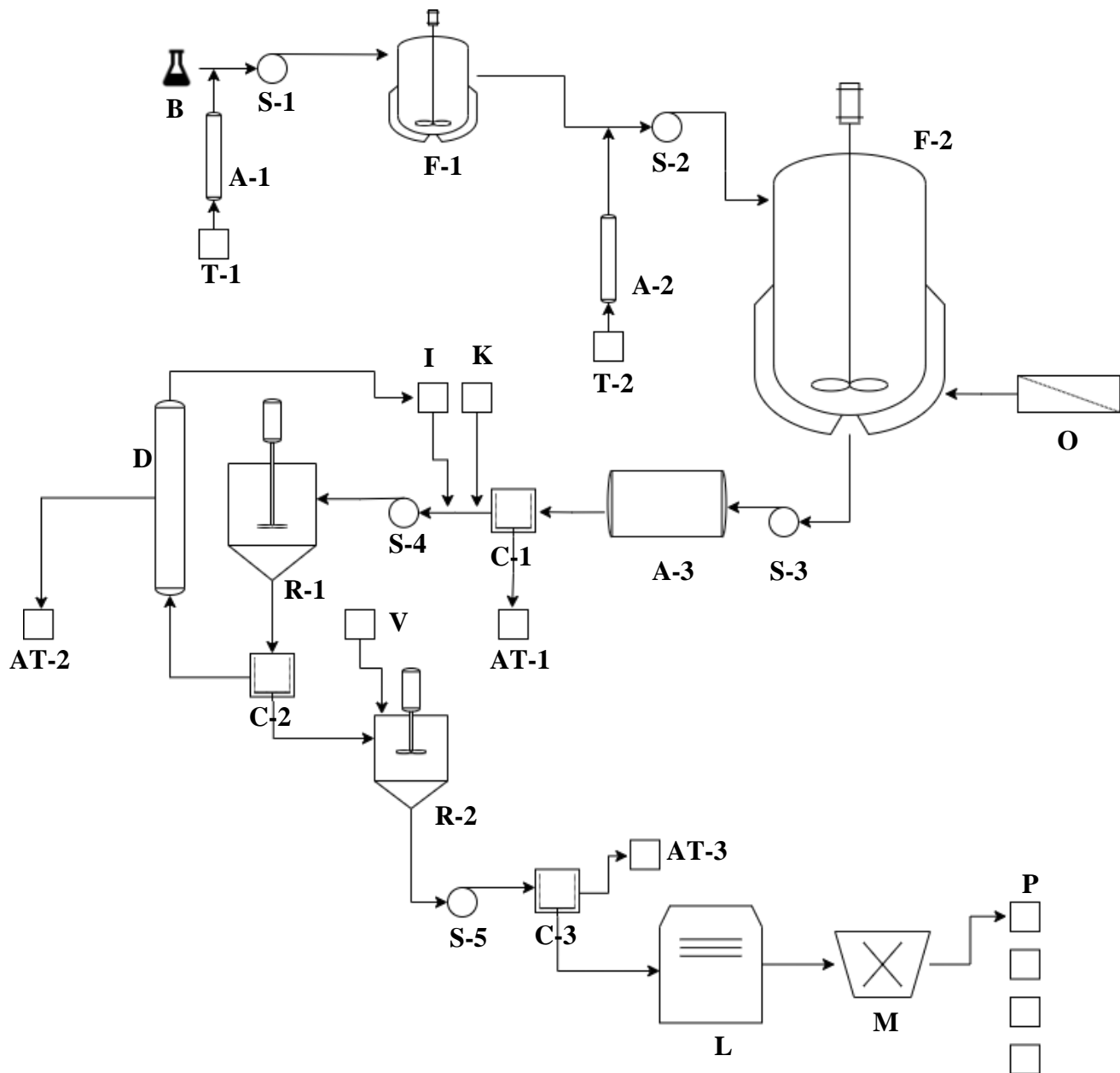
Užrašius spektrus ksantano mėginiams, kuriems sintetinti kaip anglies šaltinis naudoti sorbitolis ir kokosų palmių žiedų cukrus, gauti labai panašūs rezultatai, stebimi tose pačiose vietose esantys signalai ir nėra labai besiskiriančių smailių. Šie spektrai pateikti pirmame ir antrame priede.

