



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Anglies šaltinių įtaka ksantano gamybai iš *Xanthomonas campestris* ir savybių tyrimai

Baigiamasis magistro projektas

Monika Vaškevičiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2024



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Anglies šaltinių įtaka ksantano gamybai iš *Xanthomonas campestris* ir savybių tyrimai

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Monika Vaškevičiūtė
Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė
Vadovė

Doc. dr. Birutė Grybaitė
Recenzentas

Kaunas, 2024



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Monika Vaškevičiūtė

Anglies šaltinių įtaka ksantano gamybai iš *Xanthomonas campestris* ir savybių tyrimai

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Monikos Vaškevičiūtės, baigiamasis projektas tema „Anglies šaltinių įtaka ksantano gamybai iš *Xanthomonas campestris* ir savybių tyrimai“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

Monika Vaškevičiūtė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Kaunas, 2024

Vaškevičiūtė, Monika. Anglies šaltinių įtaka ksantano gamybai iš *Xanthomonas campestris* ir savybių tyrimai. 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: *Xanthomonas campestris*, anglies šaltiniai, fermentacija, redukcinės savybės, ksantano panaudojimas.

Kaunas, 2024. 61 p.

Santrauka

Darbas skirtas ksantano gamybos proceso ekonomiškumui ir ekologiškumui didinti ištiriant skirtingus anglies šaltinius ir įvertinant gauto ksantano savybes. Šiame darbe buvo tiriama 20 skirtingų anglies šaltinių, kurie galėtų būti pritaikomi ksantano gamyboje iš *Xanthomonas campestris* bakterijų, kaip pigesnė alternatyva. 13 iš šių šaltinių yra laikomi alternatyviais, nes gaunami kaip antrinė žaliava. Proceso našumas bei anglies šaltinių tinkamumas *Xanthomonas campestris* bakterijoms buvo vertinamas nustatant išskirto ksantano ir biomasės koncentracijas po 24 val, 48 val ir 72 val fermentacijos. Taip pat viso proceso metu fermentacijos proceso įvertinimui buvo matuojama šviesos sugertis 600 nm bangos ilgyje pradiniu laiko momentu bei po 24 val, 48 val ir 72 val fermentacijos. Pagal gautas ksantano koncentracijas didžiausios išeigos buvo pasiektos terpėse su ksiloze po 24 val (27,20 g/l), su kokosų palmių žiedų cukrumi po 48 val (26,37 g/l), avokadų žievelių hidrolizatu po 24 val (26,11 g/l) fermentacijos.

Gautas ksantanas, panaudojant skirtingus anglies šaltinius, buvo naudojamas savybių tyrimams. Jų metu buvo nustatomos ksantano redukcinės savybės. Įprastai komercinis ksantanas nėra laikomas geru antioksidantu. Po atliktų 2 skirtingų, metodinių redukcinių savybių nustatymo, tyrimų, buvo nustatyta, jog ksantanas gautas iš terpės su kokosų palmių žiedų cukrumi turi ne tik didelę išeigą, bet ir didžiausias redukcines savybes. Kokybės nustatymui buvo atlikta FT-IR spektroskopija atrinktų mėginių palyginimui su komerciniu ksantanu.

Ksantano panaudojimo tyrimų metu buvo nustatoma ksantano geba kombinacijoje su želatina suformuoti hidrogelius, kuriuos išdžiovinus būtų gaunama skaidri plėvelė. Bei siekiama pritaikyti ksantaną kaip agaro pakaitalą mitybinių terpių gamybai. Ant šių terpių dauginamos brokolių sėklos sudygo ir pasižymėjo vešliais bei dideliais lapais.

Taigi, ksantano gamybai iš *Xanthomonas campestris* bakterijų rekomenduojama naudoti kokosų palmių žiedų cukraus anglies šaltinį ir fermentaciją vykdyti 48 val, palaikant 37 °C temperatūrą. Panaudojimo tyrimuose gauti sėkmingi rezultatai yra stiprus pagrindas tolimesniam ksantano mėginių vertinimui. Želatinos ir ksantano sudaryti hidrogeliai gali būti bandomi pritaikyti 3D biospausdinimui, o ksantano kaip agaro pakaitalo tyrimuose gali būti iširtas didesnis kiekis ksantano mėginių.

Vaškevičiūtė, Monika. Influence of Carbon Sources on Xanthan Production by *Xanthomonas Campestris* and Characterization Studies. Master's Final Degree Project / supervisor Assoc. Prof. dr. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: *Xanthomonas campestris*, carbon source, fermentation, reducing properties, xanthan application.

Kaunas, 2024. 61.

Summary

The study is aimed at increasing the cost-effectiveness and environmental friendliness of the xanthan production process by studying different carbon sources and evaluating the properties of the obtained xanthan. This work examined 20 different carbon sources that could be applied in the production of xanthan from *Xanthomonas campestris* bacteria as a cheaper alternative. 13 of these sources are considered alternative because they are obtained as by-products. The efficiency of the process and the suitability of carbon sources for *Xanthomonas campestris* bacteria were evaluated by determining the concentrations of extracted xanthan and biomass after 24 h, 48 h and 72 h of fermentation. Also, during the entire process, light absorption at 600 nm wavelength was measured at the initial time point and after 24 h, 48 h and 72 h of fermentation to evaluate the fermentation process. According to the obtained xanthan concentrations, the highest yields were achieved in media with xylose after 24 h (27.20 g/L), with coconut palm flower sugar after 48 h (26.37 g/L), hydrolysate of avocado peels after 24 h (26.11 g/L) of fermentation.

Extracted xanthan using different carbon sources was used for property research. During the studies, the reducing properties of xanthan were determined. Generally, commercial xanthan is not considered as a good antioxidant. After 2 different methodical research for the determination of reducing properties, it was found that xanthan obtained from a medium with sugar from coconut palm blossoms has not only a high yield, but also the highest reducing properties. For quality determination, FT-IR spectroscopy was done to compare selected samples with commercial xanthan.

During the studies on the use of xanthan, the ability of xanthan in combination with gelatine to form hydrogels was determined, which would produce a transparent film after drying. Also, xanthan was evaluated as a replacement for agar in the production of nutritional media. Broccoli seeds have sprouted on these media and showed positive characteristics: lush and large leaves.

Thus, to produce xanthan from *Xanthomonas campestris* bacteria, it is recommended to use the sugar carbon source of coconut palm blossoms and carry out the fermentation for 48 hours, maintaining the temperature at 37 °C. The successful results obtained in the use of xanthan studies provide a strong basis for further research on xanthan samples. Gelatine-xanthan hydrogels can be tested for 3D bioprinting, and studies of xanthan as an agar substitute can test larger amounts of xanthan samples.

Turinys

Lentelių sąrašas.....	8
Paveikslų sąrašas	9
Santrumpų ir terminų sąrašas.....	11
Įvadas.....	12
1. Literatūros apžvalga.....	13
1.1. Ksantano charakteristika.....	13
1.1.1. Ksantano struktūra	13
1.1.2. Ksantano cheminės ir fizikinės savybės	13
1.1.3. Toksiškumas	14
1.2. <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų charakteristika	14
1.3. Ksantano biosintezė	15
1.4. Biotechnologinio ksantano gamyba.....	16
1.5. Veiksniai lemiantys biotechnologinę ksantano gamybą.....	17
1.5.1. Anglies šaltiniai	17
1.5.2. Azoto šaltiniai.....	18
1.5.3. Temperatūros poveikis	18
1.5.4. pH poveikis.....	19
1.5.5. Deguonies pernaša	19
1.5.6. Fermentacijos trukmė ir veikimo principas	19
1.6. Atliktų ksantano gamybos optimizavimo tyrimų apžvalga	19
1.6.1. Atliekos kaip anglies šaltinis ksantano gamyboje	19
1.6.2. Procesų ir įrangos optimizavimas ksantano gamyboje.....	20
1.7. Ksantano panaudojimas	21
1.7.1. Ksantano pritaikymas farmacijoje ir medicinoje.....	21
1.7.2. Ksantano pritaikymas maisto pramonėje.....	22
1.7.3. Ksantano pritaikymas naftos pramonėje.....	23
1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	23
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	24
2.1. Tyrimo eiga.....	24
2.2. Mitybinės terpės	25
2.3. Tyrimų metu naudota įranga.....	28
2.4. Tyrimų metodai	29
2.4.1. Dehidratuotų <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų ampulėse paruošimas	29
2.4.2. <i>Xanthomonas campestris</i> inokulianto paruošimas	30
2.4.3. Atsinaujinančių šaltinių, celiuliozės pavertimas į redukuojančius cukrus	30
2.4.4. Fermentacinės terpės ruošimas	30
2.4.5. Fermentacija	31
2.4.6. Biomės išskyrimas iš fermentuojamos terpės	31
2.4.7. Ksantano išskyrimas iš fermentuojamos terpės.....	31
2.4.8. Ksantano redukcinių savybių nustatymas.....	31
2.4.9. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą	32
2.4.10. Ksantanas/želatina hidrogelio ruošimas	32
2.4.11. Ksantano kaip agaro pakaitalo įvertinimas brokolių sėkloms daiginti.....	32

2.4.12.	Chlorofilo A ir B bei karotinoidų koncentracijos nustatymas brokoliuose	33
3.	Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	34
3.1.	Fermentacijos proceso įvertinimas	34
3.2.	Ksantano koncentracijos įvertinimas	37
3.3.	Biomosės koncentracijos įvertinimas	40
3.4.	Redukcinių savybių įvertinimas	42
3.4.1.	Ksantano redukcinių savybių įvertinimas.....	42
3.4.2.	Redukcinių savybių įvertinimas FRAP metodu	43
3.5.	Ksantano kokybės vertinimas	45
3.6.	Ksantano panaudojimas	47
3.6.1.	Ksantano ir želatinos hidrogelio plėvelės susidarymas	47
3.6.2.	Ksantano kaip agaro pakaitalo įvertinimas brokolių sėkloms daiginti.....	49
3.6.3.	Chlorofilo A ir B bei karotinoidų koncentracijos nustatymas brokoliuose	50
4.	Rekomendacijų dalis	52
	Išvados	55
	Literatūros sąrašas	56

Lentelių sąrašas

2.1 lentelė. LB terpės sudėtis	25
2.2 lentelė. YPD terpės sudėtis	26
4.1 lentelė. Ksantano gamybos aparatūrinės schemos žymėjimų reikšmės	54

Paveikslų sąrašas

1.1 pav. Ksantano struktūra [5]	13
1.2 pav. <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų mikroskopinis vaizdas.....	15
1.3 pav. Ksantano biosintezė. ManC – GDF manozės pirofosforilazė; Ugd: UDF gliukozės dehidrogenazė; 1,2,3,4,5: glikoziltransferazės.	16
1.4 pav. Biotechnologinio ksantano gamybos schema.....	17
1.5 pav. Ksantano panaudojimo potencialios sritys sveikatos sistemoje	22
2.1 pav. Tyrimų eiga	24
2.2 pav. Dehidratuotų <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų paruošimo schema	30
3.1 pav. <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų augimo įvertinimas terpėse su sacharozės, gliukozės, fruktozės, laktozės ir galaktozės anglies šaltiniais	34
3.2 pav. <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų augimo įvertinimas terpėse su arabinozės, celiuliozės, ksilozės, ksilitolio ir eritritolio anglies šaltiniais	35
3.3 pav. <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų augimo įvertinimas terpėse su cukranendrių ir kokosų palmių žiedų, D-manitolio, D-sorbitolio anglies šaltiniais	36
3.4 pav. <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų augimo įvertinimas terpėse su apelsinų, mandarinų, citrinų, avokadų, melionų ir obuolių žievių hidrolatų anglies šaltiniais.	37
3.5 pav. Ksantano koncentracija (g/l) po 24 val, 48 val ir 72 val gliukozės, sacharozės, fruktozės, laktozės, galaktozės, arabinozės ir ksilozės terpėse.....	38
3.6 pav. Ksantano koncentracija (g/l) po 24 val, 48 val ir 72 val cukranendrių cukraus, kokosų palmių žiedų cukraus, D-manitolio, D-sorbitolio, apelsinų, mandarinų, citrinų, avokadų, melionų, obuolių žievių hidrolizatų, eritritolio bei ksilitolio terpėse.....	39
3.7 pav. Biomasės koncentracija (g/l) 24 val, 48 val ir 72 val laiko momentais gliukozės, sacharozės, fruktozės, laktozės, galaktozės, arabinozės ir ksilozės terpėse.....	40
3.8 pav. Biomasės koncentracija (g/l) po 24 val, 48 val ir 72 val fermentacijos cukranendrių cukraus, kokosų palmių žiedų cukraus, D-manitolio, D-sorbitolio, apelsinų, mandarinų, citrinų, avokadų, melionų, obuolių žievių hidrolizatų, eritritolio bei ksilitolio terpėse	41
3.9 pav. Ksantano, išskirto pritaikant skirtingus anglies šaltinius terpėse ir komercinio ksantano redukcinės savybės 700 nm bangos ilgyje.....	42
3.10 pav. Kalibracinė kreivė su skirtingais $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ kiekiais redukcinėms savybėms nustatyti FRAP metodu	44
3.11 pav. Ksantano, išskirto pritaikant skirtingus anglies šaltinius ir komercinio ksantano redukcinės savybės pagal Fe^{2+} koncentraciją.....	44

3.12 pav. Komerčinio ksantano FTIR spektras	45
3.13 pav. Ksantano, gauto naudojant gliukozę kaip anglies šaltinį, FT-IR spektras	46
3.14 pav. Ksantano, gauto naudojant kokosų palmių žiedų cukrų kaip anglies šaltinį, FT-IR spektras..	46
3.15 pav. Ksantano, gauto naudojant D-sorbitolį kaip anglies šaltinį, FT-IR spektras.....	46
3.16 pav. Ksantano, gauto naudojant avokadų žievelių hidrolizatą kaip anglies šaltinį, FT-IR spektras	47
3.17 pav. Kontrolinis hidrogelio plėvelės mėginys – želatina 1,25 g ir komercinis ksantanas 0,6 g	48
3.18 pav. Hidrogelio plėvelės mėginys – želatina 1,25 g ir ksantanas 0,6 g, išskirtas iš gliukozės terpės	48
3.19 pav. Hidrogelio plėvelės mėginys – želatina 1,25 g ir ksantanas 0,6 g, išskirtas iš avokadų žievelių hidrolizatų terpės	48
3.20 pav. MS ir 1% ksantano terpė su pasodintomis brokolių sėklomis.....	49
3.21 pav. MS ir 1% agarų terpė su pasodintomis brokolių sėklomis	49
3.22 pav. MS ir 1% ksantano terpė su sudygusiomis brokolių sėklomis	50
3.23 pav. MS ir 1% agarų terpė su sudygusiomis brokolių sėklomis	50
4.1 pav. Ksantano gamybos aparatūrinė schema	53

Santrumpų ir terminų sąrašas

JECFA - (angl. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) Jungtinis FAO/PSO maisto priedų ekspertų komitetas;

EFSA - (angl. *European Food Safety Authority*) Europos maisto saugos tarnyba;

E451 – Ksantanas;

PES – polietilenas;

SSS - nerūdijantis plienas;

LB - Luria-Bertani;

YPD - (angl. *Yeast Extract Peptone Dextrose*) mielių ekstraktas, peptonas, dekstrozė;

TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazinas;

FRAP - (angl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) Fluorescencijos atkūrimas po fotobalinimo;

MS - Murashige – Skoog;

FT-IR - (angl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*) Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija.

Įvadas

Ksantanas yra unikalus polisacharidas, kuris buvo atrastas dar XX a. septintajame dešimtmetyje. Dėl savo savybių ir plataus panaudojimo galimybių jis buvo pradėtas gaminti ir pramoniniu mastu. Šiuo metu daugelyje įmonių ksantanas gaminamas komerciškai fermentacijos būdu iš *Xanthomonas campestris* bakterijų. Dėl sulaukiamo vis didesnio susidomėjimo yra prognozuojama, jog ksantano poreikis su kiekvienais metais vis didės, o tai lems poreikį proceso našumui ir ekonomiškumui didinti [1].

Pramoninis ksantano gamybos procesas apima *Xanthomonas campestris* bakterijų fermentavimą terpėje, kurioje turi būti būtinųjų maistinių medžiagų. Reikalingiausios maistinės medžiagos yra anglis, azotas ir mineralai, įskaitant fosforą, kalcį, magnį kalį, geležį bei kai kurios aminorūgštys. Dažnai gamyboje yra naudojamos sintetinės terpės, kuriose anglies šaltiniais yra naudojami gliukozė ir sacharozė, sudarantys 20–30 % visų gamybos sąnaudų. Dėl šios priežasties daugelis mokslininkų siekia rasti alternatyvius substratus taikant nemodifikuotas, modifikuotas žaliavas bei atliekas [2].

Atliekos kaip substratas ksantano gamybos procese yra svarbios ne tik ekonominiu, bet ir ekologiniu požiūriu. Ši panaudojimo galimybė skatintų atliekų valorizaciją arba perdirbimą ir vertingo produkto gamybą. Toks atliekų naudojimas atitinka tvarumo principus, todėl būtų sumažintas poveikis aplinkai dėl atliekų tvarkymo ir leistų išsaugoti natūralius resursus [3].

Optimizuojant gamybos procesus, vienas iš svarbiausių rodiklių yra gauti kokybišką produktą. Keičiant gamyboje įprastus substratus, išskyrimo metodus, turi būti gaunamas tokios pačios kokybinės vertės arba net geresnės kokybinės vertės produktas. Ksantano gamyboje siekiant sukurti didesnę pridėtinę vertę produktui yra ištiriamos jo antioksidacinės savybės. Didesnėmis redukcinėmis savybėmis pasižymintis ksantanas yra plačiai panaudojamas maisto ir farmacijos srityse, kaip priemonė, neleidžianti atsirasti oksidaciniam stresui ir laisviesiems radikalams. Dėl šios priežasties ksantanas tampa vertingesnis ir paklausesnis rinkoje [2].

Ksantanas yra naudojamas kaip stabilizatorius, emulsiklis ar tirštiklis. Šios savybės plačiai pritaikomos maisto, farmacijos ir kosmetikos pramonėje, todėl ksantanas įeina į dantų pastos, gyvulių pašarų ar kepinių sudėtį. Taip pat šio produkto poreikis yra kitose pramonės srityse, dėl jo panaudojimo vandens pagrindo dažuose, klijuose, tekstilės pramonėje bei naftos pramonėje.

Darbo tikslas – ištirti ir nustatyti optimalias sąlygas ksantanui pagaminti iš *Xanthomonas campestris* bakterijų.

Darbo uždaviniai:

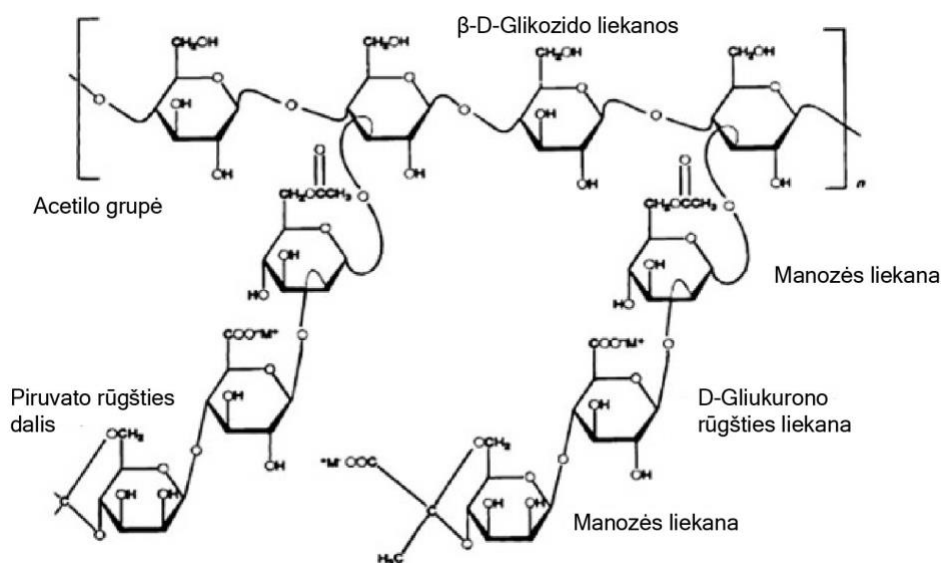
- įvertinti *Xanthomonas campestris* bakterijų augimą, įvairiose maitinamosiose terpėse, nustatant išsiskyrusio ksantano ir biomasės koncentracijas bei išmatuojant šviesos sugertį skirtingais augimo etapais.
- išsiaiškinti anglies, atsinaujinančių anglies šaltinių įtaką ksantanui gauti;
- optimizuoti ksantano išskyrimą;
- ištirti ksantano antioksidacines savybes;
- apibūdinti ksantano panaudojimo galimybes.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Ksantano charakteristika

1.1.1. Ksantano struktūra

Ksantanas yra heteropolisacharidas, dar vadinamas mikrobiniu egzopolisacharidu [4]. Pagrindinė cheminė struktūra yra linijinė, o kiekviename kartotiniame struktūriniame viename yra penkios cukraus liekanos: dvi β -D-glikozido, dvi D-manozės ir viena D-gliukurono. Ši struktūra skiriasi nuo celiuliozės dėl esančių trisacharido grandinių. Glikozido liekanų O3 padėtyje yra trisacharido šoninė grandinė, sudaryta iš D-gliukurono rūgšties likučio ir dviejų D-manozės liekanų [1]. Maždaug pusė galinių D-manozės liekanų turi piruvo rūgšties dalį. Ši dalis nulemia ksantano klampumą ir terminį stabilumą. Taip pat kai kurios D-manozės liekanos turi acetilo grupes. Gliukurono rūgšties likučiai paprastai susidaro kaip mišrios kalcio, natrio ir kalio druskos. Tačiau dėl skirtingų *X.campestris* kamienų ksantano struktūra taip pat gali atitinkamai skirtis [5].



1.1 pav. Ksantano struktūra [5]

1.1.2. Ksantano cheminės ir fizikinės savybės

Ksantanas yra baltos / kreminės spalvos birūs milteliai [1], kurie pasižymi šiomis savybėmis:

- dideliu tirpumu – gerai tirpsta šaltame ir karštame vandenyje, tačiau praktiškai netirpus organiniuose tirpikliuose. Geriausiai ksantanas tirpsta 25 % fosforo rūgštyje ir po to atitinkamai mažėjimo tvarka acto rūgštyje, sieros rūgštyje, azoto rūgštyje ir natrio hidrokside. Tačiau ši savybė skiriasi priklausomai ir nuo galutinės produkto paskirties [6].
- didelė klampa – ji priklauso nuo temperatūros, biopolimero koncentracijos, druskų kiekio bei pH. Ksantanas yra labai klampus net ir esant mažoms koncentracijoms. Turėdamas tik 1% koncentraciją jis vis tiek atrodo beveik kaip gelis, tačiau yra lengvai maišomas.
- emulsuojančiomis savybėmis – ksantanas pasižymi gebėjimu emulsinti, suspenduoti ir stabilizuoti. Jis yra derinamas su tirštikliais: celiuliozės junginiais, krakmolu, pektinu, dekstrinu,

alginatu ir želatina. Ksantanas deriniuose su šiais tirštikliais geriau veikia po modifikavimo fermentiniu apdorojimu, kai pašalinami galaktozės likučiai.

- mažu kaloringumu – ksantanas kaip ir kitos gumos, yra nevirškinamas žmogaus žarnyne, todėl lengvai praeina visą virškinamąjį traktą ir turi mažiau kalorijų.
- pseudoplastiškumu – tirpaluose ksantanas turi pseudoplastiko prigimtį. Tai reiškia, jog klampumas atvirkščiai keičiasi priklausomai nuo šlyties greičio ksantano tirpale. Ši savybė gali pagerinti maisto produktų juslines savybes (pojūtį burnoje, skonio išsiskyrimą).
- dideliu atsparumu terpės pH – ksantanas turi didelę toleranciją kitimams pH intervale nuo 2 iki 12, kuri leidžia jį panaudoti maisto gamyboje. Išskirtinis pastovumas dažniausiai pastebimas per ilgą laiką esant žemam pH. Ši savybė dažnai aktuali gaminant valiklius ir rūgščius maisto produktus.
- termostabilumu – ksantanas ne tik tolerantiškas pH pokyčiams, bet ir pasižymi dideliu atsparumu temperatūros pokyčiams, net esant druskoms ir rūgštims. Dėl šios savybės jis pasižymi puikiu atsparumu užšaldant ir atšildant, klampumas stabilus iki 100 °C temperatūros. Svarbu, jog net ir po terminio apdorojimo klampumas išlieka ir atšildžius. Ksantane esančio piruvato kiekis stipriai nulemia šią savybę [6].

Reakcijos su cheminėmis medžiagomis.

Stiprūs oksidatoriai (perisulfatai, peroksidai ir hipochloritai) suardo ksantaną. Redukuojantys agentai paprastai neturi įtakos jo stabilumui. Metanolis, etanolis, izopropanolis ir acetonas neturi įtakos ksantano vandeniniams tirpalams iki atitinkamos koncentracijos, kurią pasiekus ksantanas yra nusodinamas. Ksantanas sąveikauja su nejoninėmis paviršiaus aktyvumo medžiagomis iki 20 % koncentracijos. Anijoninėms ir amfoterinėms paviršiaus aktyvumo medžiagoms yra būdinga nusodinti ksantaną esant 15 % koncentracijai. Tačiau tai priklauso nuo esamų bazių, rūgščių ir druskų. Dauguma komercinių fermentų negali suardyti ksantano.

1.1.3. Toksiškumas

Toksikologiniai ksantano tinkamumo naudoti tyrimai rodo, jog jis yra saugus. Jis yra leidžiamas naudoti kaip maisto priedas Europos Sąjungoje. Jungtinis FAO/PSO ekspertų komitetas (JECFA) neapibrėžė leidžiamos paros normos, todėl ji yra nenormuojama. Paskutinį kartą pakartotinai ksantanas (E451) buvo vertinamas 2017 metais. Jis buvo vertinamas EFSA maisto priedų ir į maistą dedamų maistinių medžiagų specialistų grupės. Šis tyrimas buvo atliekamas siekiant įvertinti ksantano saugą, kai jis naudojamas kaip maisto priedas maisto produktuose jaunesniems nei 16 savaičių kūdikiams [7].

1.2. *Xanthomonas campestris* bakterijų charakteristika

Xanthomonas campestris yra gram-neigiamos, trumpos, lazdelės formos bakterijos, priskiriamos *Pseudomonadaceae* šeimai. Jos gali būti 0,4–0,7 μm pločio ir 0,7–1,8 μm ilgio [8]. Šių bakterijų fitopatogenų gentis turi vieną poliarinį žiuželį, kuris yra esminis šių bakterijų judrumui, o atsižvelgiant į jų genomines DNR homologijas gentis buvo suskirstyta į 20 rūšių [8]. Pirmą kartą ši bakterija buvo išskirta iš vienmetės miglės (lot. *Poa annua*) Japonijoje.



1.2 pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų mikroskopinis vaizdas

Ši bakterija yra žinoma kaip Kryžmažiedžių šeimos augalų patogenas, pažeidžiantis kopūstų šeimos augalus visame pasaulyje. Šie organizmai paprastai randami ant kopūstų šeimos augalų lapų. *Xanthomonas campestris* fermentinėmis reakcijomis, sienelės paviršiuje, gamina polisacharidą ksantaną [8].

Pramoninę ksantano gamybą vykdo ir kitos *Xanthomonas* spp. tokios kaip: *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. citri*, *X. fragaria*, *X. gummisudans*, *X. juglandis*, *X. phaseoli*, *X. Vascularium*. Tačiau dažniausiai naudojamos yra *Xanthomonas campestris* bakterijos ksantano gamyboje dėl savo gebėjimo augti aerobinėje aplinkoje tiek kompleksinėje, tiek visiškai nustatytoje terpėje [10]. Efektyviai ksantano gamybai šioms bakterijoms yra svarbu gauti mikroelementų (kalio, geležies, kalcio druskos) ir makroelementų (tokiu kaip anglis ir azotas).

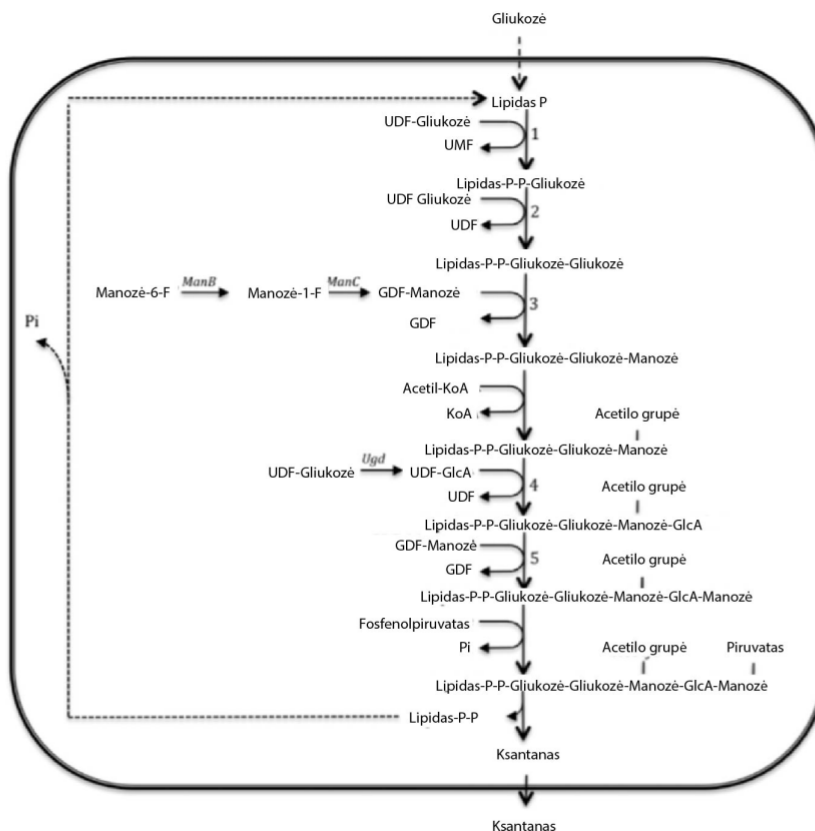
1.3. Ksantano biosintezė

Bet kurių gramneigiamų bakterijų vykdoma egzopolisacharidų sintezė iš esmės yra labai panaši į ksantano sintezę vykdomą *Xanthomonas campestris* bakterijų [8]. Sintetinis būdas vyksta nurodyta eiga: paprastųjų cukrų panaudojimas, jų pavertimas į nukleotidų darinius, monosacharido subvienetų asimiliacija, surinkimas pentasacharido subvienetų, prijungtų prie izopentilo pirofosfato nešiklio bei pentasacharido pasikartojančių vienetų ir jų sekrecijos polimerizacija.

Ksantanas susiformuoja nuosekliai pridėdamas D-gliukozės-fosfato ir D-gliukozės iš 2 molių uridino difosfato gliukozės (UPD-D-gliukozė). Po šio proceso pridėdama D-manozės ir D-gliukurono rūgšties likučių iš guanozindifosfatomanozės (GDP-manozė) ir uridino difosfato gliukurono rūgšties (UPD-gliukurono rūgšties). Dėl o-acetilo grupės ir acetil-koA yra perkeltami į vidinės manozės liekaną ir piruvatas, fosfenolpiruvatu yra perkeltas į galutinę manozę [2]. Kiekviename iš šių paminėtų etapų yra reikalingi atitinkami substratai ir fermentai, o jų nebuvimas gali slopinti sintetinį būdą [8].

Ksantano biosintezėje dalyvauja ir genų produktai, kurie yra koduojami 12 kb genų klasteryje, vadinamam gumų klasteriu (GumB – GumM) [11]. Baltymai, dalyvaujantys biosintezėje, yra randami citozolinėje erdvėje, taip pat vidinėje ir išorinėje membranose. Pasikartojančių vienetų biosintezę vykdo glikoziltransferazės, GumD, GumM, kurios yra susijusios su membrana arba citozilinės, nes kaip substratą naudoja prie membranos pritvirtintą C55 lipidų nešiklį. Flipazė GumJ ir polimerazė GumE, poras formuojantys baltymai GumB ir GumC taip pat yra bakterijų membranų dalis. Tačiau šių baltymų

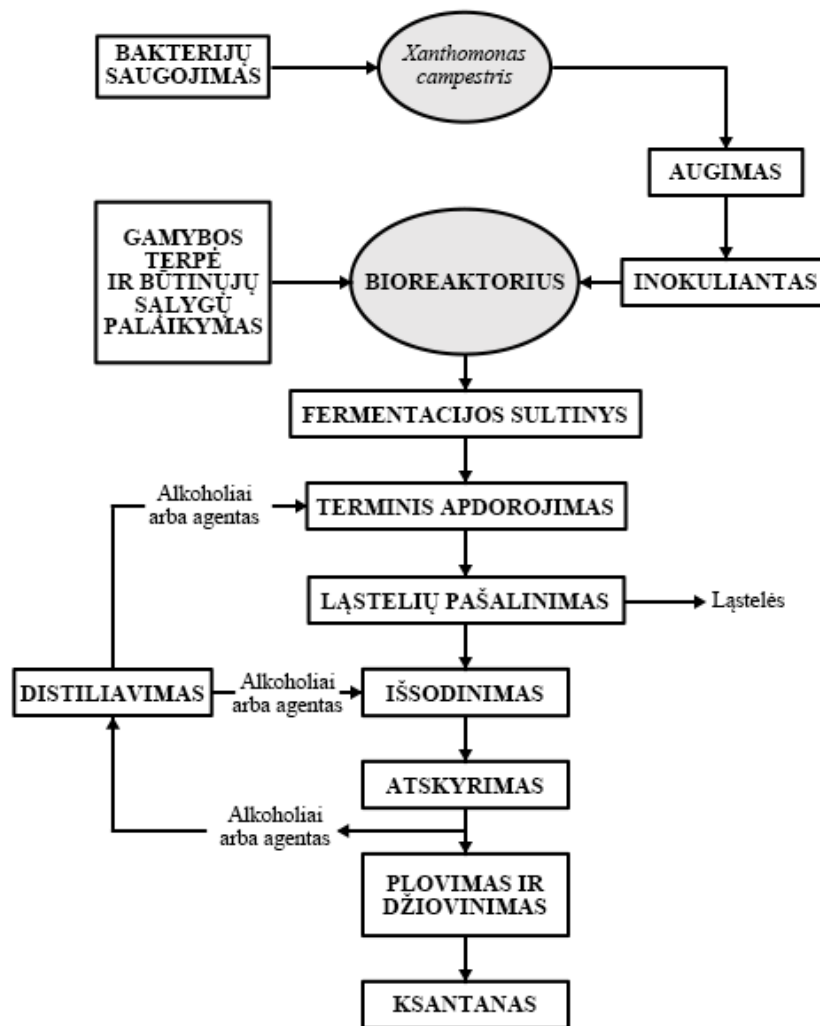
analizė vieno eksperimento sąlygomis yra sudėtinga, jeigu nėra išskiriamos skirtingos ląstelių frakcijos [12].



1.3 pav. Ksantano biosintezė. ManC – GDF manozės pirofosforilazė; Ugd: UDF gliukozės dehidrogenazė; 1,2,3,4,5: glikoziltransferazės.

1.4. Biotechnologinio ksantano gamyba

Ksantano biotechnologinis gamybos procesas yra pateiktas 1.4 paveiksle. Pirmiausia, pasirinktas mikroorganizmų kamienas, šiuo atveju *Xanthomonas campestris*, yra paruošiamas ilgalaikiam saugojimui pagal pateiktus saugumo reikalavimus. Šis etapas yra labai svarbus siekiant išlaikyti bakterijų gyvybingumą ir efektyvumą proceso metu. Nedidelis saugojamos kultūros kiekis yra padauginamas ant kietos arba skystos terpės, siekiant gauti inokuliantą bioreaktoriui [13]. Mikroorganizmo augimą ir ksantano gamybą lemia daugelis veiksnių, tokių kaip bioreaktoriaus tipas, terpės sudėtis, auginimo sąlygos. Pramoninę ksantano gamybą apima fermentacija, terminis apdorojimas, ląstelių pašalinimas, regeneravimas alkoholiu, išskyrimo ir gryninimo procesai, kurie atsispindi 1.4 paveiksle [14].



1.4 pav. Biotechnologinio ksantano gamybos schema

1.5. Veiksniai lemiantys biotechnologinę ksantano gamybą

Kaip ir minima ankstesniuose skyriuose, ksantanas yra gaminamas iš *Xanthomonas campestris* bakterijų. Didelės gamybos apimtys yra lemiamos šio mikroorganizmo kamieno, nes skirtingi kamienai yra linkę sunaudoti skirtingus substrato kiekius ksantano gamybos proceso metu. Taip pat jo metu kaip reikalingiausios yra išskiriamos šios maistinės medžiagos: anglis, azotas, mineralai (fosforas, kalcis, magnis, kalis, geležis bei kai kurios aminorūgštys) [8].

1.5.1. Anglies šaltiniai

Vienas svarbesnių veiksnių yra anglies šaltinio pasirinkimas, nes tai sudaro didelę dalį gamybos kaštų. Dažnai ksantano gamybai yra naudojami, kaip substratas, gliukozė, sacharozė, laktozė ir krakmolai. Optimali anglies koncentracija komercinėje gamyboje turėtų būti apie 2-4 %, o aukštesnės arba žemesnės anglies šaltinio koncentracijos slopina bakterijų augimą [15]. Kiti komercijoje galimi naudojimui substratai: ksilozė, galaktozė ir laktozė, tačiau jų panaudojimas yra apribotas bakterijų savybių. Kadangi *X. campestris* bakterijos neturi fermento β -galaktozidazės, kuri fermentuoja laktozė, todėl ksantano išskiriami kiekiai naudojant laktozė turinčius substratus yra žymiai mažesni [16]. Didžiausias našumas

komercinėje gamyboje kol kas yra pasiekiamas naudojant gliukozę, kuri yra vienas iš brangiausių substratų.

Tačiau naujausi tyrimai siekia rasti alternatyvius substratus. Tam galima rasti substratų agrarinės pramonės atliekose, kurios mažai kainuoja, bet yra neišvengiamas žmogaus veiklos padarinys. Joms priskiriamos žemės ūkio, augalinės kilmės atliekos, pramoninės gamybos bei komunalinės atliekos. Jos gali būti tiek kietos, tiek skystos bei šalinamos gyvenamųjų kvartalų, smulkių pramonės šakų bei kitų verslo vietų. Bendrai atliekos gali būti skirstomos pagal jų tūrį ir fizines savybes, organinę sudėtį bei specifinių teršalų kiekius [16]. Agro-industrinėse atliekose pagrindiniai komponentai yra celiuliozė ir hemiceliuliozė. Jie yra sudėtingieji angliavandeniai, kurie hidrolizuojami, fermentų, rūgščių ir kitų cheminių medžiagų pagalba, iki paprastųjų cukrų. O šie jau gali būti fermentuojami iki produktų: etanolio, degalų ir kitų biomasės produktų. Kadangi ksantano gamybą labiausiai ribojantis veiksnys yra substratų kaina, todėl dažnai siūloma naudoti šiuos substratus kaip alternatyvų variantą: išrūgas, citrusinių vaisių atliekas, kukurūzų nuospaudas, glicerolį, vištų plunksnas, melasą, gliukozės sirupus bei alyvuogių aliejaus nuotekas.

1.5.2. Azoto šaltiniai

Azotas yra taip pat vienas iš svarbiausių maistinių medžiagų, kuris gali būti gaunamas tiek kaip organinis, tiek neorganinis komponentas. Organiniai šaltiniai paprastai yra pigesni už neorganinius ir jų gali būti paptone, mielių ekstrakte, kukurūzų išspaudose, sojų pupelių miltuose. Tuo tarpu svarbu žinoti, jog neorganiniais šaltiniais gali būti naudojamos amonio druskos, nitratai. Naudojant amonio druskas galima pasiekti didesnę biomasės išeigą, o nitratai yra tinkami didesnei ksantano išeigai gauti. Tačiau ne tik azoto šaltinis, bet ir jo koncentracija apsprendžia proceso našumą. Didžiausiai ksantano išeigai gauto gamybos metu yra reikalingas atitinkamas angliavandenilių ir azoto santykis, kuris turėtų būti kontroliuojamas augimo ir gamybos etapais. Azoto šaltinis kitaip negu anglies šaltinis, esant didelėms koncentracijoms neslopina proceso, tačiau ekstremalios azoto koncentracijos nėra naudingos išeigai. Tokiais atvejais dažnai yra leidžiami didesni azoto kiekiai proceso pradžioje ir eigoje jo kiekis yra mažinamas, jog užtikrinti ekonominius ir kokybinius rodiklius. Azoto kiekio ribojimas padeda slopinti bakterijų augimą ir skatinti ksantano sintezę [17].