4. Rekomendacijų dalis

Atlikus tyrimus ir gavus aptartus rezultatus, norint gauti efektyvią ksantano gamybą, rekomenduojama taikyti pateiktą gamybinę schemą. Į nedidelio tūrio fermentatorių **F-1** išcentrinio siurbliu **S-1** tiekiamas skystos atgaivintos *Xanthomonas campestris* bakterijų kolonijos **B**, bei LB terpė **T-1**, kuri prieš tiekimą yra sterilinama autoklave **A-1**. Fermentatoriuje **F-1** rekomenduojama palaikyti 30 °C temperatūrą kol vyksta bakterijų biomasės gausėjimas ir būna paruoštas inokuliantas. Toliau jis išcentrinio siurbliu **S-2** tiekiamas į fermentatorių **F-2**. Su inokuliantu kartu tiekiamas ir mitybinė terpė **T-2**, kuri yra sterilinama autoklave **A-2**. **T-2** mitybinėje terpėje yra 20 g/l anglies mitybinio šaltinio – stevijos, 25 g/l azoto mitybinio šaltinio – kalio nitrato ir 10 g/l mielių ekstrakto. Fermentatoriuje **F-2** palaikoma 30 °C temperatūra, maišymas ir tiekiamas deguonis iš oro filtro **O**. Rekomenduojama fermentacijos mišinį siurbliu **S-3** tiekti į autoklavą **A-3** pasterilizacijai, kad inaktyvinti ląsteles, pagerinti ksantano tirpumą ir deaktyvuoti terpėje esančius fermentus. Mišinys toliau tiekiamas į centrifugą **C-1**, kur atskiriamos ląstelės, jų nuolaužos bei kitos priemaišos ir pašalinamos į atliekas **AT-1**. Išdžiovinus ir pasvėrus šias atliekas, galima sužinoti sausos biomasės kiekį. Supernatantas iš centrifugos **C-1** išcentrinio siurbliu **S-4** tiekiamas į rezervą **R-1**, kur kartu tiekiamas kalio chlorido tirpalas (**K**) bei izopropanolis (**I**). Rezervuare **R-1** jie sumaišomi ir leidžiama kurį laiką iškristi ksantano nuosėdoms. Palaikoma +4 °C temperatūra. Toliau mišinys su nuosėdomis patenka į centrifugą **C-2**, kur nuosėdos atskiriamos išcentrine jėga, o supernatantas tiekiamas izopropanolio regeneracijai. Izopropanolis regeneruojamas distiliacijos kolonoje **D** ir grąžinamas kartoti ciklo, o likusios skysto atliekos **AT-2** pašalinamos. Iš centrifugos **C-2** drėgnos nuosėdos tiekiamos į rezervuarą **R-2**, kur praplaunamos distiliuotu vandeniu **V**. Toliau mišinys tiekiamas išcentrinio siurbliu **S-5** į centrifugą **C-3**, kur visas skystis pašalinamas į atliekas **AT-3**, o drėgnos nuosėdos tiekiamos džiovinti liofilizatoriuje **L**. Sausą ksantaną rekomenduojama susmulkinti malūniniame smulkintuve **M** ir supakuoti pakavimo įrenginyje **P**.

4.1 lentelė. Ksantano gamybos principinės aparatūrinės schemos žymėjimas

Žymėjimas	Reikšmė
A-1, A-2, A-3	Autoklavas
AT-1, AT-2, AT-3	Biomasės, tirpiklio ir praplovimo atliekos
B	<i>Xanthomonas campestris</i> skystos bakterijų kolonijos
C-1, C-2, C-3	Centrifuga
D	Distiliacijos kolona
F-1, F-2	Fermentatorius
K	Kalio chloridas
L	Liofilizatorius
M	Malūninis smulkintuvas
O	Oro filtras
P	Pakavimo įrenginiai
S-1, S-2, S-3, S-4, S-5	Siurblys
T-1, T-2	Mitybinė terpė
V	Distiliuotas vanduo