1.5.3. Temperatūros poveikis

Be maistinių medžiagų šaltinių, kitas svarbus veiksnys yra temperatūra. Didelę įtaką ksantanui pagaminti turi temperatūros svyravimai mikroorganizmų augimo etape. Daugelio tyrimų nustatyta, jog optimali temperatūra didžiausiai išeigai gauti yra 28-30 °C [16]. Tačiau optimali temperatūra mikroorganizmams augti ir ksantanui nusodinti skiriasi: optimali augimo temperatūra yra apie 25-27 °C, o ksantanui nusodinti apie 25-30 °C [16]. Temperatūrų skirtumai *Xanthomonas campestris* auginimo metu lemia ir struktūrinę sudėtį nuo kurios priklauso gautos medžiagos klampumas. Buvo iširta, jog ksantano gamybos našumą galima padidinti taikant 25-35 °C temperatūrą, tačiau keliant temperatūrą aukščiau galima sukelti atvirkštinį poveikį ir taip sumažinti gaunamos biomasės bei ksantano kiekius [18]. Gamybos metu pakėlus temperatūrą virš 35 °C pakinta molekulinė konformacija ir susidaro mažos molekulinės masės ksantanai. Jame yra mažai acetato ir piruvato grupių, todėl galutinio produkto klampa yra maža.

1.5.4. pH poveikis

Fermentacijos metu pH turi tendenciją mažėti nuo pradinės 7,0 pH vertės. Esant silpnai pH kontrolei ir terpei pasiekus 5,5 pH bakterijų *Xanthomonas campestris* augimas ir ksantano susidarymas nevyksta. pH kaip ir temperatūra turi skirtingas optimalias reikšmes, skirtinguose gamybos etapuose: bakterijoms augti optimalus pH kinta nuo 6,0 iki 7,5, o ksantanui išskirti nuo 7,0 iki 8,0. Tai turi įtakos ksantano krūvio tankiui dėl kurio kinta molekuliniai ryšiai, lemiantys klampumą. Terpės pH reguliuoti yra rekomenduojama naudoti šarmus (KOH, NaOH). Nors KOH yra brangesnis už NaOH, tačiau jam dažniau teikiama pirmenybė dėl išskiriamo geresnės kokybės ksantano turinčio pageidaujamas manozės ir gliukurono rūgšties formas [8].

1.5.5. Deguonies pernaša

Xanthomonas campestris yra aerobinis mikroorganizmas, todėl deguonies pasiskirstymas proceso metu yra labai svarbus. Tam yra skiriamas didelis dėmesys maišyklės greičiui bei aeracijos greičiui. Ksantano gamybos metu dėl ekstra ląstelinio ksantano nusėdimo mažėja deguonies pernaša, o dėl didėjančio klampumo terpės aeravimas tampa sudėtingesnis ir sumažėja jos tolygumas ir maistinių medžiagų pasiskirstymas. Kadangi pagal *Xanthomonas campestris* prigimtį reikalingas didelis deguonies kiekis, todėl didesni ksantano kiekiai yra išskiriami, naudojant didelę deguonies koncentraciją [19].

1.5.6. Fermentacijos trukmė ir veikimo principas

Fermentacijos trukmė tiesiogiai priklauso nuo ląstelių augimo dinamikos ir substrato. Taip pat piruvato ir acetilo koncentracijos bei molekulinė masė didėja, ilgėjant fermentacijos laikui. Procesas baigiasi kai substratas yra pilnai sunaudojamas, todėl siekiant prailginti fermentacijos laiką dažnai renkamasi nepertraukiamą fermentaciją. Tačiau buvo nustatyta, jog neatsižvelgiant į fermentacijos trukmę, o tik optimizuojant bioreaktorių, substrato rūšį, galima pasiekti didelę ksantano išėigą [17].

1.6. Atliktų ksantano gamybos optimizavimo tyrimų apžvalga

Didėjant ksantano gamybos paklausai ir brangstant žaliavų kainoms yra būtina optimizuoti gamybinį procesą. Tyrimų metu ieškomi sprendimai apima sritis nuo alternatyvių žaliavų iki ekonomiškėsnų, našėsnų įrengimų paieškų. O siūlomi sprendimai padėtų išspręsti ne tik pramoninio poreikio, ekonomiškumo klausimus, bet ir prisidėtų prie aplinkosaugos problemų sprendimo.

1.6.1. Atliekos kaip anglies šaltinis ksantano gamyboje

Viena iš populiariausių ksantano gamybos optimizavimo tyrimų kryptėių yra efektyvaus ir ekonomiškė substrato paieškos, siekiant rasti našiausia rezultata duodantį anglies šaltinį nepakeičiant ksantanui būdingų savybių. Dėl naudojamos gliukozės ir sacharozės kaip anglies šaltinio, ksantanas yra vienas iš brangiausių egzopolisacharidų. Ieškant pigių anglies šaltinių ksantano gamybai didelėje dalyje tyrimų siekiama panaudoti žemės ūkio atliekas kaip substrata. Jėzus M. ir Mata F. 2023 metais savo tyrime vertino kukurūzų burbuolių tinkamumą kaip anglies, makro ir mikroelementų šaltinį ksantano gamybai su skirtingomis *Xanthomonas campestris* padermėmis [20]. Bandyto rezultatai parodė, jog didžiausia išėiga gaunama su vienos iš tirtų *Xanthomonas campestris* padermės bakterijomis ir kukurūzų burbuolės yra perspektyvi anglies šaltinio alternatyva, tačiau į terpę būtina papildomai pridėti sacharozės. Vienas iš

svarbesnių veiksnių, jog ištyrus savybes buvo gautas produktas labai panašus į šiai dienai gaminamą komercinį ksantaną.

2019 m. Kauno technologijos universitete Kerutytės I. atliktuose tyrimuose buvo įvertinti 9 skirtingi anglies šaltiniai bei nustatomas tinkamiausias tirpiklis ksantano išskyrimui [21]. Tyrimo rezultatuose yra aprašoma apie kokosų palmių žiedų cukraus terpės didelės išeigos pasiekimą lyginant su kitais alternatyviais substratais. Taip pat nepriklausomai nuo substrato įvertinta, jog acetonas yra tinkamiausias tirpiklis ksantano išskyrimui, kai tuo pačiu mažiausi ksantano kiekiai buvo gauti naudojant metanolį.

Maždaug trečdalis žmonių suvartojamo maisto yra išmetama arba tampa virtuvės atliekomis visoje maisto tiekimo grandinėje. Virtuvės atliekos yra viena iš sudėtingos biomasės rūšių, kuri pasižymi dideliu organinių medžiagų kiekiu ir drėgme. Tai lemia lengvą puvimą kas gali kelti grėsmę aplinkai. Šalinant virtuvės atliekas į sąvartynus gali susidaryti kenksmingos nuotekos užteršiančios žemės paviršinius ir požeminius vandenis. Dėl šios priežasties ne tik žemės ūkio atliekos, bet ir maisto pramonės atliekos bei virtuvės atliekos yra populiarus tyrimų objektas. Demirci A. S. ir Palabiyikas I. 2019 metų tyrime aprašo duonos atliekų hidrolizato taikymą ksantano gamybai pasirenkant 4 bakterijų padermių rūšis. Šio bandymo rezultatai parodė, jog iš 100 g duonos atliekų yra galima išgauti iki 14,1 g ksantano. Tačiau labai svarbus aspektas buvo pastebėtas renkantis skirtingas bakterijų rūšis. Tyrimo metu didžiausią dervos išeigą turėjo *X. axonopodis vesicatoria* bakterijos, tačiau didžiausiu klampumu pasižymėjo bakterijos gautos iš *X. campestris* bakterijų [22]. Tokiais atvejais siekiant neprarasti ksantano paklausųjų savybių tektų atsisakyti didžiausią našumą galinčią pasiekti bakteriją.

Taip pat tyrimai yra atliekami ir su pieno produktų atliekomis. Siekiama ksantano gamybai panaudoti išrūgas, pieno permeatus. Naujos technologijos yra vystomos pieno ir išrūgų permeatams naudojant laktozę fermentuojančias bakterijas (pienarūgštines bakterijas arba *Kluveromyces lactis*), taip pritaikant substratus ksantano gamybai. Šis metodas yra aktualus dėl galimybės panaudoti po hidrolizės gautą ksantaną kaip prebiotiką [16].

Ksantano gamyboje gliukozei ir sacharozei pakeisti taip pat buvo pritaikytos cukrinių runkelių minkštimo atliekos, tapijokos minkštimas, obuolių sulčių likučiai, sūrio išrūgos ir kt. Tačiau daugeliui iš šių atvejų reikalingos papildomos maistinės medžiagos. Pavyzdžiui, naudojant tapijokos minkštimą kaip fermentacijos substratą, reikalinga į terpę papildomai pridėti mielių ekstrakto ir kelių rūšių druskų. Tai gali padidinti gamybos išlaidas ir nors naudojamas nebrangus substratas, tačiau kaina išauga dėl papildomų terpės sudėtinųjų dalių. Dėl šios priežasties manoma, jog geriausias sprendimas būtų naudoti vienintelį nebrangų substratą, kuriam nereikalingos papildomos medžiagos [23]. Tokio požiūrio laikėsi 2016 metais savo tyrimus aprašę Li P. ir Li T., kurie pagrindiniu substratu panaudojo Sičuan universiteto valgyklos atliekų hidrolizatą. Atliekos buvo susmulkinamos mechaniniu maišytuvu iš karto po surinkimo ir hidrolizuojamos sieros rūgštimi. Gautas hidrolizatas naudojamas kaip fermentacinė terpė ksantano gamybai *X. campestris* bakterijomis. Pagal gautus rezultatus, jie įrodė, jog įmanoma gaminti ksantaną naudojant tik pasirinktą pigų substratą be jokių papildomų maistinių medžiagų [23].

1.6.2. Procesų ir įrangos optimizavimas ksantano gamyboje

Ksantano gamybai ir savybėms didelę reikšmę turi ne tik bakterijų padermė, terpės sudėtis ir substratas, bet ir procesų sąlygos bei naudojama įranga. 2007 metais Psomas S. ir Liakopoulou – Kyriakides M. savo tyrimuose ksantano gamybai iš *X. campestris* bakterijų naudojo paviršiaus atsako metodiką, kai buvo

tiriamas trijų nepriklausomų kintamųjų poveikis. Maišymo, temperatūros, fermentacijos laiko nepriklausomi parametrai buvo tiriami vienu metu, vertinant poveikį optimaliai ksantano ir biomasės gamybai. Tyrimo metu buvo įvertinamas gliukozės suvartojimas ir pH kitimas fermentacijos metu, taip pat nustatoma susidariusio ksantano cheminė sudėtis. Gauti rezultatai parodė, jog didinant maišymo greitį ir fermentacijos laiką, gaunami didesni ksantano ir biomasės kiekiai. Tyrime teigiama, kad optimali ksantano dervos gamyba pastebėta esant 600 aps./min., 30 °C, vykdant fermentaciją 72 val, o biomasė – 600 aps/min, 25 °C – 72 val Cheminėje sudėtyje esminių pokyčių nebuvo pastebėta [24].

Ksantano gamyba mikrobinės fermentacijos būdu gali turėti ne vieną bioprocesų modelį. Tarp skirtingų modelių vienas iš didžiausių išėigą turinčių ir apribojimus dėl substrato slopinančių modelių yra nepertraukiama fermentacija. Pusiau nepertraukiama fermentacija turi pranašumų, lyginant su periodiniu procesu. Šiai fermentacijai nereikia vystyti inokulianto po kiekvieno fermentacijos ciklo, reikalauja mažesnių energijos sąnaudų, o taikant šią strategiją dažnai gaunama ir didesnė išėiga. Kitas pusiau nepertraukiamos fermentacijos privalumas yra galimybė kontroliuoti deguonies pernešimą, mikroorganizmų augimo greitį, metabolitų gamybos kinetiką [25]. Nejadmansouri M. ir Razmjooei M. 2021 metais aprašytuose tyrimuose buvo atlikta pusiau nepertraukiama ksantano gamyba naudojant *Xanthomonas campestris* bakterijas bioplėveliniuose reaktoriuose. Siekiant padidinti mikrobu metabolitų išėigą buvo atliekamas imobilizavimas naudojant polietileno ir nerūdijančio plieno (PES ir SSS) atramas. PES bioreaktoriuje buvo stebimas didesnis pH sumažėjimas ir gliukozės suvartojimas fermentacinėje terpėje. PES terpėje taip pat nustatytas didesnis ląstelių augimas lyginant su SSS esančia terpe. Iš abiejų bioreaktorių gautas ksantanas buvo panašus į komercinį ksantaną savo savybėmis [25].

1.7. Ksantano panaudojimas

Ksantano naudingosios savybės yra: biologinis skaidumas, netoksiškumas, didelis polimerizacijos laipsnis, gebėjimas sudaryti gelius, vandens sulaikymas, kurios lemia jo panaudojimą daugelyje pramonės sričių. Komerciškai jis gali būti naudojamas biomedicinoje, farmacijos, kosmetikos, maisto, chemijos, tekstilės, naftos ir dujų pramonėje kaip tirštiklis, stabilizatorius, emulsiklis bei priedas gerinantis įvairių produktų kokybę [26].

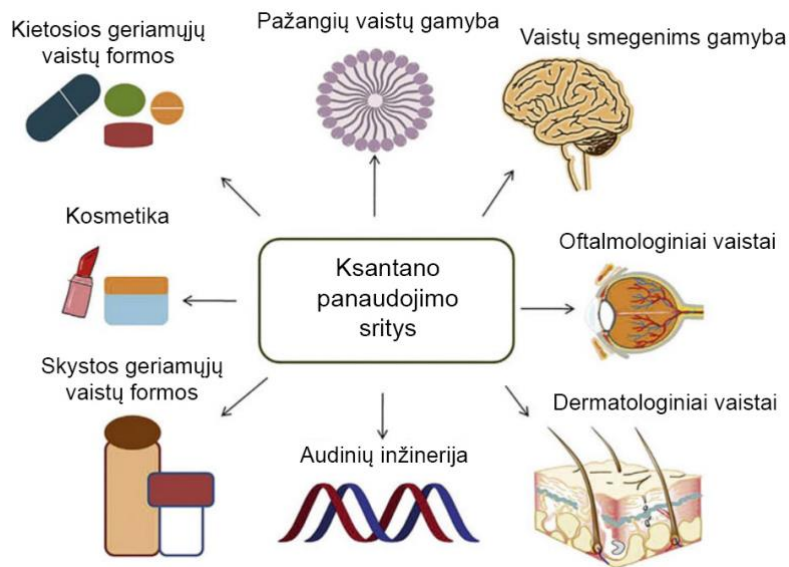
1.7.1. Ksantano pritaikymas farmacijoje ir medicinoje

Ksantanas atlieka didelį vaidmenį sveikatos priežiūros ir vaistų gamybos srityse. 1.5 pav. pavaizduota daugelis pritaikymo sveikatos sistemoje sričių. Šis egzopolisacharidas įeina į tokių vaistų sudėtis kaip: netilmicinas, zolomitriptanas, lamivudinas, karbamazepinas ir kt. Taip pat ksantanas gali formuoti hidrogelius, matricos sistemas, įeiti į niosomų sudėtį, dalyvauti nanodalelių sintezėje, taip pagerindamas šių medžiagų savybes [27].

Buvo pastebėta, jog ksantanas maišomas su magnetinėmis nanodalelėmis gali būti kaip stipriklis teršalų dažiklių absorbcijai ir pašalinimui iš vandens [26]. Biomedicinoje ksantano injekcija į sąnarį pagerina elastingumą ir sąnario sutepimą ir dėl to yra naudojama osteoartritui gydyti. Pastaruoju metu taip pat yra siekiama pritaikyti ksantaną audinių inžinerijoje, žaizdoms gydyti bei vėžio terapijoje. Ypatingas dėmesys skiriamas ksantano kompozitų su nanomedžiagomis ir kitų biologiškai suderinamų polimerų gamybai, kuri turėtų teigiamo poveikio audinių inžinerijoje. 2022 metais Piola B. ir Sabbatini M. savo straipsnyje aprašė apie želatinos ir ksantano hidrogelio pritaikymą 3D natūralių audinių biospausdinimui

[28]. Tolimesni šio tyrimo vystymai leistų panaudoti natūralaus pagrindo želatiną ir ksantaną žaizdų gydymui. Taip pat vis daugiau ieškoma kaip pritaikyti ksantaną terapinių vaistų gamybai.

Kosmetikos pramonėje taip pat paklausus kaip emulsijos stabilizatorius, tirštiklis, tekstūros stipriklis. Dėl gebėjimo paversti gelio struktūrą vandeniu taip pat naudojamas kaip klampumo modifikatorius. Ksantanas pasižymi geresniu veiksmumu plaukų formavimo priemonėse. Taip pat gali būti naudojamas želinės tekstūros akių šešėlių gamyboje homogeniškumo ir galiojimo išlaikymui. Ksantanas naudojamas kremuose nuo saulės, dantų pastos, šampūno, muilo sudėtyje ir kai kuriuose dermatologiniuose gaminiuose [6].



1.5 pav. Ksantano panaudojimo potencialios sritys sveikatos sistemoje

1.7.2. Ksantano pritaikymas maisto pramonėje

Ksantano mišiniai su kitais polisacharidais t.y. karageninu, guaru ir galaktomananu yra puikūs ledų, šerbeto, pieno kokteilių stabilizatoriai. Ksantanas su metil-karboksimetilceliulioze tinka šaldytiems pieno produktams, o su karboksimetilceliulioze – rūgštintiems jogurtams. Šie mišiniai užtikrina klampumą, pagerina skonį, apsaugo nuo karščio [29].

Kepinių gamyboje ksantanas naudojamas vandens surišimui padidinti kepat ir sandėliuojant produktus. Taip pat prailgina galiojimo laiką ne tik kaitintų, bet ir šaldytų gaminių. Ksantanas gali būti naudojamas ir kaip kiaušinių pakaitalas sumažinant reikiamo kiaušinio baltymo kiekį kepiniuose [2, 6]. Šis egzopolisacharidas pagerina duonos, bandelių, pyragų minkštumą, oro išsiskverbimą ir laikymąsi, mažina kalorijų ir glitimo kiekį. Privalumų yra įžvelgiama ir kepinių priedams: vaisiams, kremams. Jiems ksantanas suteikia pridėtinių savybių, leidžiančių prailginti galiojimo laiką ir užtikrinti geresnę stabilumą, ypač keičiant produkcijos laikymo temperatūras.

Gėrimų pramonėje ksantanas turi įtaką produkto išvaizdai, tekstūrai, maloniam skoniui ir greitam tirpimui. Sausuose gėrimų mišiniuose jis pagerina pakartotinai gaminamo gėrimo stabilumą, kokybę, bei užtikrina reikiamą klampumą [2].

Viena iš populiariausių ksantano panaudojimo maisto pramonėje sričių yra padažai. Jo stabilumas esant rūgštims ir druskai, veiksmingumas esant mažoms koncentracijoms ir labai pseudoplastinė reologija leidžia šiam egzopolisacharidui tapti idealiu stabilizatoriumi mažai aliejaus turinčių ir įprastų padažų gamyboje [2]. Padažai su ksantanu pasižymi puikiu ilgalaikiu emulsijos stabilumu ir klampumo išlaikymu esant temperatūros pokyčiams. Be padažų, ksantanas taip pat yra naudojamas sirupų ir užpilų gamybai, nes taip užtikrinama reikiama konsistencija, klampumas, tirštumas. O šios savybės padeda produktams atrodyti patraukliai naudojant kituose maisto gaminiuose.