4.1 pav. Ksantano gamybos principinė aparatūrinė schema

Išvados

- 1) Šio darbo metu nustatyta naudojamų anglies mitybinių šaltinių įtaka *Xanthomonas campestris* sintetinio ksantano koncentracijai. Gauta, kad alternatyvūs anglies mitybiniais šaltiniais: stevija (180,18 g/l), kokosų palmių žiedų cukrus (154,80 g/l) ir fruktozė (151,18 g/l) padidino ksantano susidarymą, palyginus su įprastai fermentacijoje naudojama gliukoze po 24 valandų trukmės proceso. Po 48 valandų fermentacijos didžiausią ksantano koncentraciją parodė, kai fermentacijos terpėje buvo naudotas kokosų palmių žiedų cukrus (172,62 g/l), o po 72 valandų – sorbitolis (171,25 g/l). Atlikus šį tyrimą galime teigti, kad vykdant 24 valandų fermentaciją ir anglies mitybiniu šaltiniu naudojant steviją bus pasiekta didžiausia ksantano išeiga.

Tiriant skirtingų azoto mitybinių šaltinių įtaką ksantano sintezei, nustatyta, kad vykdant skirtingos trukmės fermentaciją, tinkamiausias azoto mitybinis šaltinis ksantano sintezei *Xanthomonas campestris* bakterijomis buvo kalio nitratas (182,88 g/l) lyginant su įprastai naudojamu peptonu (180,18 g/l). Tyrimo metu pastebėta, kad panaudojant steviją ir peptoną gautas mažesnis biomasės prieaugis nei kitų tiriamų šaltinių, bet didesnė ksantano išeiga.

- 2) Atlikti tyrimai parodė, kad iš trijų tirtų fermentacijos trukmių optimali buvo 24 valandų, nes gauta didžiausia ksantano išeiga (180,18 g/l). Didinti fermentacijos trukmę nėra optimalu, nes didėja gamybinės sąnaudos, o gaunamo produkto koncentracija beveik nekinta, ar net mažėja palyginus su 24 valandas trunkančia fermentacija.
- 3) Tyrimo metu buvo įvertinta anglies mitybinio šaltinio pradinės koncentracijos fermentacijos terpėje įtaka tikslinio produkto sintezei ir nustatyta, kad optimali anglies mitybinio šaltinio koncentracija buvo 20 g/l, bet šis rodiklis gali kisti priklausomai nuo naudojamo anglies mitybinio šaltinio.
- 4) Biosintezės būdu gauto ksantano mėginių antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas trimis metodais: Fe (III) redukcijos, DPPH ir FRAP metodu.
 - a) Geriausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo anglies mitybiniu šaltiniu ksantano sintezei panaudojant nerafinuotą cukranendrių cukrų (0,054 o.v.), o iš azoto mitybinių šaltinių – karbamidą (0,100 o.v.).
 - b) Intensyviausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo ksantanas, kurio sintezei naudotas sorbitolis (62,67 %) iš tirtų anglies mitybinių šaltinių, bei peptonas (33,75 %) iš azoto mitybinių šaltinių.
 - c) Alternatyvūs azoto šaltiniai (kalio nitratas ir karbamidas) parodė mažesnę FRAP aktyvumą Fe^{2+} koncentracijai (atitinkamai 4,78 $\mu\text{mol/l}$ ir 5,33 $\mu\text{mol/l}$), lyginant su gliukozės (8,42 $\mu\text{mol/l}$) šaltiniu.

Atsižvelgiant į šiuos rezultatus, galima teigti, kad ksantano sintezės mitybinius šaltinius reikia rinktis pagal tai kokių redukcinių savybių bus siekiama ir kokioje aplinkoje jis bus taikomas.

- 5) FTIR struktūros nustatymo tyrimo metu gautas spektras parodė tipines ksantano junginiui būdingos absorbcijos juostas – O-H, C-H, C=O, C-O-C ir kitų grupių jungčių virpesius.