1.7.3. Ksantano pritaikymas naftos pramonėje

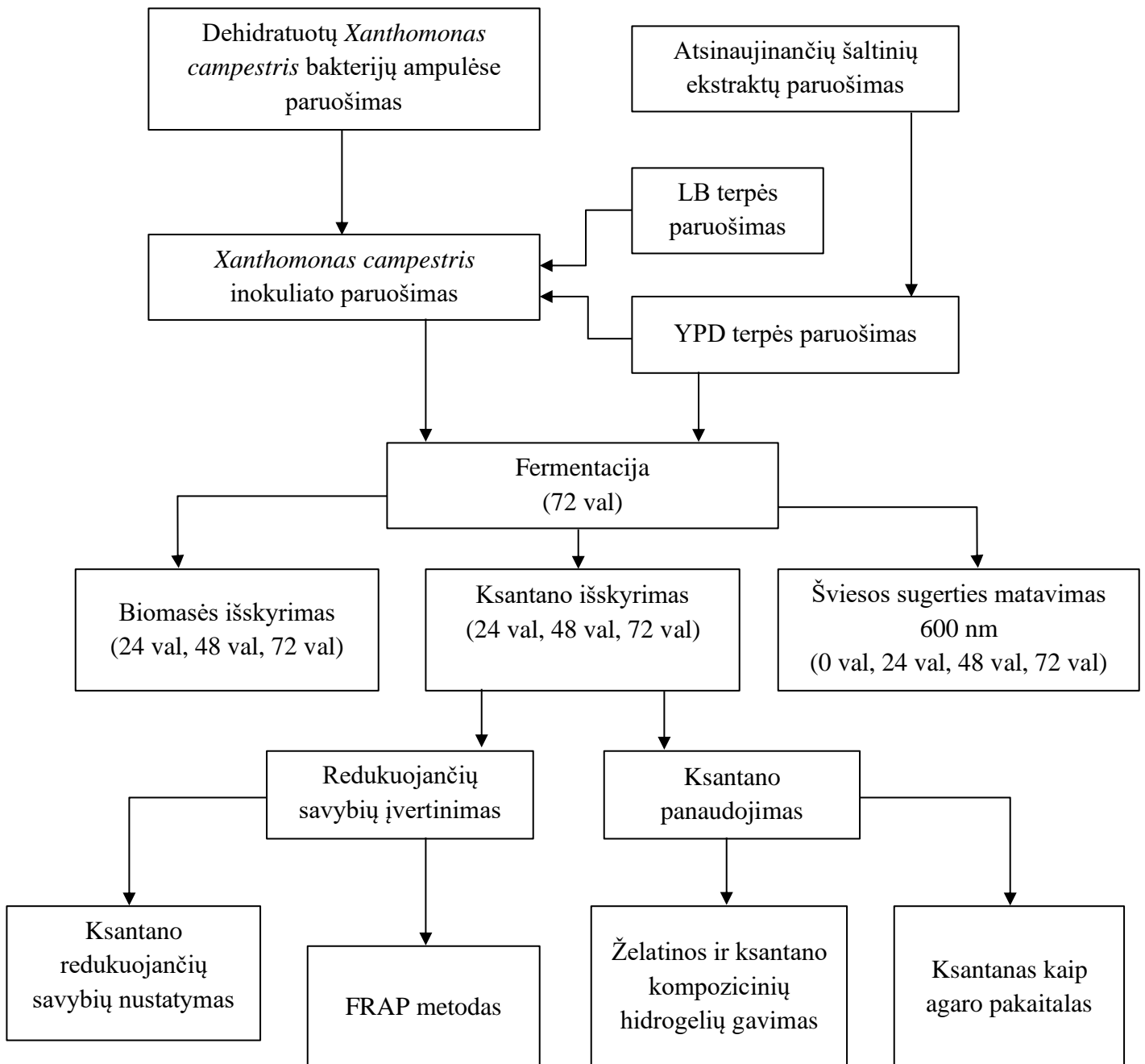
Ksantanas naftos pramonėje yra naudojamas išgauti naftą, valyti vamzdynus ir atlikti kitus naftos išgavimo bei baigimo darbus. Jis taip pat yra naudingas gręžimo skysčių priedas. Miceliniam polimere ksantanas yra naudojamas kaip tretinės alyvos regeneravimo priemonė [30].

1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Auganti ksantano paklausa ir ekonominiai bei vis labiau populiarėjantys ekologiniai aspektai skatina gamybos procesų optimizavimą, ieškant palankesnių sąlygų ir žaliavų. Pritaikius naujas gamybos sąlygas bei žaliavas galima ne tik procesą paversti ekonomiškiau, taip padedant patenkinti kylančią paklausą. Tačiau yra aktualu gauti tokios pačios arba geresnės kokybės produktą, kuris leistų dar labiau praplėsti pritaikymą įvairiose pramonės srityse. Toliau aprašytuose tyrimuose buvo stengiamasi pritaikyti alternatyvius anglies šaltinius, kurie sudaro didžiąją dalį kaštų ksantano gamyboje. Antrinių žaliavų kaip substrato panaudojimas leistų užtikrinti pigesnę gamybą bei atitiktų tvarumo principus tuo pačiu mažinant natūralių resursų naudojimą. Gautas ksantanas iš skirtingų anglies šaltinių buvo papildomai tiriamas, jog ekonomiškais būdais gautas produktas nesiskirtų nuo komercinio ksantano ir būtų tinkamas kuriant pridėtinę vertę.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimo eiga



2.1 pav. Tyrimų eiga

Tyrimai pradami nuo *Xanthomonas campestris* bakterijų atgaivinimo ir jų inokulianto paruošimo, kuris buvo reikalingas fermentacijai visose atrinktų atsinaujinančių šaltinių terpėse. Prieš pradėdant inokulianto paruošimą, pagal mitybinių terpių receptūras yra gaminamos Luria – Bertani (LB) ir YPD (angl. *yeast extract peptone dextrose broth*) terpės. Paruoštas inokuliantas laikomas inkubatoriuje kol bus paruošos fermentacinės terpės. Jų paruošimas pradėdama nuo atrinktų atsinaujinančių šaltinių ekstraktų gamybos ir jų perkėlimo į iš anksto paruoštą YPD terpę. Vienu metu buvo gaminami ir tiriami 2 mėginiai su

skirtingais anglies šaltiniais dėl limituotos vietos laboratorijoje. Po 24 val, 48 val ir 72 val mėginiai pakartotinai išimami ir nupilama dalis terpės biomasės ir ksantano koncentracijų nustatymui bei išmatuojama sugertis. Tyrimai kartojami su paruoštu inokuliatu ta pačia tvarka ištiriant 20 skirtingų anglies šaltinių terpių.

Po pašalintos terpės dalies centrifugavimo atskiriamos nuosėdos, kurios džiovinamos ir sveriamos biomasės koncentracijos nustatymui. Skystoji dalis yra maišoma su tirpikliu, kuris nusodina ksantaną ir pašalinus tirpiklį bei išdžiovinus nuosėdas, svėrimo būdu nustatoma ksantano koncentracija. Gauti ksantano mėginiai naudojami redukcinių savybių tyrimams dviem metodais. Kadangi komercinis ksantanas nepasižymi stipriomis redukcinėmis savybėmis, pakeistos gamybos sąlygos gali lemti jų sustiprėjimą. Taip pat ksantano kokybei vertinti buvo siunčiami mėginiai į Vilniaus universitetą FT-IR tyrimams, komercinio ir laboratorijoje gauto ksantano palyginimui.

Paskutiniai buvo atlikti ksantano panaudojimo tyrimai. Juos atliekant buvo siekiama įvertinti ar ksantanas gali būti panaudojamas dar pramoniniu mastu nebūdingoms kryptims. Bei palyginti rezultatus su komerciniu ksantanu, jog įsitikintume dėl pakeistų gamybos sąlygų tinkamumo ir naudingųjų savybių išsaugojimo.

2.2. Mitybinės terpės

Luria – Bertani (LB) agaro terpė – tai neselektyvi mitybinė terpė, kuri gali būti naudojama bakterijoms auginti. Taip pat šioje terpėje yra auginamos *Escherichia coli* bakterijos. Ji yra plačiausiai naudojama terpė gyvybingumui palaikyti ir rekombinantinėms linijoms auginti. Terpėje esantis peptonas ir mielių ekstraktas yra būtini augimo veiksniai, o NaCl svarbus elektrolitas reikalingas pernašai ir osmosinei pusiausvyrai užtikrinti. LB terpė gali būti ir selektyvi, papildžius ją antibiotikais [31].

2.1 lentelė. LB terpės sudėtis

LB agaro terpė	
Komponentas	Koncentracija (g/l)
Peptonas	10,0 g/l
Mielių ekstraktas	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Agaras	15,0 g/l

YPD (angl. *yeast extract peptone dextrose broth*) terpė – sudaryta iš visų maistinių medžiagų, kurios reikalingos auksotrofinėms padermėms auginti. Mielių augimas YPD terpėje yra labai svarbus, jeigu yra ruošiamos ląstelės transformacijai prieš užšaldymą ir bendram neselektyviam auginimui. YPD terpėje anglies šaltinis gali būti keičiamas [32].

2.2 lentelė. YPD terpės sudėtis

YPD terpė	
Komponentas	Koncentracija (g/l)
Peptonas	25,0 g/l
Mielų ekstraktas	10,0 g/l
Gliukozė (anglies šaltinis)	20,0 g/l

Anglies šaltiniai naudoti YPD terpių gamybai:

- Gliukozė – 6 anglies atomų struktūra, kurios cheminė formulė $C_6H_{12}O_6$. Tai yra vienas pagrindinių energijos šaltinių, kuris svarbus tiek aerobiniam, tiek anaerobiniam ląstelių kvėpavimui [33]. Komercinėje ksantano gamyboje gliukozė yra dažniausiai naudojamas anglies šaltinis dėl didelės produkto išeigos, tačiau tai nėra ekonomiškai perspektyviausias variantas.
- Sacharozė – disacharidas, kurio cheminė formulė $C_{12}H_{22}O_{11}$. Sacharozė yra neredukuojantis cukrus ir kaitinant išlieka stabili [34]. Ji yra cukranendrių, cukrinių runkelių, medaus ir datulių sudėtyje. Išgaunama dideliais kiekiais komerciniais tikslais naudojimui maistui, kaip visiems geriau žinomas cukrus.
- Cukranendrių cukrus, kuris dar nebūna apdorotas iki sacharozės yra natūralus ir žinomas kaip rudasis cukrus. Jį sudaro 94 - 98,5% sacharozės ir 1,5 – 6% nesacharidinių komponentų (redukuojančių cukrų, organinių rūgščių, aminorūgščių, baltymų, krakmolo, dažiklių) [35].
- Kokosų palmių žiedų cukrus – saldiklis ir yra plačiai naudojamas Pietų ir Pietryčių Azijoje. Jis yra išgaunamas iš palmių neatsivėrusių žiedynų kristalizuojant ant atviros ugnies. Tačiau šio cukraus yra išgaunama mažesniais kiekiais, kadangi kokoso palmė per mėnesį užaugina vieną žiedyną ir per dieną iš vienos palmės galima pagaminti apie 200 g cukraus. Dėl populiarėjančios sveikos mitybos ir neigiamo visuomenės dėmesio į didelį cukraus vartojimą, kokosų palmių žiedų cukrus tampa vis populiarese alternatyva įprastam cukrui [36].
- Fruktozė – monosacharidas, kuris randamas daugelyje vaisių, daržovių ir yra daug saldesnis už gliukozę bei sacharozę [37]. Dažnai naudojama maisto produktuose ne tik dėl saldumo bet ir dėl tekstūros bei skonio. Plačiai pritaikoma gaiviųjų gėrimų gamyboje. Fruktozės suvartojimas auga su kiekvienais metais, o bendras suvartojimas sudaro maždaug 8 – 12 % suaugusių suvartojamos energijos. O asmenys, kurie geria daug gaiviųjų gėrimų šio monosacharido suvartoja daugiau nei du kartus daugiau nei vidutiniškai [38].
- Laktozė – disacharidas, sudarytas iš gliukozės ir galaktozės. Ji yra viena pagrindinių žmogaus ir gyvūnų pieno sudedamųjų dalių ir atlieka energijos nešiklio vaidmenį. Dėl savo fiziologinių ir funkcinių savybių pramoniniu būdu pagaminta laktozė naudojama daugelyje maisto produktų ir farmacijos pramonėje [39].
- Galaktozė – monosacharidas, kurio cheminė formulė sutampa su gliukozės formule $C_6H_{12}O_6$. Struktūriškai galaktozė taip pat panaši į gliukozę, o skiriasi tik vienos hidroksilo grupės padėtimi kuri ir nulemia skirtingas savybes. Pagrindinis galaktozės šaltinis yra disacharidas laktozė, kuris yra gaunamas su pieno produktais [40].

- Arabinozė – 5 anglies atomų monosacharidas, kuris yra vienas iš cukrų lignoceliuliozės hidrolizatuose [41]. Didžiausias arabinozės šaltinis yra žemės ūkio atliekos: kietosios medienos dalys, kukurūzų burbuolės.
- D-manitolis – poliolis gaunamas iš manozės redukcijos būdu, plačiai naudojamas kaip saldiklis ir vaistas. Jis yra mažo kalingumo saldiklis dėl prasto žarnyno įsisavinimo. Kaip vaistas gali būti vartojamas injekcijomis arba inhaliacijomis sergant glaukoma, padidėjusiam kraujo spaudimui mažinti [42].
- D-sorbitolis – linijinė 6 anglies atomų struktūra, kurios cheminė formulė $C_6H_{14}O_6$. Natūraliai sorbitolio galima rasti įvairiuose vaisiuose ir kai kuriose daržovėse, bet taip pat yra gaminamas ir sintetiniu būdu. Kaip ir D-manitolis jis yra priskiriamas alkoholių cukrui ir turi mažesnę saldumą už sacharozę. Farmacijoje jis naudojamas kaip vidurius laisvinantis vaistas [43].
- Celiuliozė – pagrindinis pirminės augalo ląstelės sienelės struktūrinis polisacharidas. Ji yra viena iš lignoceliuliozės sudarančių junginių ir sudaro 30 - 50% sausosios masės [44]. Pagrindiniai celiuliozės šaltiniai yra kviečių šiaudai, kukurūzai, kanapės, ryžiai, džiuatas. Celiuliozės šaltiniai yra pasirenkami pagal tai kokių tikslų celiuliozė bus naudojama.
- Ksilozė – monosacharidas, kurio cheminė formulė $C_5H_{10}O_5$. Ji dažnai yra naudojama kaip maisto saldiklis ir ksilitolio šaltinis gaunamas iš hemiceliuliozės. Populiariausias šaltinis yra kukurūzų burbuolės. Lignoceliuliozės žaliavose yra apie 5 – 20% pentozės cukrų, ksilozės ir arabinozės, tačiau ksilozė yra laikoma viena iš gausiausių pentozės cukrų [45].
- Apelsinų žievelės – gausi maisto atliekų žaliava, kuri gali būti verčiama į vertingus produktus. Tačiau yra susiduriama su kliūtimis dėl žievelėse esančio limoneno, kuris slopina mikroorganizmų augimą. Apelsinų žievelės yra perspektyvus maistinių medžiagų šaltinis dėl jose esančių tirpių ir netirpių angliavandenių bei mažos baltymų koncentracijos [46]. Per metus yra pagaminama apie 30 milijonų tonų apelsinų žievelių atliekų ir tai yra vienos iš pagrindinių citrusinių vaisių perdirbimo pramonės atliekų [47].
- Mandarinų žievelės – svarbi žemės ūkio pramonės atlieka, kuri ne tik gali būti panaudojama kaip maistinių medžiagų šaltinis, bet ir kaip potencialus absorbentas įvairiems teršalams. Mandarinų žievelės yra vienos iš daugiausiai pektinų turinčių vaisių atliekų. Jų sudėtyje yra lignino, hemiceliuliozės, celiuliozės ir pektino. Kai apdorotos mandarinų žievelės yra išmetamos į aplinką po vaisių sulčių gamybos arba yra sudeginamos kaip atliekos, laikui bėgant tai sukelia oro taršą [48].
- Citrinų žievelės – nebrangi citrusinių vaisių biologinė atlieka, kuri gali būti panaudota tiek kaip maistinių medžiagų šaltinis, tiek absorbcinių medžiagų gamybai. Jų sudėtyje yra lignino, celiuliozės, hemiceliuliozės, pektino ir amido junginių. Kaip ir apelsinų, taip ir citrinų žievelių atliekos yra vienos pagrindinių citrusinių vaisių perdirbimo pramonės atliekų. Šios atliekos sudaro 50-70% šviežių vaisių masės ir po sulčių išgavimo dažniausiai yra nebenaudojamos [49].
- Avokadų žievelės – nevalgomos perdirbimo pramonės liekanos, kurios nepaisant jose esančių biologiškai aktyvių medžiagų, komerciškai nėra vertingos. Jos sudaro apie 11 % viso vaisiaus

svorio. Avokado žievelėse yra įvairių biologinėmis savybėmis pasižyminčių junginių: polifenolių, cukrų, riebalų rūgščių [50]. Nuo 1990 m. avokadų paklausa labai išaugo ir didėja su kiekvienais metais [51]. Kadangi perdirbus minkštimą pašalinamos nevalgomos žievelės ir sėklos, todėl susidaro daug kietųjų atliekų, kurios didina pasaulyje susidarančių kietųjų atliekų kiekius.

- Melionų žievelės – yra viena iš atliekų perdirbant melionus, kuriose yra daugiau biologiškai aktyvių junginių, lyginant su minkštimu, įskaitant polifenolius bei karotinoidus. Taip pat žievelėse yra nemažai fitocheminių junginių, kurie pasižymi antioksidaciniu, antimikrobiniu bei priešuždegiminiu poveikiu. Dėl šių priežasčių iš meliono yra gaminami įvairūs natūralaus vartojimo produktai. Susidariusios atliekos gali būti panaudojamos gyvūnų pašarams, dirvožemio erozijos prevencijai bei kaip biodegalų pirmtakai [52].
- Obuolių žievelės – didelės apimties maisto pramonės biologinės atliekos. Jų sudėtyje yra daug fenolinių junginių. Po citrusinių vaisių ir bananų tai yra trečias pagal populiarumą vaisius [53]. Šalutiniai obuolių produktai, įskaitant žievelės ir išspaudas, sudaro 30 % pirminio vaisiaus svorio. Tai yra didelis kiekis šalinamų atliekų, kurios yra biologiškai skaidžios ir teršia aplinką [54].
- Ksilitolis – 5 anglies atomų struktūros cukraus alkoholis, kurio cheminė formulė $C_5H_{12}O_5$. Jis plačiausiai naudojamas kaip saldiklis be cukriuose konditeriniuose gaminiuose. Jo natūraliai galima rasti vaisiuose ir daržovėse, o savo saldumu gali būti prilyginamas sacharozei bei yra saldžiausias iš visų poliolių [55].
- Eritritolis – 4 anglies atomų struktūros cukraus alkoholis, kurio cheminė formulė $C_4H_{10}O_4$. Jis plačiausiai naudojamas kaip mažo kaloringumo saldiklis maisto pramonėje ir farmacijoje. Yra laikoma, jog eritritolis turi beveik 0 kalorijų. Jo saldumo lygis sudaro 70% sacharozės saldumo ir yra saugus vartoti asmenims sergantiems diabetu [56].

2.3. Tyrimų metu naudota įranga

- Svarstyklės (Shimadzu ATX 8400) – padala 0,1 mg.
- pH metras (Winlab) – pH riba nuo 1,0 iki 15,0.
- Centrifuga (Universal 320 R) – temperatūros intervalas nuo -20 °C iki 4 °C.
- Termostatas (Binder BD23) - temperatūros intervalas nuo 5 °C iki 100 °C.
- Termostatas – maišyklė (Biosan ES – 20) - temperatūros intervalas nuo 5 °C iki 42 °C.
- Spektrofotometras (Shimadzu UV – 1280) - bangos ilgio intervalas 190 - 1100 nm.
- Magnetinė maišyklė (Heidolph Mr Hei – Tec) - maišymo greitis 100-1400 aps./min.
- Autoklavas (Certoclav CV – EL) - maksimali temperatūra 140 °C, maksimalus slėgis 2,7 bar.
- Laminaras (Telstar BV 100) - oro greitis 0,4 m/s; apšvietimas > 800 lux; triukšmas < 60 dB.
- Vandens vonelė (Memmert WNE 7) – talpa 7l, temperatūros intervalas nuo 5 iki 95 °C.

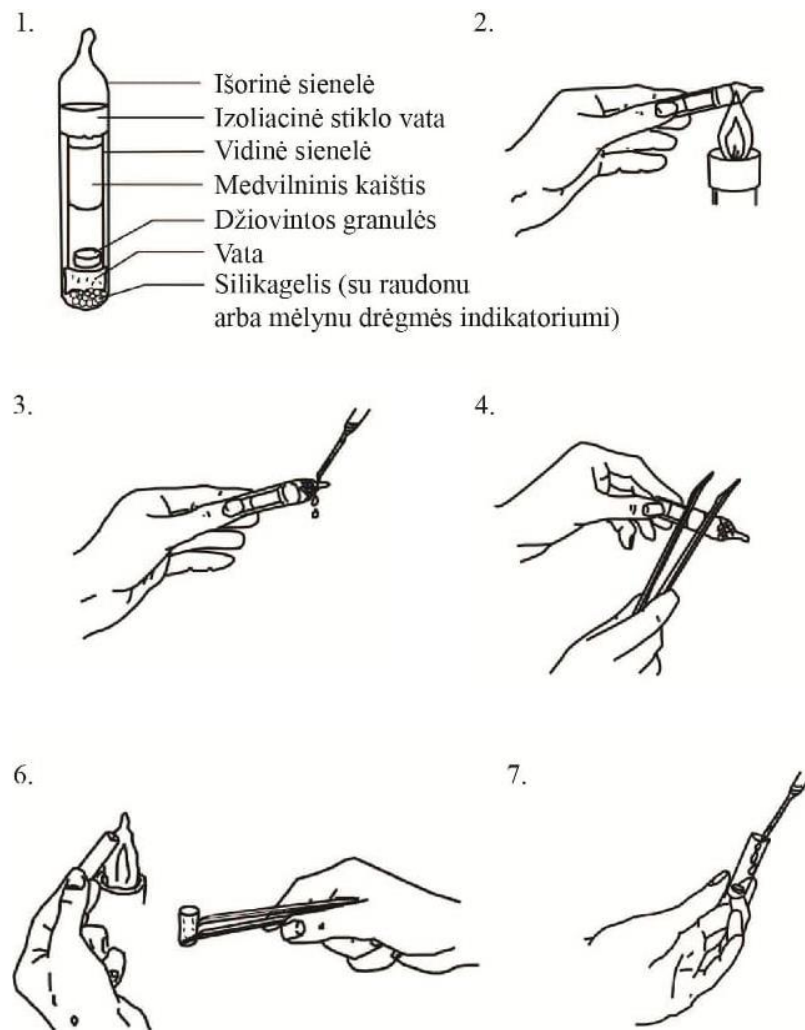
- Purtyklė (Biosan BioVortex V1) - maišymo greitis 500-3000 aps./min.