Literatūros sąrašas

1. R. M. JOHNSON, N. TUCKER, L. Y. MWAIKAMBO. Biopolymers. *Rapra Technology Ltd.* 2003.
2. Y.A.-G. MAHMOUD, M.E. EL-NAGGAR, A. ABDEL-MEGEED, M. EL-NEWEHY. Recent Advancements in Microbial Polysaccharides: Synthesis and Applications. *Polymers*. 2021, 13, 4136. <https://doi.org/10.3390/polym13234136>.
3. A. SUKRU DEMIRCI, I. PALABIYIK, D. APAYDIN, M. MIRIK, T. GUMUS. Xanthan gum biosynthesis using *Xanthomonas* isolates from waste bread: Process optimization and fermentation kinetics. *LWT - Food Science and Technology*. 101 (2019) 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.018>.
4. F. GARCIA-OCHOA, V.E. SANTOS, J.A. CASAS, E. GOMEZ. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*. 18 (2000) 549-579. PII: S 0 734-9750(00)00050-1.
5. B. SUJITHRA, S. DEEPIKA, K. AKSHAYA, V. PONNUSAMI. Production and optimization of xanthan gum from three-step sequential enzyme treated cassava bagasse hydrolysate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 21 (2019) 101294. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101294>.
6. A. MOHSIN, K. ZHANG, J. HU, S. UR REHMAN, M. TARIQ, W. Q. ZAMAN, I. M. KHAN, Y. ZHUANG, M. GUO. Optimized biosynthesis of xanthan via effective valorization of orange peels using response surface methodology: A kinetic model approach. *Carbohydrate Polymers*. 181 (2018) 793–800. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.076>.
7. M. NEJADMANSOURI, E. SHAD, M. RAZMJOOEI, R. SAFDARIANGHOMSHEH, F. DELVIGNE, M. KHALESİ. Production of xanthan gum using immobilized *Xanthomonas campestris* cells: Effects of support type. *Biochemical Engineering Journal*. 157 (2020) 107554. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107554>.
8. M. H. ABU ELELLA, E. S. GODA, M. A. GAB-ALLAH, S. E. HONG, B. PANDIT, S. LEE, H. GAMAL, A. UR REHMAN, K. RO YOON. Xanthan gum-derived materials for applications in environment and eco-friendly materials: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 9 (2021) 104702. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104702>.
10. B. DE MÔNACO LOPES, V. LOPES LESSA, B. MORÉ SILVA, M. A. DA SILVA CARVALHO FILHO, E. SCHNITZLER, L. GUSTAVO LACERDA. Xanthan gum: properties, production conditions, quality and economic perspective. 2015. *National Agricultural and Food Centre (Slovakia). J. Food Nutr. Res.*, 54, 2015, pp. 185–194.
11. J. TECKENTRUP, O. AL-HAMMOOD, T. STEFFENS, H. BEDNARZ, V. WALHORN, K. NIEHAUS, D. ANSELMETTI. Comparative analysis of different xanthan samples by atomic force microscopy. *Journal of Biotechnology*. 257 (2017) 2–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.032>.

12. H.A. MURAD, S. H. MOHAMED and A. G. ABU-EL-KHAIR. Impact of amino acids, nitrogen source and buffering system on xanthan yield produced on hydrolyzed whey lactose. *Biotechnology*. 2017.16: 69-76.
13. S. ROSALAM, R. ENGLAND. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas compestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 39 (2006) 197–207. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.019.
14. M. H. ABU ELELLA, R. R. MOHAMED, E. ABD ELHAFEEZ, M. W. SABAA. Synthesis of novel biodegradable antibacterial grafted xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*. 173 (2017) 305–311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.058>.
15. G. AKAN and E. TOKSOY ONER. Gel Properties of Microbial Polysaccharides. *Springer Nature Switzerland AG 2022 J. M. Oliveira et al. (eds.), Polysaccharides of Microbial Origin*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42215-8_34.
16. X. HU , K. WANG, M. YU, P. HE, H. QIAO, H. ZHANG AND Z. WANG. Characterization and Antioxidant Activity of a Low-Molecular-Weight Xanthan Gum. *Biomolecules*. 2019, 9, 730; doi:10.3390/biom9110730.
17. R. ISMAYILOV, F. VALIYEV, W.Z. WANG, G.H. LEE, S.M. PENG. Linear trinuclear nickel (II) complexes and 1D zigzag chain copper (II) coordination polymer with pyrazine-modulated unsymmetrical N-(pyridin-2-yl)pyrazin-2-amine ligand. *Book of Abstracts*. 2016, v. II, p. 244
18. S. BAPTISTA AND F. FREITAS. Bacterial Polysaccharides: Cosmetic Applications. *Springer Nature Switzerland AG 2022. J. M. Oliveira et al. (eds.), Polysaccharides of Microbial Origin*, https://doi.org/10.1007/978-3-030-42215-8_45.
19. R. F. BOMBALDI DE SOUZA, F. C. BOMBALDI DE SOUZA, C. BUZATTO WESTIN, R. M. BARBOSA and A. M. MORAES. Xanthan Gum for Regenerative Medicine. *Springer Nature Switzerland AG 2022. J. M. Oliveira et al. (eds.), Polysaccharides of Microbial Origin*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42215-8_59.
20. S. FARIA, C. L. DE OLIVEIRA PETKOWICZ, S. A. LEMOS DE MORAIS, M. G. HERNANDEZ TERRONES, M. M. DE RESENDE, F. P. DE FRANCA, V. L. CARDOSO. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. *Carbohydrate Polymers*. 86 (2011) 469–476. doi:10.1016/j.carbpol.2011.04.063.
21. K.Y. LEE and D. J. MOONEY. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. (2012). 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
22. M. HAMCERENCU, J. DESBRIERES, M. POPA, A. KHOUKH, G. RIESS. New unsaturated derivatives of Xanthan gum: Synthesis and characterization. *Polymer*. 48 (2007) 1921-1929. doi:10.1016/j.polymer.2007.01.048.

23. J. HUANG, J. REN, G. CHEN, Y. DENG, G. WANG and X. WU. Evaluation of the Xanthan-Based Film Incorporated with Silver Nanoparticles for Potential Application in the Nonhealing Infectious Wound. *Journal of Nanomaterials*. Volume 2017, Article ID 6802397, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2017/6802397>.
24. V. BLASQUES BUENO, R. BENTINI, L. HENRIQUE CATALANI, D. FREITAS SIQUEIRA PETRI. Synthesis and swelling behavior of xanthan-based hydrogels. *Carbohydrate Polymers*. 92 (2013) 1091–1099. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.062>.
25. W. F. DE OLIVEIRA, P. B. SALES ALBUQUERQUE, P. M. DOS SANTOS SILVA, L. C. BREITENBACH BARROSO COELHO and M. T. DOS SANTOS CORREIA. Gums. *Springer Nature Switzerland AG 2022. J. M. Oliveira et al. (eds.), Polysaccharides of Microbial Origin*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42215-8_4.
27. A. MOHSIN, W. QAMAR ZAMAN, M. GUO, W. AHMED, I. MAHMOOD KHAN, S. NIAZI, A. REHMAN, H. HANG, Y. ZHUANG. Xanthan-Curdlan nexus for synthesizing edible food packaging films. *International Journal of Biological Macromolecules*. 162 (2020) 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.008>.
28. T. GHASHGHAEI, M. REZA SOUDI, S. HOSEINKHANI. Optimization of Xanthan Gum Production from Grape Juice Concentrate Using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. *Applied food biotechnology*. 2016, 3 (1): 15-23. eISSN: 2423-4214.
29. MOSHAF. S., HAMIDI-ESFAHANI. Z., AZIZI, M.H. Statistical Optimization of Xanthan Gum Production and Influence of Airflow Rates in Lab-scale Fermentor. *Applied food biotechnology*. 2014, 1(1): 17-24.
30. M. NEJADMANSOURI, M. RAZMJOOEI, R. SAFDARIANGHOMSHEH, E. SHAD, F. DELVIGNE, M. KHALESI. Semi-continuous production of xanthan in biofilm reactor using *Xanthomonas campestris*. *Journal of Biotechnology*. 328 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.01.004>.
31. WEI XU, WEIPING JIN, LIUFENG LIN, CHUNLAN ZHANG, ZHENSHUN LI, YAN LI, RONG SONG, BIN LI. Green synthesis of xanthan conformation-based silver nanoparticles: Antibacterial and catalytic application. *Carbohydrate Polymers*. 101 (2014) 961–967. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.032>.
32. S. KARAKUS, E. TAN, M. ILGAR, Y. MÜGE SAHIN, D. S. MANSUROGLU, D. ISMIK, R. ALI SOMROO, A. KILISLIOGLU. Swelling behaviour, rheological property and drug release profile of the anti-inflammatory drug metamizole sodium from xanthan gum–ZnO nanoparticles. *Polymer Bulletin*. 2022. 79:357–380 <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03509-5>.
33. M. MOSCOVICI and C. BALAS. Bacterial Polysaccharides Versatile Medical Uses. *Springer Nature Switzerland AG 2022. J. M. Oliveira et al. (eds.), Polysaccharides of Microbial Origin*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42215-8_48.