2.4. Tyrimų metodai

2.4.1. Dehidratuotų *Xanthomonas campestris* bakterijų ampulėse paruošimas

Tyrimui buvo naudotos išdžiovintos *Xanthomonas campestris* bakterijų kultūros iš tiekėjų gautos ampulėse. Tolimesniam naudojimui bakterijos turėjo būti ruošiamos pagal pateiktą instrukciją:

1. pašalinama stiklinė ampulė iš antrinės pakuotės;
2. ampulės galiukas atsargiai kaitinamas virš liepsnos;
3. užlašinami 2-3 lašai vandens ant kaitinamo galo, jog stiklinė ampulė įskiltų;
4. atsargiai pašalinamas stiklinis galas su atitinkamu įrankiu (pincetu);
5. pašalinama izoliacinė medžiaga ir išimama vidinė kapsulė;
6. ištraukiamas medvilninis kaištis naudojant pincetą, viskas vykdoma sterilioje aplinkoje, prie liepsnos šaltinio. Ampulės viršutinė vidinė dalis nudeginama;
7. pridedama 0,5 ml specialios terpės ir pakeičiamas kaištis, ampulė paliekama 30 minučių rehidratavimuisi;
8. turinys atsargiai sumaišomas su mikrobiologine kilpele arba Pastero pipete. Jis gali būti perkeliamas į mėgintuvėlį su 5 ml rekomenduojamos skystos terpės arba gali būti sėjamas agaro terpėje [21].



2.2 pav. Dehidratuotų *Xanthomonas campestris* bakterijų paruošimo schema

2.4.2. *Xanthomonas campestris* inokulianto paruošimas

Xanthomonas campestris bakterijos yra sėjamos paviršiniu būdu naudojant mikrobiologinę kilpelę į LB terpę ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje 1 parą. Išaugusi kolonija paimama steriliu mėginių ėmimo įrankiu ir perkeliama į kolbą su YPD terpe, kuri yra sudaryta iš peptono, mielių ekstrakto ir gliukozės. Kolba su paruoštu inokuliatu laikoma kratomajame inkubatoriuje iki fermentacinės terpės ruošimo.

2.4.3. Atsinaujinančių šaltinių, celiuliozės pavertimas į redukuojančius cukrus

Pasverinama 3% tiriamosios žaliavos ir įpilama 0,1 citratinio buferio (4,8 pH), 3% „Cellustar XL“ fermentinio mišinio. Mišinys inkubuojamas 50 °C temperatūroje 50 min. Mėginiai centrifuguojami 10 min.

2.4.4. Fermentacinės terpės ruošimas

Ksantano fermentacijai iš *Xanthomonas campestris* bakterijų yra naudojama YPD terpė su pasirinktu anglies šaltiniu.

Į 250 ml Erlenmejerio kolbą yra pasveriami ir įdedama 5 g peptono, 2 g mielių ekstrakto ir 4 g pasirinkto anglies šaltinio (gliukozė, sacharozė, avokadų žievelių hidrolatas ir kt.). Į kolbą su terpės sudėtinėmis maistinėmis medžiagomis įpilama 150 ml vandens ir gerai išmaišoma, kol medžiagos ištirpsta. Pagamintos YPD terpės pH sureguliuojamas iki 7,0 pH su 1N NaOH. Papildoma vandens iki 200 ml ir paruošta terpė inkubuojama 37 °C.

2.4.5. Fermentacija

7 ml paruošto inokulianto įpilama į 250 ml Erlenmejerio kolbą, kurioje yra 200 ml YPD terpės su pasirinktu anglies šaltiniu. Fermentacijos terpė inkubuojama termostate-maišyklėje, 37 °C temperatūroje 72 val, esant 180 rpm maišyklės greičiui. Kas 24 val imami mėginiai biomasės ir ksantano kiekiams nustatyti.

2.4.6. Biomasės išskyrimas iš fermentuojamos terpės

Iš fermentuojamo tirpalo yra paimamas 5 ml mėginys į iš anksto pasvertą mėgintuvėlį. Mėginys centrifuguojamas 10 min 9000 aps./min. Po centrifugavimo skystis atskiriamas ksantanui nusodinti, o likusios nuosėdos džiovinamos 45 °C biomasės kiekiui įvertinimui. Išdžiūvęs mėginys pasveriamas ir atimamas mėgintuvėlio pradinis svoris.

$$m_{\text{biomasės}} = m_1 - m_0, g/5ml; \quad (2.1)$$

čia:

$m_{\text{biomasės}}$ – biomasės masė, g/5ml;

m_1 – mėgintuvėlio su išdžiovintomis nuosėdomis masė, g;

m_0 – tuščio mėgintuvėlio masė, g.

2.4.7. Ksantano išskyrimas iš fermentuojamos terpės

Iš fermentuojamo tirpalo yra paimamas 5 ml mėginys ir centrifuguojamas 10 min 9000 aps./min. Supernatantas nupilamas į pasvertą mėgintuvėlį. Į supernatantą įpilama 5 ml 25% KCl ir 35 ml izopropanolio ir sumaišoma purtykle. Po paros mėginiai nucentrifuguojami ir nuosėdos džiovinamos 45 °C ksantano kiekiui įvertinti. Išdžiūvęs mėginys pasveriamas ir atimamas mėgintuvėlio pradinis svoris.

$$m_{\text{ksantano}} = m_1 - m_0, g/45ml; \quad (2.2)$$

čia:

m_{ksantano} – ksantano masė, g/45ml;

m_1 – mėgintuvėlio su išdžiovintomis nuosėdomis masė, g;

m_0 – tuščio mėgintuvėlio masė, g.

2.4.8. Ksantano redukcinių savybių nustatymas

Šiuo metodu galima nustatyti ksantano redukuojančias savybes.

Mėginiai paruošiami 1 mg/ml koncentracijos, ištirpinus 0,01 g ksantano mėginius 10 ml H₂O. 0,5 ml mėginio yra sumaišoma su 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio ir 1,25 ml 1% K₃[Fe(CN)₆]. Sumaišius, inkubuojama 50 °C temperatūroje 20 min. Po to pridedama 1,25 ml 10% trichloracto rūgšties ir pakartotinai sumaišoma. Jei susidaro nuosėdos, galimas centrifugavimas.

1,25 ml gauto tirpalo sumaišoma su 1,25 ml distiliuoto vandens ir 0,25 ml 0,1 % FeCl₃. Tuščias mėginys ruošiamas su 1 ml 0,2 M fosfatinio buferio ir 1ml K₃[Fe(CN)₆]. Mėginiai išmatuojami spektrofotometriškai esant 700 nm bangos ilgiui. Didesnė šviesos sugertis nusako didesnes redukcines savybes.

2.4.9. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą

Šiuo metodu galima nustatyti ksantano redukuojančias savybes. Jis paremtas Fe³⁺ virsmu į Fe²⁺ (melsva spalva) esant 593 nm.

FRAP reagentas buvo ruošiamas su 75 ml 300 mM acetate buferiu, 7,5 ml 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinu) ir 7,5 ml FeCl₃ x 6H₂O (20 mmol/l).

Kalibracinė kreivė buvo ruošama su skirtingais FeSO₄ x 7H₂O kiekiais (5, 10, 15, 20, 25 μmol/l). Pridėjus po 3 ml FRAP reagento, mėginiai buvo išmatuojami spektrofotometriškai 593 nm bangos ilgyje. Tuščiu mėginiu laikomas mėginys su 3 ml FRAP reagento ir 7 ml H₂O. Pagal gautas reikšmes brėžiama kalibracinė kreivė.

Mėginiai paruošiami 1 mg/ml koncentracijos ištirpinus 0,01 g tiriamosios medžiagos 10 ml H₂O. Tyrimo metu mėginiai 50 μL buvo sumaišomi su 1,5 ml FRAP reagento. Reakcijos mišinys spektrofotometriškai buvo matuojamas 593 nm bangos ilgyje. Tuščiu mėginiu laikomas mėginys su 1,5 ml FRAP reagento ir 3,5 ml H₂O.

2.4.10. Ksantanas/želatina hidrogelio ruošimas

Šiuo tyrimo metodu buvo siekiama nustatyti ar iš skirtingų anglies šaltinių gautas ksantanas pasižymi tokiomis pačiomis savybėmis kaip ir komercinis ksantanas formuojant hidrogelius kompozicijoje su želatina.

1,25 g želatinos yra ištirpinama 50 g vandens. Kitame mėgintuvėlyje paruošiamas ksantanas, 0,6 g ksantano ištirpinama 50 g vandens. Ištirpus abejoms medžiagoms, jos sumaišomos santykiu 1:1. Paruoštas hidrogelis išpilamas į lėkštelę ir paliekamas parai. Vizualiai įvertinamas plėvelės susidarymas [28].

2.4.11. Ksantano kaip agaro pakaitalo įvertinimas brokolių sėkloms daiginti

Šiuo tyrimo metodu buvo siekiama nustatyti ar ksantanas yra tinkamas standiklis vietoj agaro brokolių augalams daiginti.

Ruošiamos 2 terpės: Murashige-Skoog (MS) terpė su 1% ir MS terpė su 1 % ksantanu, pH reguliuojamas su 0,1 N NaOH arba HCl iki 5,8 pH. Terpės sterilizuojamos autoklave 121 °C temperatūroje 15 min.

Eksperimentui pasirinktos brokolių sėklos buvo pasodintos į terpes papildytas 2 % sacharozės, 1 % agaro arba 1 % ksantano. Brokolių sėklos daiginamos 25 °C temperatūroje ir stebimas jų daigumas [57].

2.4.12. Chlorofilo A ir B bei karotinoidų koncentracijos nustatymas brokoliuose

Karotinoidų ir chlorofilo *a* ir *b* bei nustatymas augaluose yra paremtas šviesos sugerties nustatymu spektrofotometru atitinkamuose bangos ilgiuose:

- Chlorofilui *a* (662 nm);
- Chlorofilui *b* (644 nm);
- Karotinoidams (441 nm).

Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos nustatymui tiriamos augalinės medžiagos (0,05-1 g) yra susmulkinamos grūstuvėje. Papildomai pridedama 5 ml 96% C₂H₅OH ir viskas susmulkinama iki vientisos masės. Gauta masė centrifuguojama 10 min. 9000 aps./min, o nucentrifuguoto ekstrakto tūris išmatuojamas cilindru. Vėliau ekstraktas praskiedžiamas etanoliu, kad praskiestų tirpalų šviesos sugertis būtų nuo 0,1 iki 0,8. Matavimai atliekami spektrofotometru 662 nm (chlorofilo *a*), 644 nm (chlorofilo *b*) ir 441 nm (karotinoidai) bangų ilgiuose.

Pigmentų koncentracija apskaičiuojama pagal formules:

Chlorofilo *a* koncentracijos apskaičiavimas (mg l⁻¹): $C_a = 9,784 \cdot D_{662} - 0,99 \cdot D_{644}$;

Chlorofilo *b* koncentracija (mg l⁻¹): $C_b = 21,426 \cdot D_{644} - 4,65 \cdot D_{662}$;

$C_a + C_b = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644}$;

Karotinoidų koncentracija (mg l⁻¹): $C_{karotinoidai} = 4,695 \cdot D_{441} - 0,268 \cdot (C_a + C_b)$;

Pigmentų kiekis mg/100g apskaičiuojamas:

$$X = C \cdot V \cdot V_2 \cdot \frac{100}{n \cdot V_1} \cdot 1000;$$

čia:

C - pigmentų koncentracija mg/l;

V - pradinis ekstrakto tūris;

V₁ - pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

V₂ - praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n - augalinė masė, g.

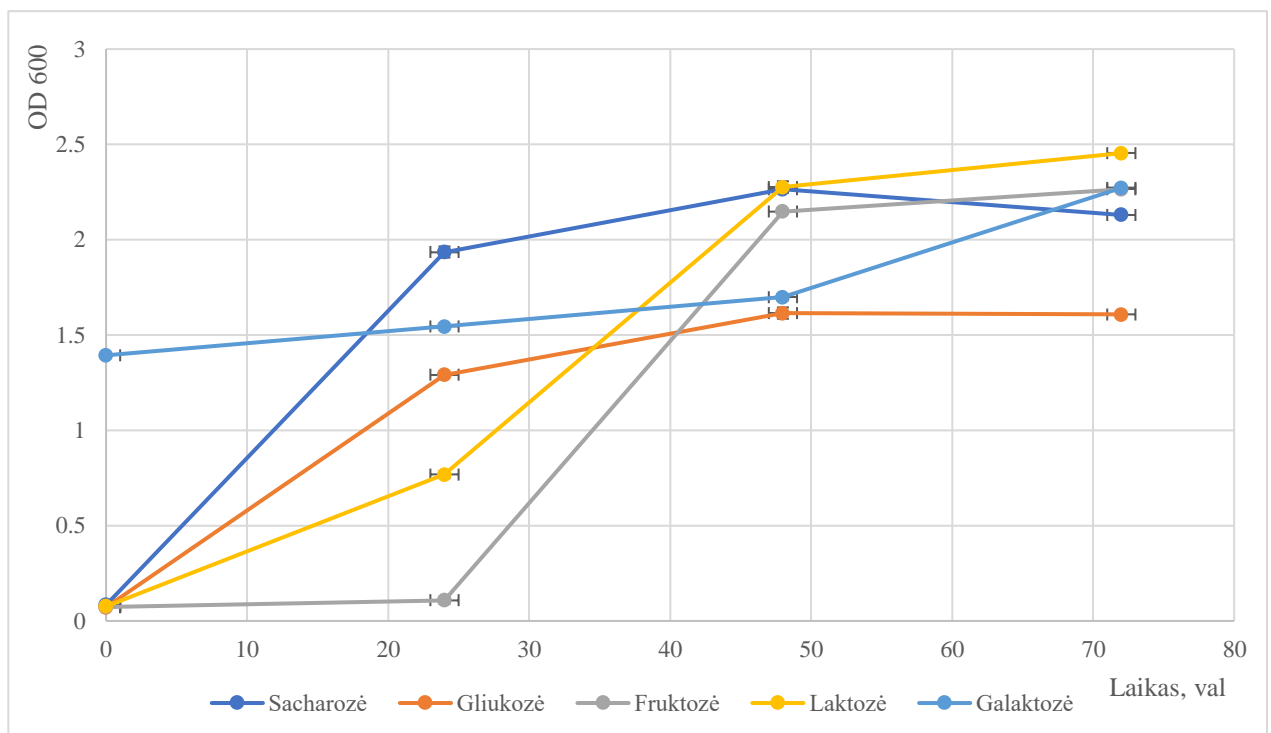
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Fermentacijos proceso įvertinimas

Ksantano biotechnologinė gamyba naudojant *Xanthomonas campestris* bakterijas reikalauja didelio dėmesio detalėms, jog procesas sėkmingai vyktų ir būtų gaunamas didesnės išeigos galutinis produktas. Šis procesas reikalauja optimalios temperatūros, pH ir didelę maistinę vertę turinčio substrato.

Tyrimo metu buvo įvertintas fermentacijos proceso efektyvumas pagal fermentuojamų mėginių šviesos sugertį. Paruoštos terpės su atitinkamais anglies šaltiniais ir inokuliatu išmatuotos 600 nm bangos ilgyje pradžioje ir po 24 val, 48 val bei 72 val fermentacijos. Bendrai visų bandymų metu vertinta 20 skirtingų terpių. Iš jų 7 jau yra naudojamos pramoninėje gamyboje arba intensyviai tiriamos. Kita dalis terpių (iš viso 13) buvo mažiau tyrinėtoms ir didžioji dalis jų yra antrinės žaliavos, todėl jos bendrai vadinamos alternatyviais anglies šaltiniais.

Fermentacijos proceso efektyvumas vertinamas pagal šviesos sugerties pokyčius ir pagal skirtingą laiko trukmę. Jeigu mėginio šviesos sugertis didėja, laikoma, jog procesas vyksta, sunaudojamos terpėje esančios maistinės medžiagos ir *Xanthomonas campestris* bakterijos išskiria ksantaną.



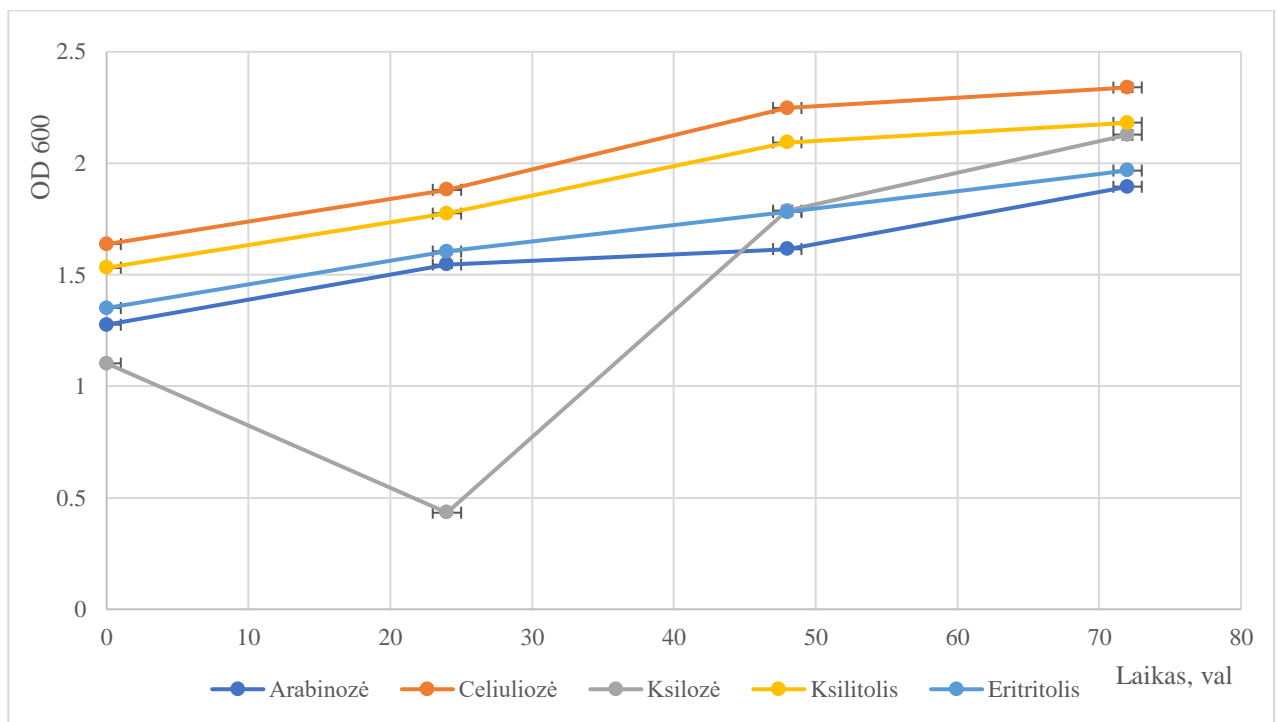
3.1 pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimo įvertinimas terpėse su sacharozės, gliukozės, fruktozės, laktozės ir galaktozės anglies šaltiniais

Vertinant tyrimo rezultatus, galime palyginti 3.1 pav. pavaizduotų anglies šaltinių sugerties rezultatus ir nustatyti fermentacijos proceso efektyvumą esant skirtingai laiko trukmei. Visuose 5 mėginiuose, kuriuose buvo augintos *Xanthomonas campestris* bakterijos su skirtingais anglies šaltiniais buvo nustatytas šviesos sugerties didėjimas po 24 val ir 48 val fermentacijos, lyginant su pradiniais šviesos sugerties rezultatais.

Terpėse su gliukoze ir sacharoze buvo fiksuojamas šviesos sugerties padidėjimas iki 48 val fermentacijos. Didžiausias pokytis buvo pastebėtas po 24 val Procesui vykstant 72 val šviesos sugertis sumažėjo. Todėl naudojant šiuos anglies šaltinius fermentacijos trukmė turėtų būti iki 48 val, proceso ekonomiškamui ir efektyvumui užtikrinti.