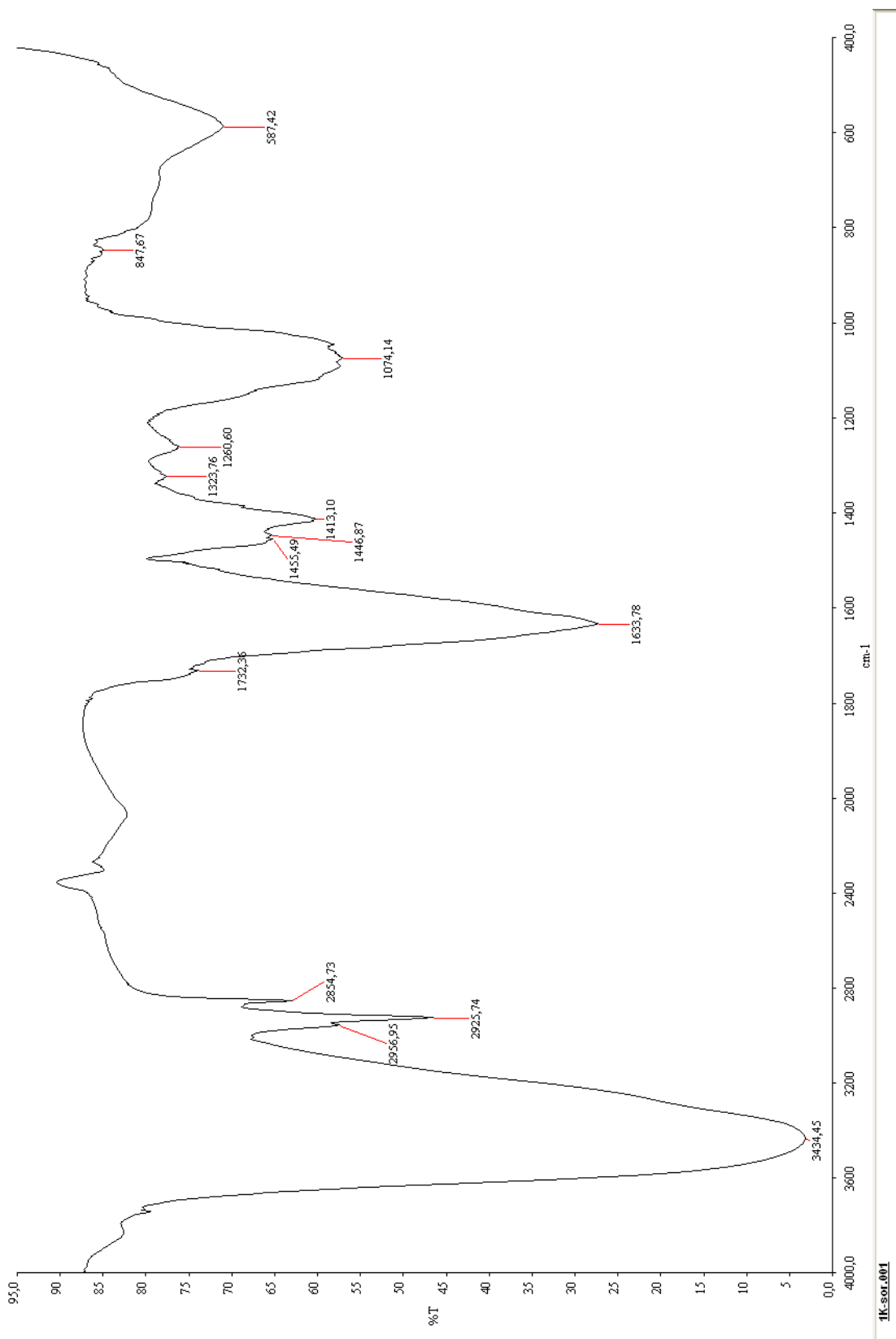
34. OBEROI, K.; TOLUN, A.; ALTINTAS, Z.; SHARMA, S. Effect of Alginate-Microencapsulated Hydrogels on the Survival of *Lactobacillus rhamnosus* under Simulated Gastrointestinal Conditions. *Foods*. 2021, 10, 1999. <https://doi.org/10.3390/foods10091999>.
35. G. AGRAWAL and A. KUMAR. Polysaccharides-Based Biomaterials for Surgical Applications. *Springer Nature Switzerland AG 2022. J. M. Oliveira et al. (eds.), Polysaccharides of Microbial Origin*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42215-8_51.
36. G. DECANTE, J. MIGUEL OLIVEIRA, R. L. REIS and J. SILVA-CORREIA. Injectable Polymeric System Based on Polysaccharides for Therapy. *Springer Nature Switzerland AG 2022. J. M. Oliveira et al. (eds.), Polysaccharides of Microbial Origin*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42215-8_55.
37. M. KANLAYAVATTANAKUL and N. LOURITH. Natural Polysaccharides for Skin Care. *Springer Nature Switzerland AG 2022. J. M. Oliveira et al. (eds.), Polysaccharides of Microbial Origin*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42215-8_46.
38. A. E. CHALYKH, V. V. MATVEEV, D. A. MURAVLEV, D. YU. MITYUK, AND O. E. PHILIPPOVA. Nanostructure of Xanthan Networks. (2017) *Nanotechnologies in Russia*. 2017, Vol. 12, Nos. 1–2, pp. 1–8. Pleiades Publishing, Ltd., 2017 ISSN 1995-0780.