Mėginiuose su fruktoze ir laktoze šviesos sugertis didėjo visos fermentacijos metu. Didžiausias pokytis buvo gautas po 48 val fermentacijos, lyginant su pradine šviesos sugertimi. Procesui vykstant 24 val ir 72 val nebuvo pastebėti dideli pokyčiai, lyginant su praėjusiais laiko momentais. Siekiant užtikrinti didžiausią ekonomišumą ir našumą naudojant šiuos anglies šaltinius, reikėtų pasirinkti 48 val fermentaciją.

Terpėje su galaktoze šviesos sugertis didėjo visos fermentacijos metu, tačiau pokytis buvo mažiausias, lyginant su kitais anglies šaltiniais. Didžiausias pokytis buvo gautas po 72 val fermentacijos, lyginant su pradine sugertimi. Pagal gautus rezultatus galime spręsti, jog šis substratas bus mažiausiai ekonomiškas dėl ilgos fermentacijos trukmės bei mažo šviesos sugerties pokyčio, kuris leidžia spręsti apie mažesnę proceso intensyvumą.

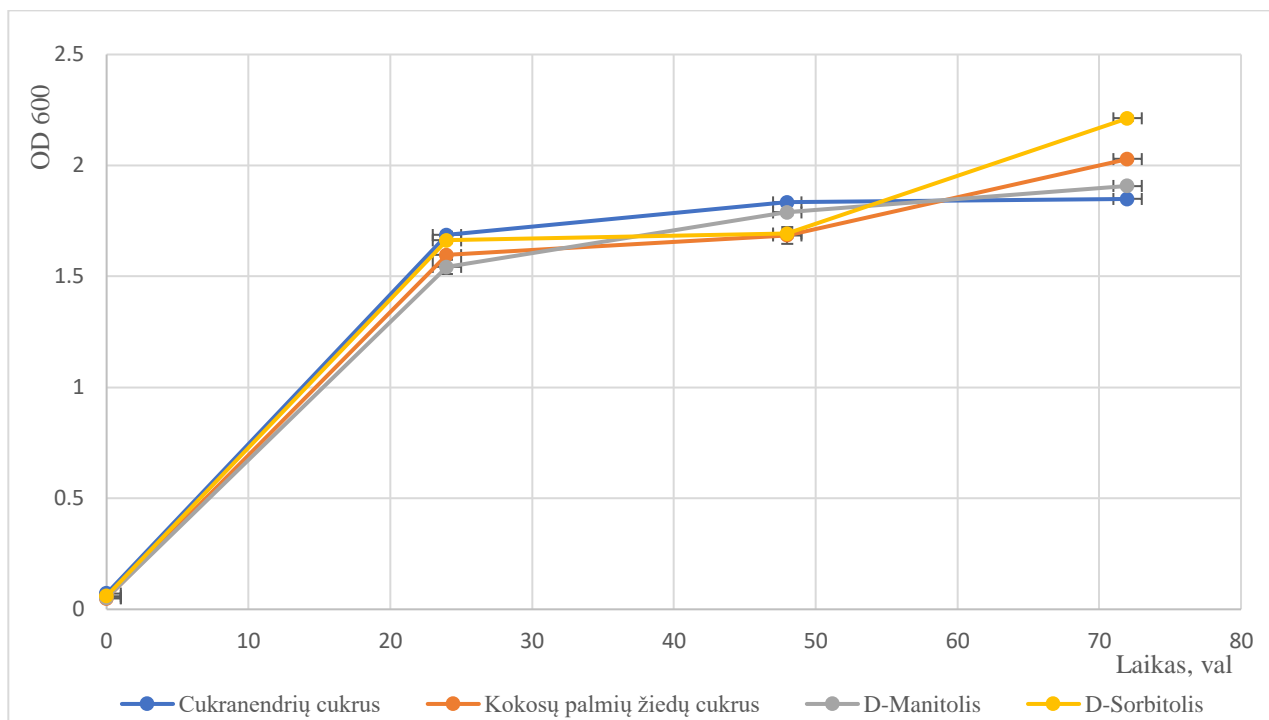


3.2 pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimo įvertinimas terpėse su arabinozės, celiuliozės, ksilozės, ksilitolio ir eritritolio anglies šaltiniais

Tyrimų rezultatai (3.2 pav.) vaizduoja kitus 5 anglies šaltinius, kurie buvo panaudoti ksantanui pagaminti. Arabinozės, celiuliozės, ksilitolio ir eritritolio terpėse rezultatai buvo panašūs ir palaipsniui didėjo visais laiko momentais. Ksilozės terpėje stebimas staigus sugerties sumažėjimas po 24 val fermentacijos.

Pagal celiuliozės ir ksilitolio kreives matome didžiausią šviesos sugerties pokytį po 48 val fermentacijos. Bakterijos, augusios arabinozės ir eritritolio terpėse didžiausią pokytį turėjo nuo fermentacijos pradžios iki 24 val, o ksilozės terpėse augusių bakterijų šviesos sugertis kito didžiausiai, lyginant su pradiniais šviesos sugerties rezultatais ir reikšmingiausias pokytis įvyko po 48 val fermentacijos. Bakterijos,

augusios ksilozės terpėje skirtingai nuo visų kitų 4 terpių turėjo didelį šviesos sugerties sumažėjimą po 24 val fermentacijos. *Xanthomonas campestris* bakterijos, augusios šiose 5 terpėse neparodė reikšmingo sugerties pokyčio po 72 val fermentacijos.



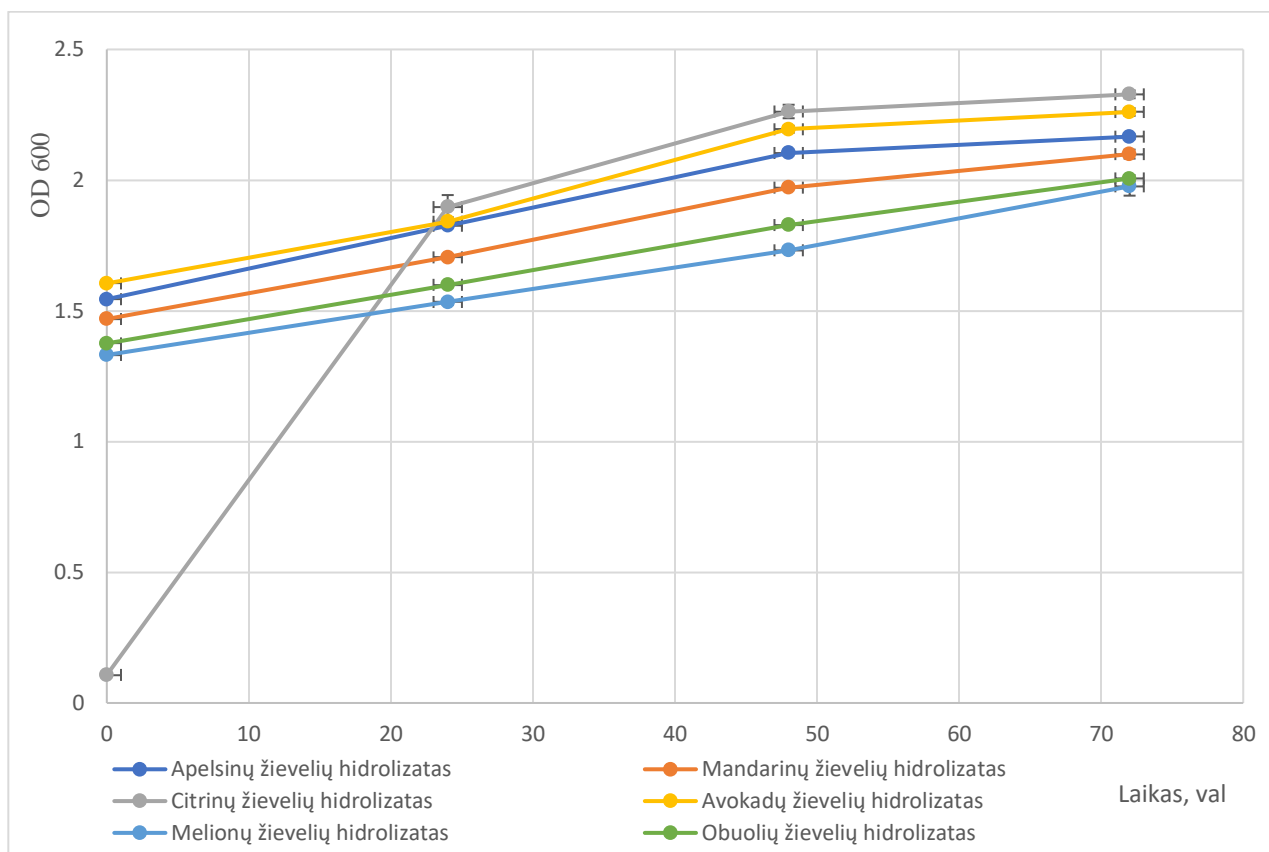
3.3 pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimo įvertinimas terpėse su cukranendrių ir kokosų palmių žiedų, D-manitolio, D-sorbitolio anglies šaltiniais

Grafike (3.3 pav.) yra vaizduojamos 4 alternatyvių anglies šaltinių terpės, kuriose buvo augintos *Xanthomonas campestris* bakterijos. Bakterijų augimas visose 4 terpėse turėjo tokią pačią tendenciją, tačiau šviesos sugertis intensyviausiai keitėsi po 24 val bakterinės fermentacijos.

Didžiausiais pokyčiais išsiskyrė bakterijos, kurios buvo inokuliuotos D-sorbitolio terpėje. Po 24 val fermentacijos šviesos sugertis pasikeitė intensyviausiai ir taip pat šviesos sugerties padidėjimas buvo užfiksuotas po 72 val. Tačiau nuo 24 val iki 48 val fermentacijos terpės šviesos sugertis beveik nepakito. Siekiant optimizuoti fermentacijos procesą su D-sorbitolio substratu, vertėtų rinktis trumpesnę fermentacijos trukmę.

Nustatyta, kad bakterijų, augusių kokosų palmių žiedų cukraus ir D-manitolio terpėse, bandiniuose šviesos sugertis didėjo visais laiko momentais. Kaip ir kituose mėginiuose intensyviausi pokyčiai pastebėti po 24 val fermentacijos. Kitais laiko momentais šviesos sugertis nekito arba nereikšmingai kilo.

Cukranendrių cukraus terpėje šviesos sugerties padidėjimas buvo fiksuojamas iki 48 val fermentacijos. Intensyviausias pokytis – po 24 val. Vykdamas tolimesnę fermentaciją ir išmatavus rezultatus po 72 val buvo pastebėtas šviesos sugerties sumažėjimas. Renkantis šį substratą, kaip ir kokosų palmių žiedų cukraus, D-manitolio bei D-sorbitolio substratus, reikėtų rinktis trumpiausią fermentacijos trukmę.



3.4 pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimo įvertinimas terpėse su apelsinų, mandarinų, citrinų, avokadų, melionų ir obuolių žievelių hidrolizatų anglies šaltiniais.

Anglies šaltinių, iš 6 alternatyvių atliekų t.y. žievelių hidrolizatų, rezultatai pavaizduoti 3.4 pav. Apelsinų, mandarinų, avokadų, melionų bei obuolių žievelių hidrolizatai pasižymėjo panašiu šviesos sugerties kitimu ir laipsnišku rezultatų didėjimu skirtingais laiko momentais. Citrinų žievelių hidrolizato terpė turėjo reikšmingiausią šviesos sugerties pokytį, lyginant su kitomis alternatyviomis terpėmis.

Apelsinų, mandarinų, avokadų, melionų ir obuolių žievelių terpėse augančios bakterijos didžiausius šviesos sugerties pokyčius parodė po 48 val fermentacijos. Tačiau šie pokyčiai nebuvo labai ryškūs lyginant su praeituose grafikuose aptartais substratais. Citrinų žievelių terpėje augusių bakterijų matomas labai intensyvus pokytis po 24 val

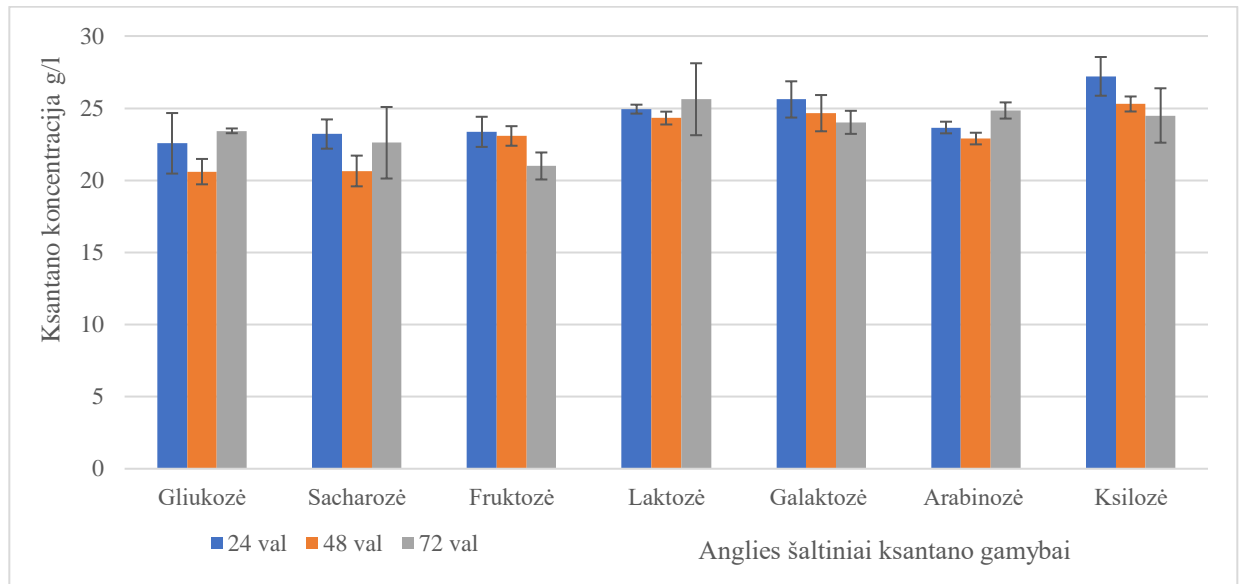
Gauti rezultatai parodė, jog visose tirtose terpėse vyko fermentacija ir anglies šaltiniai buvo naudojami kaip maistinė medžiaga *Xanthomonas campestris* bakterijoms. Didžiausi šviesos sugerties pokyčiai užfiksuoti naudojant gliukozės ir sacharozės anglies šaltinius, kadangi jie yra vieni iš pagrindinių substratų komercinėje ksantano gamyboje. Visose terpėse, išskyrus galaktozę, geriausi rodikliai gauti vykdant 24 val arba 48 val fermentaciją. Nei vienas iš substratų neišsiskyrė didele šviesos sugertimi po 72 val fermentacijos.

3.2. Ksantano koncentracijos įvertinimas

Ksantano biotechnologinei gamybai optimizuoti vienas iš svarbiausių rodiklių yra išsiskyrusio bioproducto koncentracija. Keičiant ksantano gamybos sąlygas ir vertinant išsiskyrusio ksantano

koncentraciją, galime nustatyti, kurios sąlygos yra optimalios. Tai gali būti vykdoma vertinant skirtingus anglies šaltinius bei tirpiklius, įvairias bakterijas ir jų padermes bei kitus kintamuosius.

Šio tyrimo metu buvo vertinama išsiskyrusio ksantano koncentracija po 24 val, 48 val ir 72 val naudojant skirtingų anglies šaltinių terpes. Vėliau iš fermentacinės terpės nuo biomasės atskirtas ksantanas buvo išskirtas izopropanoliu.



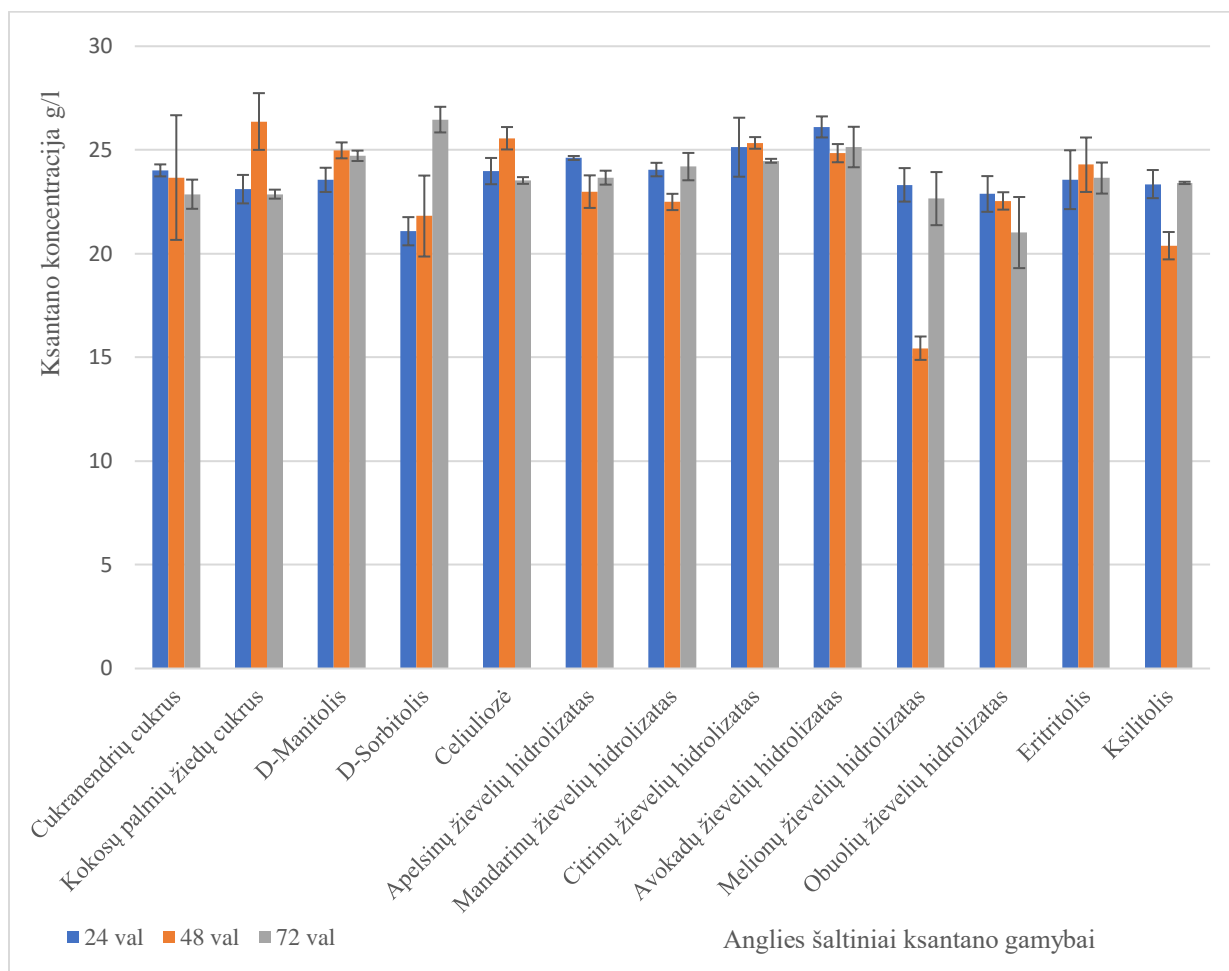
3.5 pav. Ksantano koncentracija (g/l) po 24 val, 48 val ir 72 val gliukozės, sacharozės, fruktozės, laktozės, galaktozės, arabinozės ir ksilozės terpėse

Gauti rezultatai parodė (3.5 pav.), jog didžiausia ksantano koncentracija buvo gauta, naudojant ksilozę po 24 val fermentacijos (27,20 g/l). Ilgesnė fermentacijos trukmė teigiamo poveikio išskirtai ksantano koncentracijai neturėjo.

Laktozės terpėje didžiausia ksantano koncentracija nustatyta po 72 val fermentacijos (25,63 g/l). Tačiau lyginant su koncentracija po 24 val (24,93 g/l) ir 48 val (24,31 g/l) padidėjimas nėra didelis, o ilgesnė fermentacija padidina kaštus. Galaktozės terpėje didžiausia ksantano išeiga buvo po 24 val (24,017 g/l). Lyginant su kitais tyrimais [58] laktozės turintys substratai dažnai nepasižymi didele išeiga dėl *Xanthomonas campestris* esančios beta-galaktozidazės, kuri slopina ksantano išskyrimą terpėse su vieninteliu laktozės šaltiniu.