39. SHANG-TIAN YANG, YANG-MING LO, DAVID B. MIN. Xanthan Gum Fermentation by *Xanthomonas campestris* Immobilized in a Novel Centrifugal Fibrous-Bed Bioreactor. *Biotechnol Progress*. (1996). 12: 630-637. <https://doi-org.ezproxy.ktu.edu/10.1021/bp9600501>.
40. B. Ž. BAJIĆ, Z. Z. RONČEVIĆ, S. N. DODIĆ, J. A. GRAHOVAC and J. M. DODIĆ. Glycerol as a carbon source for xantan production by *Xanthomonas campestris* isolates. *APTEFF*. 46, 1-269 (2015) UDC: 577.114:547.426.1:546.26 DOI: 10.2298/APT1546197B.
41. A. GUPTA DUREJA, K. DHIMAN. Free radical scavenging potential and total phenolic and flavonoid content of *Ziziphus mauritiana* and *Ziziphus nummularia* fruit extracts. *International Journal of Green Pharmacy*. July 2012. 6(3):187 DOI:10.4103/0973-8258.104929.
42. C. PROESTOS, M. KOMAITIS. Antioxidant Capacity of Hops. *Beer in Health and Disease Prevention*. 2009, Pages 467-474. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00045-6>.

Informacijos šaltinių sąrašas

9. BRENDA - Ligand view of Xanthan (7345 -) (brenda-enzymes.org). Žiūrėta 2022-02-06.
26. MetaCyc xanthan biosynthesis (biocyc.org). Žiūrėta 2022-02-06.

Priedai

1 Priedas. Ksantano, susintetinto panaudojant sorbitolį kaip anglies mitybinį šaltinį, FTIR spektras



2 Priedas. Ksantano, susintetinto panaudojant kokosų palmių žiedų cukrų kaip anglies mitybinį šaltinį, FTIR spektras