Komercijoje naudojamuose gliukozės ir sacharozės substratuose, bakterijos tyrimo metu nepasižymėjo išskirtinai didesne ksantano išeiga. Naudojant gliukozę, didžiausia koncentracija buvo gauta po 72 val (23,43 g/l), o sacharozę – po 24 val (23,21 g/l) fermentacijos.

Fruktozės ir arabinozės terpės, kurios buvo naudotos *Xanthomonas campestris* bakterijoms auginti, pasižymėjo mažiausiomis išskirtos ksantano koncentracijomis iš ištirtų terpių. Atitinkamai didžiausia ksantano išeiga iš fruktozės terpės buvo po 24 val (23,36 g/l), o arabinozės po 72 val (23,66 g/l) fermentacijos.



3.6 pav. Ksantano koncentracija (g/l) po 24 val, 48 val ir 72 val cukranendrių cukraus, kokosų palmių žiedų cukraus, D-manitolio, D-sorbitolio, apelsinų, mandarinų, citrinų, avokadų, melionų, obuolių žievelių hidrolizatu, eritritolio bei ksilitolio terpėse

Didžiausia ksantano koncentracija buvo gauta iš bakterijų, augusių kokosų palmių žiedų cukraus terpėje, po 48 val fermentacijos (26,37 g/l). Kiekybiškai kitais fermentavimo laikais gautos išėigos neišsiskyrė nuo kitų alternatyvių anglies šaltinių. D-sorbitolio terpėje po 24 val ir 48 val buvo gautos labai mažos išėigos, tačiau padidėjimas buvo po 72 val fermentacijos gavus 26,46 g/l ksantano. Kai *Xanthomonas campestris* bakterijos, buvo augintos terpėje su avokadų žievelių hidrolizatu buvo gauta didžiausia koncentracija per trumpiausią fermentacijos 24 val laikotarpį (26,11 g/l). Atsižvelgus į didžiausias išėigas turinčius, kokosų palmių žiedų cukraus, D-sorbitolio bei avokadų žievelių hidrolizatu, alternatyvius anglies šaltinius svarbu įvertinti ir fermentacijos trukmę. Nors D-sorbitolio terpėje ir buvo išgauta didelė ksantano koncentracija, tačiau tai įvyko tik po 72 val fermentacijos ir tai būtų neekonomiška, lyginant su kitais substratais, kurie išskiria panašius kiekius per trumpesnę laiką.

Taip pat didelės išėigos buvo gautos naudojant celiuliozė bei citrinų žievelių hidrolizatu. Celiuliozės terpėje didžiausia koncentracija buvo gauta po 48 val fermentacijos (25,56 g/l). Citrinų žievelių hidrolizato terpėje didelės išėigos buvo fiksuojamos tiek po 24 val (25,132 g/l), tiek po 48 val (25,339 g/l) fermentacijos.

Mažiausios išeigos gautos melionų ir obuolių žievių hidrolizatu, eritritolio bei ksilitolio terpėse. Nepriklausomai nuo fermentacijos laiko, nei vienas iš rezultatų neparodė reikšmingos ksantano išeigos, lyginant su kitais alternatyviais anglies šaltiniais.

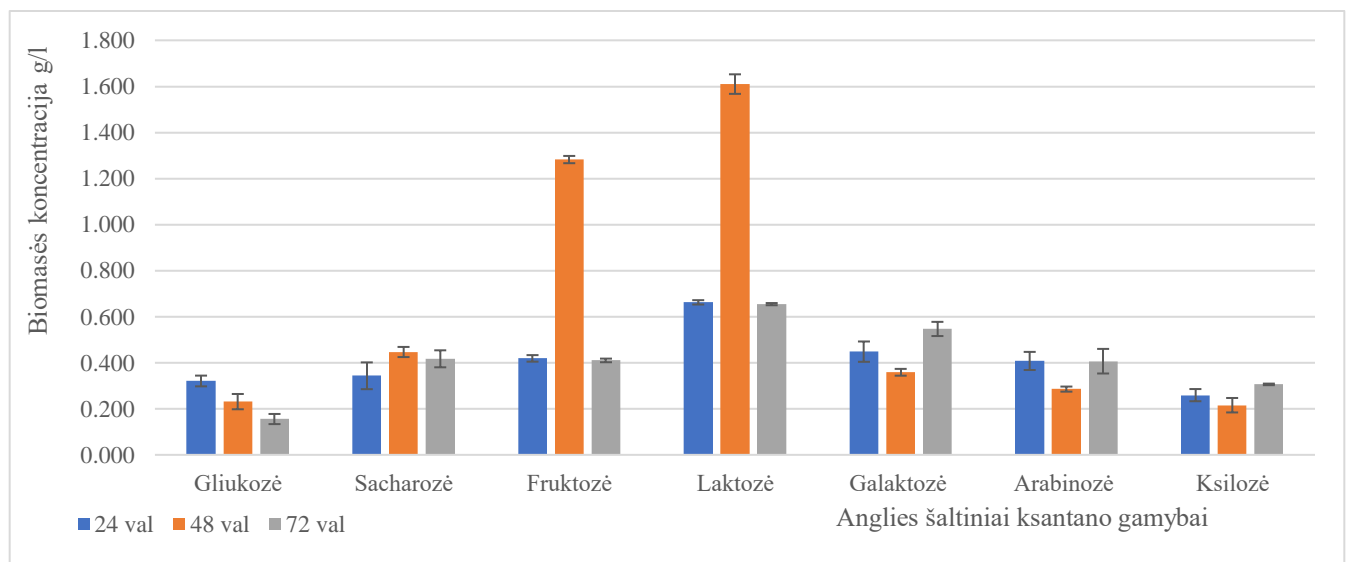
Vertinant gautus rezultatus iš skirtingų anglies šaltinių, didžiausia ksantano išeiga buvo, kai *Xanthomonas campestris* bakterijos buvo auginamos terpėse su ksiloze po 24 val, su kokosų palmių žiedų cukrumi po 48 val, avokadų žievių hidrolizatu po 24 val fermentacijos. Taip pat dideles ksantano išeigas turėjusios terpės su D-sorbitoliu ir laktoze yra neekonomiškos dėl ilgo 72 val fermentacijos laiko.

Lyginant literatūroje aprašytus tyrimus ir jų metu gautas koncentracijas su šiuo tyrimu, buvo pastebėta, jog literatūroje aprašytos koncentracijos naudojant tuos pačius anglies šaltinius yra mažesnės. Gliukozės terpėje, auginamų bakterijų, išskirto ksantano koncentracija literatūros šaltiniuose gali svyruoti nuo 14 iki 18 g/L priklausomai nuo proceso sąlygų ir bakterijų padermės [59]. Šiame darbe tyrimu metu naudojant gliukozę kaip anglies šaltinį buvo gauta 23,43 g/l koncentracija, kuri gauta didesnė negu aprašoma šaltiniuose. Kiti anglies šaltiniai taip pat pasižymėjo išskiriamomis didesnėmis ksantano koncentracijomis lyginant su literatūroje pateiktais duomenimis.

3.3. Biomasės koncentracijos įvertinimas

Tyrimai parodė, jog biomasės gamyba yra panaši į ksantano gamybą, o tai leidžia spręsti apie šio polisacharido išeigos sąsają su biomasės koncentracija. Dėl šios priežasties yra žinoma, kad ksantano gamybos procesas su didele biomasės koncentracija, užtikrins ir dideles ksantano išeigas [60].

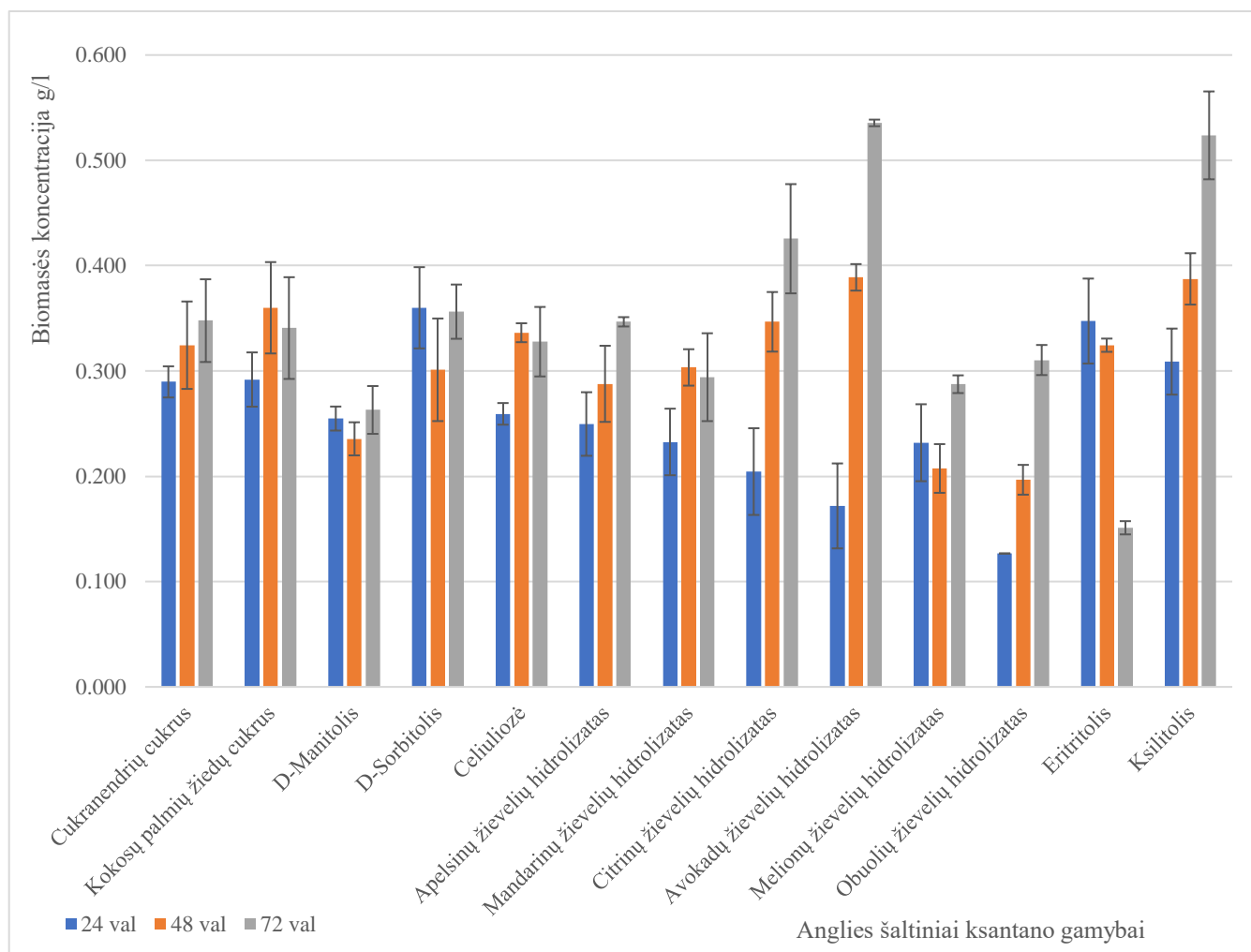
Siekiant rasti optimalius anglies šaltinius ksantanui pagaminti ir įvertinti ksantano priklausomybę nuo biomasės koncentracijos buvo tirta fermentacijos terpėje likusi biomasė. Nucentrifugavus mėginius po 24 val, 48 val ir 72 val fermentacijos, likusios nuosėdos buvo džiovintos ($T = 45^{\circ}\text{C}$) ir pasvertos palyginti išskirtos biomasės koncentraciją.



3.7 pav. Biomasės koncentracija (g/l) 24 val, 48 val ir 72 val laiko momentais gliukozės, sacharozės, fruktozės, laktozės, galaktozės, arabinozės ir ksilozės terpėse

Iš gautų rezultatų matyti (3.7 pav.), jog didžiausia biomasės koncentracija buvo gauta terpėje su fruktoze (1,28 g/l) ir laktoze (1,61 g/l) po 48 val fermentacijos. Lyginant šių anglies šaltinių rezultatus po 24 val

ir po 72 val išskirtos biomasės koncentracijos buvo daugiau nei per pus mažesnės. Tuo tarpu mažiausiomis biomasės koncentracijomis pasižymėjo terpės su ksiloze ir gliukoze, kurių vertės atitinkamai kito nuo 0,216 g/l iki 0,306 g/l ir nuo 0,156 g/l iki 0,321 g/l. Sacharozės, galaktozės ir arabinozės anglies šaltinių terpėse augusios *Xanthomonas campestris* bakterijos nepasižymėjo didele biomasės koncentracija, kuri kito nuo 0,29 g/l iki 0,55 g/l.



3.8 pav. Biomasės koncentracija (g/l) po 24 val, 48 val ir 72 val fermentacijos cukranendrių cukraus, kokosų palmių žiedų cukraus, D-manitolio, D-sorbitolio, apelsinų, mandarinų, citrinų, avokadų, melionų, obuolių žievelių hidrolizatų, eritritolio bei ksilitolio terpėse

Vertinant gautus rezultatus galime matyti (3.8 pav.), jog 8 iš 13 alternatyvių anglies šaltinių terpių auginamas ksantanas išskyrė didelę biomasės koncentraciją tik po 72 val fermentacijos. Palyginus, didelė biomasės koncentracija buvo išskirta terpėse su: avokadų žievelių hidrolizatu (0,536 g/l), ksilitoliu (0,524 g/l), citrinos žievelių hidrolizatu (0,426 g/l). Mažiausios biomasės koncentracijos buvo gautos iš, melionų ir obuolių žievelių hidrolizatų terpių, kuriose koncentracijos kito atitinkamai nuo 0,236 g/l iki 0,263 g/l, nuo 0,207 g/l iki 0,287 g/l ir nuo 0,127 g/l iki 0,310 g/l. Terpė su eritritoliu išskirtinai pasižymėjo mažiausia biomasės koncentracija po 72 val fermentacijos (0,151 g/l). Likusios neįvardintos terpės nepasižymėjo išskirtinai didele ar maža biomasės koncentracija.

Vertinant visų anglies šaltinių terpėse bakterijų išskirtas biomasės koncentracijas, didžiausios jos buvo gautos laktozės, fruktozės, citrinų ir avokadų žievelių hidrolizatų, ksilitolio terpėse. Biomasės

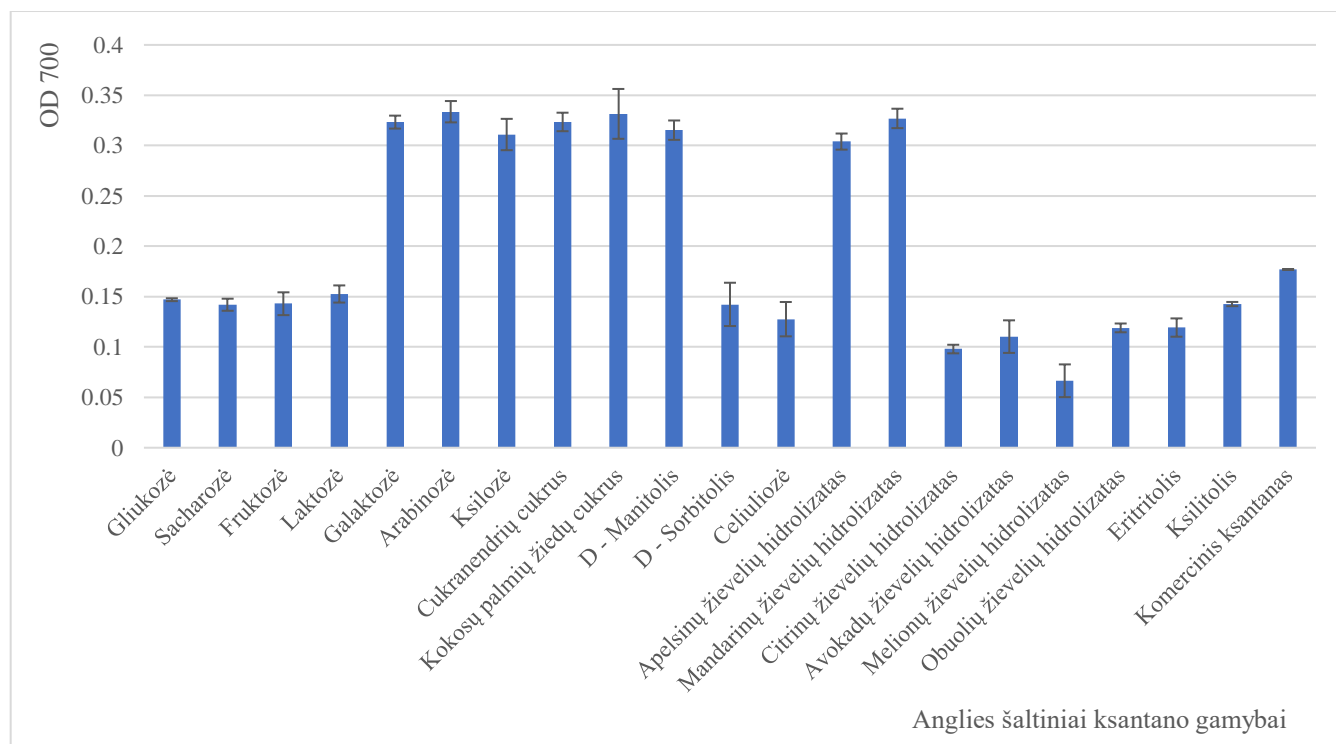
koncentracijas, lyginant su ksantano koncentracijomis tiek laktozės, tiek avokadų ir citrinų žievelių hidrolizatų mėginiai turėjo abiejų produktų dideles koncentracijas. Taip pat melionų ir obuolių žievelių hidrolizatų bei eritritolio terpėse augusios *Xanthomonas campestris* bakterijos atitiko teoriją, jog esant didelėms biomasės koncentracijoms bus gauta didelė ksantano koncentracija ir atvirkščiai. Palyginus rezultatus po fermentacijos buvo išskirti tiek ksantano, tiek biomasės labai maži kiekiai. Tačiau ksilozė, eritritolis ir ksilitolis neatitiko šio principo. Ksilozės terpėje augusių bakterijų buvo išskirta nemažai ksantano, tačiau iš šios terpės išskirta biomasės koncentracija buvo viena iš mažiausių. Atvirkštinė situacija buvo stebima, kai bakterijos augo terpėse su eritritoliu, ksilitoliu, iš kurių terpių buvo gauta nemaža biomasės koncentracija, tačiau pagaminto ksantano koncentracijos buvo vienos iš mažiausių.

3.4. Redukcinių savybių įvertinimas

3.4.1. Ksantano redukcinių savybių įvertinimas

Komercinis ksantanas įprastai nepasižymi didelėmis redukcinėmis savybėmis. Šio tyrimo metu buvo siekiama nustatyti ar naudojant skirtingus ir alternatyvius anglies šaltinius įmanoma pakeisti ksantano redukcinės savybes, kurios leistų padidinti ksantano panaudojimą. Didesnis pritaikomumas išaugintų dar didesnę paklausą ir taip sukurtų aukštesnę ksantano pridėtinę vertę.

Tyrimas buvo atliekamas matuojant paruoštų mėginių šviesos sugertį 700 nm bangos ilgyje. Gauti šviesos sugerties rezultatai buvo lyginami tarpusavyje pagal principą, jog kuo didesnė šviesos sugertis tuo didesnės redukcinės savybės.



3.9 pav. Ksantano, išskirto pritaikant skirtingus anglies šaltinius terpėse ir komercinio ksantano redukcinės savybės 700 nm bangos ilgyje

Gauti rezultatai rodo, jog bakterijos, augintos 8 iš 20 tirtų anglies šaltinių terpių, leidžia nustatyti didesnėmis redukcinėmis savybėmis pasižymintį ksantaną, lyginant su komerciniu. Komercinio ksantano

sugertis yra 0,18. Didesnėmis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo ksantanas išskirtas iš galaktozės (0,32 A), arabinozės (0,33 A), ksilozės (0,31 A), cukranendrių cukraus (0,32 A), kokosų palmių žiedų cukraus (0,33 A), D-manitolio (0,32 A), apelsinų žievelių hidrolizato (0,30 A) ir mandarinų žievelių hidrolizato (0,33 A) terpių.

Ksantanas išgautas, naudojant 5 iš 20 tirtų anglies šaltinių, pasižymėtų panašiomis savybėmis kaip šiuo metu pramoniniu būdu gaminamas ksantanas. Gliukozės (0,147), sacharozės (0,142), fruktozės (0,143), laktozės (0,153) ir ksilitolio (0,143) anglies šaltinių terpėse išskirtas bioproduktas pasižymėjo artimų verčių redukcinėmis savybėmis, kaip ir komercinis ksantanas.

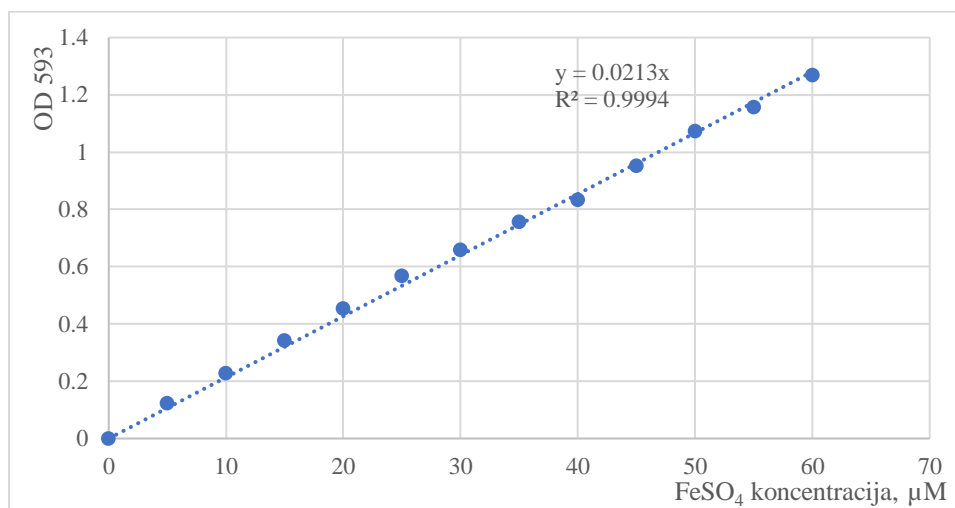
Likę 7 anglies šaltiniai ksantano redukcines savybes sumažino dar labiau negu jomis pasižymėjo komercinis ksantanas. D-sorbitolio (0,124), celiuliozės (0,124), citrinų žievelių hidrolizato (0,098), avokadų žievelių hidrolizato (0,110), melionų žievelių hidrolizato (0,067), obuolių žievelių hidrolizato (0,119) ir eritritolio (0,119) anglies šaltinių terpėse išskirtas produktas turėjo mažesnes vertes, palyginus su komerciniu ksantanu.

Remiantis atliktu tyrimu 8 terpėse auginamos *Xanthomonas campestris* bakterijos leistų padidinti ksantano pritaikomumą ir sukurti aukštesnę pridėtinę vertę. Tačiau svarbu yra, jog naudojamas anglies šaltinis taip pat leistų išskirti ir optimalią ksantano koncentraciją. Palyginus abu veiksnius yra potencialūs keli anglies šaltiniai: ksilozė, kokosų palmių žiedų cukrus ir D-manitolis. Kokosų palmių žiedų cukrus ir D-manitolis yra alternatyvūs anglies šaltiniai, kurie yra pigesni ir ne tik sukurtų aukštesnę pridėtinę vertę dėl stipresnių redukcinių savybių, bet ir patį gamybos procesą padarytų ekonomiškiau.

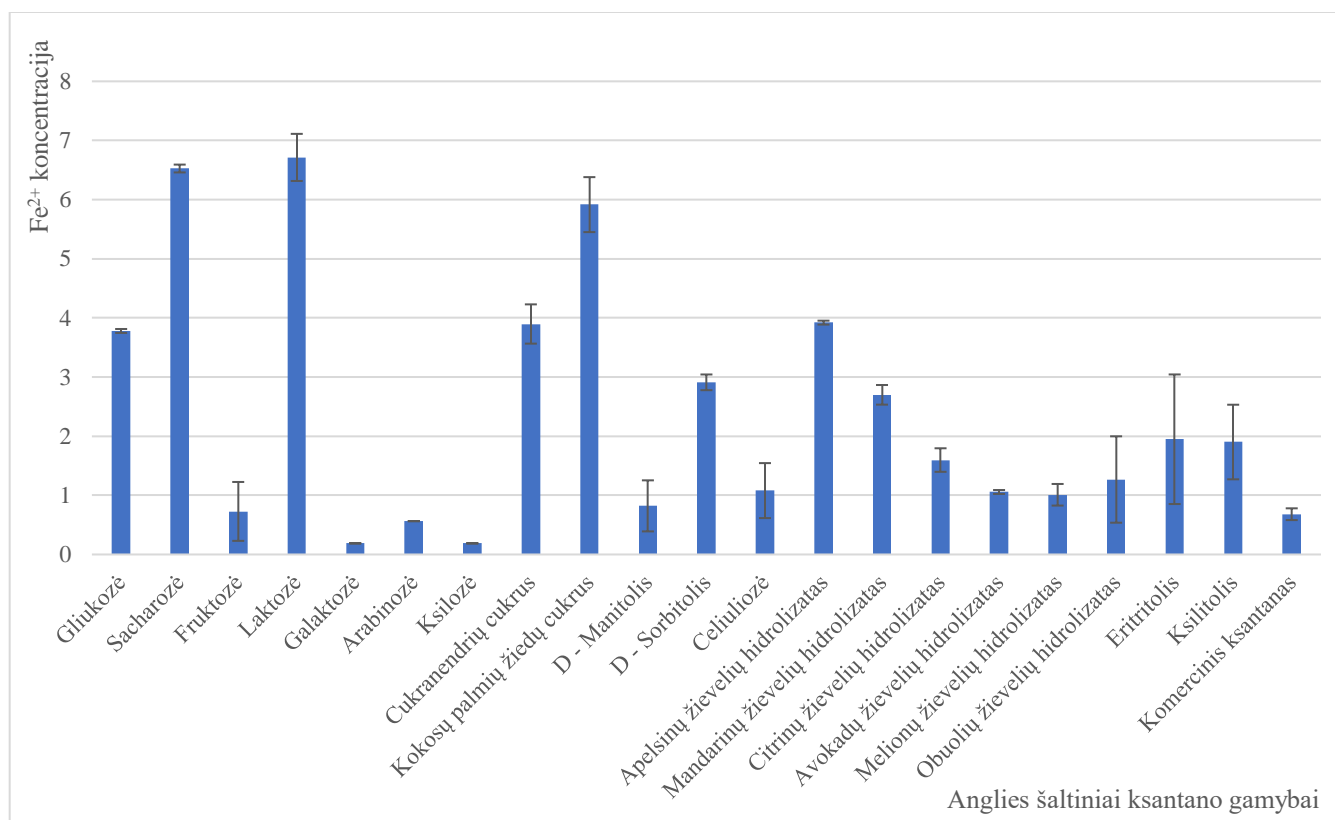
3.4.2. Reducinių savybių įvertinimas FRAP metodu

Ksantano redukcinių savybių nustatymas yra svarbus norint jį plačiau pritaikyti sveikatos srityje, maistui konservuoti ir kt. Reducinėmis savybėmis pasižymintis ksantanas gali būti kaip antioksidantas ir neutralizuoti laisvuosius radikalus bei sumažinti oksidacinį stresą. Naudojant sveikatos srityje galėtų papildomai apsaugoti nuo oksidacinių pažeidimų, kurie skatina vėžinius, kraujagyslių bei lėtinius susirgimus. Taip pat minėtame maisto konservavime redukcinėmis savybėmis pasižymintis ksantanas padėtų išvengti produktų oksidacijos, kuri sukelia nepageidaujamą skonį.

Šio tyrimo metu buvo vertinamos redukcinės savybės ksantano, gauto iš skirtingų anglies šaltinių, lyginant su komerciniu ksantanu. FRAP metodas paremtas Fe^{3+} virsmu į Fe^{2+} (melsva spalva) 593 nm bangos ilgyje. Ksantano redukcinės savybės vertinamos pagal $FeSO_4$ koncentraciją, kuri nustatoma išmatavus šviesos sugertį ir koncentraciją apskaičiavus pagal kalibracinę kreivę. Gautos $FeSO_4$ koncentracijos lyginamos tarpusavyje pagal principą, jog kuo didesnė $FeSO_4$ koncentracija tuo didesnės redukcinės savybės.



3.10 pav. Kalibracinė kreivė su skirtingais FeSO₄ x 7H₂O kiekiais redukciniams savybėms nustatyti FRAP metodu



3.11 pav. Ksantano, išskirto pritaikant skirtingus anglies šaltinius ir komercinio ksantano redukcinės savybės pagal Fe²⁺ koncentraciją

Gauti rezultatai parodė (3.11 pav.), jog 17 iš 20 tirtų anglies šaltinių leidžia bakterijoms išskirti didesnėmis redukcinėmis savybėmis pasižymintį ksantaną už komercinį. Didžiausios redukcinės savybės pagal FRAP metodą, buvo nustatytos sacharozės (6,526 μmol/l), laktozės (6,714 μmol/l) ir kokosų palmių žiedų cukraus (5,915 μmol/l) terpėse išskirtam ksantanui.

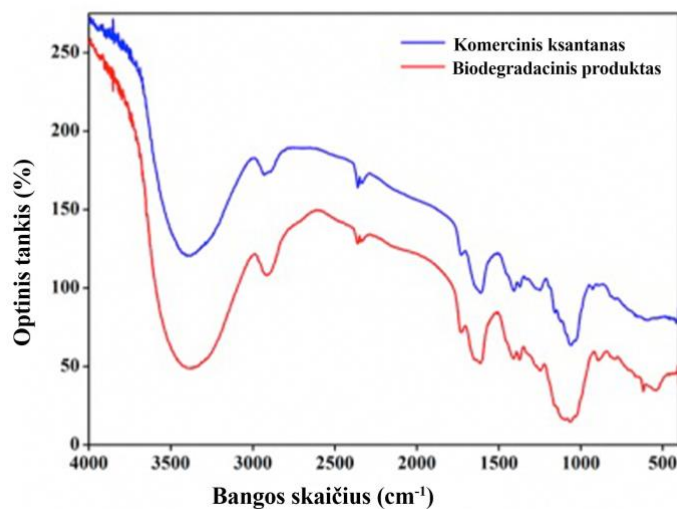
Mažesnėmis redukcinėmis savybėmis pasižymintis ksantanas už komercinį buvo išskirtas 3 iš 20 terpių. Mažiausios redukcinės savybės buvo nustatytos galaktozės (0,188 $\mu\text{mol/l}$), arabinozės (0,563 $\mu\text{mol/l}$) ir ksilozės terpėse (0,188 $\mu\text{mol/l}$).

Pagal atliktą tyrimą, 17 terpių leistų padidinti ksantano pritaikomumą ir sukurti aukštesnę pridėtinę vertę. Ksantanas išskirtas naudojant kokosų palmių žiedų cukrų pasižymėjo stipresnėmis redukcinėmis savybėmis abiejuose tyrimuose.

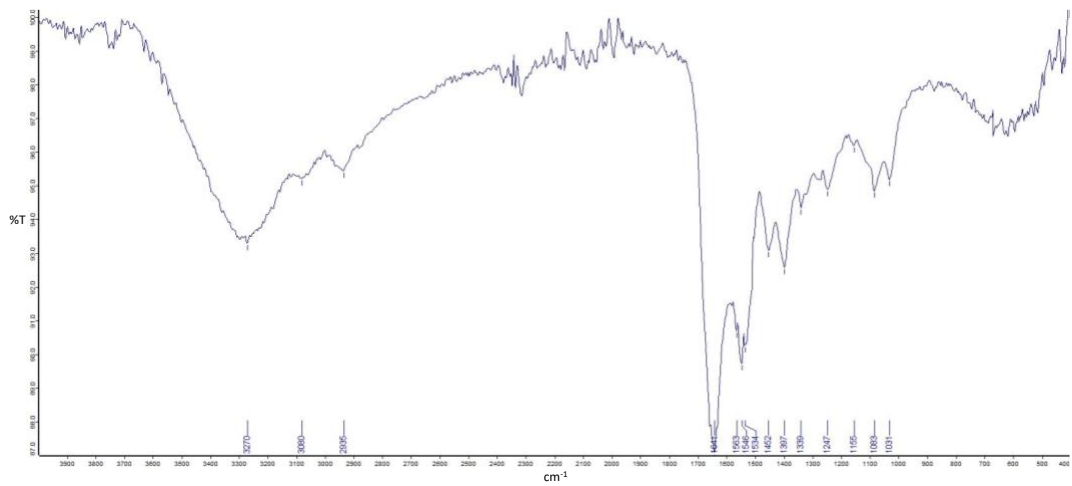
3.5. Ksantano kokybės vertinimas

Siekiant įvertinti gauto ksantano kokybę, naudojant skirtingus anglies šaltinius, Vilniaus universiteto VU Gyvybės mokslų centro, Biotechnologijos institutas, atliko Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių (FT-IR) spektroskopiją, atrinktiems mėginiams. Jos principas paremtas molekulių, kurios sugeria tik tam tikrus infraraudonosios spinduliuotės dažnius ir energiją, atominiai virpesiai [62]. Šis metodas dažnai yra naudojamas cheminių junginių analizei dėl savo tikslumo, naudojimo paprastumo ir greičio.

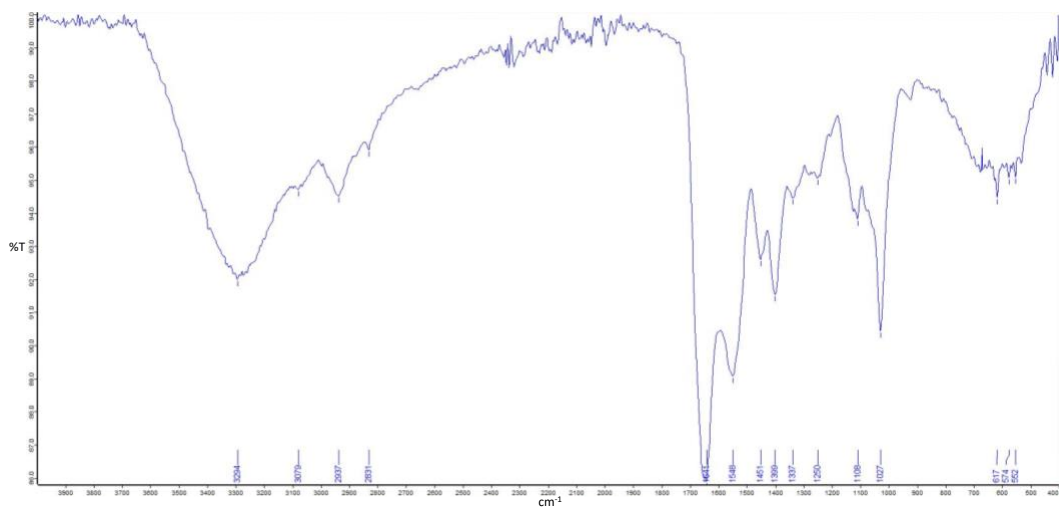
FT-IR spektroskopijos metu buvo ištirti ksantano, gauto iš gliukozės, kokosų palmių žiedų cukraus, D-sorbitolio ir avokadų žievelių hidrolizatu, mėginiai. Jie buvo pasirinkti pagal didesnes išskirtas ksantano koncentracijas, lyginant su kitais anglies šaltiniais. Ksantanas gautas naudojant gliukozę kaip anglies šaltinį buvo pasirinktas dėl jos naudojimo pramoninėje ksantano gamyboje. Jų spektrai lyginami su literatūroje pateiktu komercinio ksantano spektru [63].



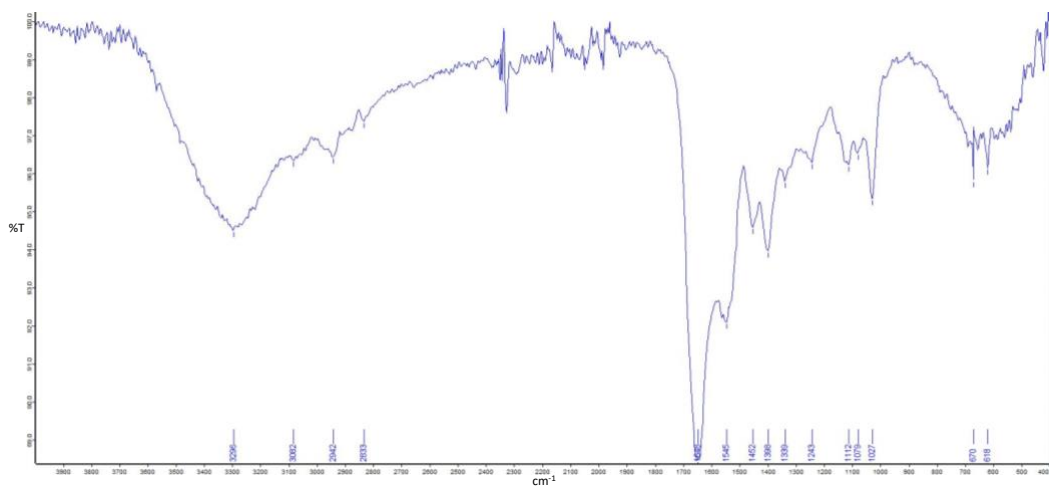
3.12 pav. Komeracinio ksantano FTIR spektras



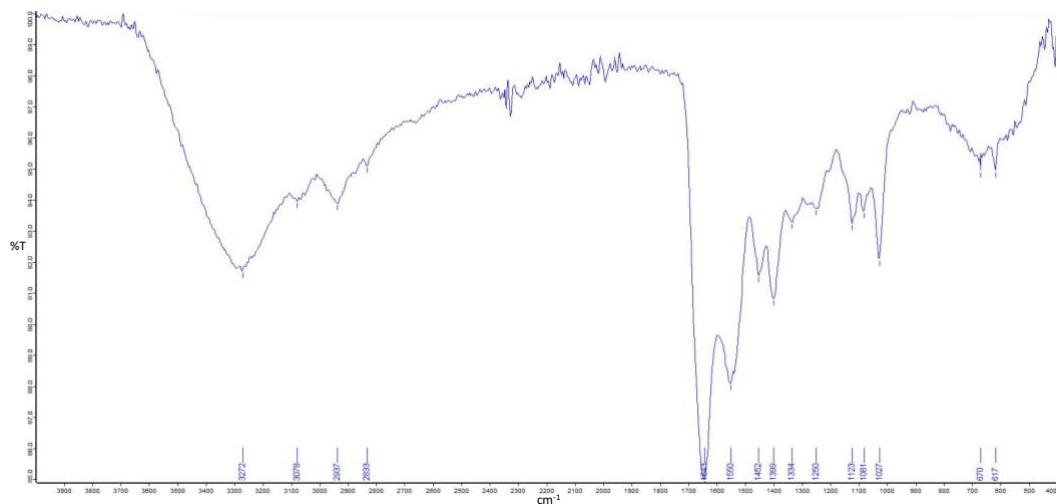
3.13 pav. Ksantano, gauto naudojant gliukozę kaip anglies šaltinį, FT-IR spektras



3.14 pav. Ksantano, gauto naudojant kokosų palmių žiedų cukrų kaip anglies šaltinį, FT-IR spektras



3.15 pav. Ksantano, gauto naudojant D-sorbitolį kaip anglies šaltinį, FT-IR spektras



3.16 pav. Ksantano, gauto naudojant avokadų žievelių hidrolizatą kaip anglies šaltinį, FT-IR spektras

Iš gautų rezultatų matome, jog komercinio ksantano FT-IR spektre yra plati juosta ties 3400 cm^{-1} . Tiriamuosiuose ksantano mėginiuose naudojant gliukozės, kokosų palmių žiedų cukraus, D-sorbitolio ir avokadų žievelių hidrolizatų terpes buvo taip pat fiksuojamos plačios juostos intervale $3270\text{ cm}^{-1} - 3296\text{ cm}^{-1}$. Ši juosta rodo junginiuose esančias hidroksilo (-OH) grupes. Trumpa juosta stebima intervale nuo 2950 iki 2800 cm^{-1} rodo alifatinių angliavandenilių (C-H) buvimą tiek komerciniame, tiek tiriamuosiuose ksantano mėginiuose. Visuose 4 tirtuose mėginiuose taip pat buvo fiksuojamos išraiškingos juostos intervale $1641\text{ cm}^{-1} - 1648\text{ cm}^{-1}$, kurios vaizduoja C=O ryšį piruvato struktūroje ir acetilo struktūroje. Juostos aplink $1100\text{ cm}^{-1} - 1000\text{ cm}^{-1}$ atitinkamai gali vaizduoti simetrinio karboksilato (-COO-) grupes arba acetalio (CO-) grupes.

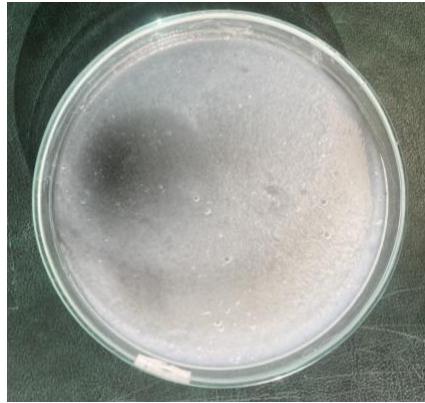
Bendrame vaizde komercinio ksantano FT-IR spektras ir ksantano, naudojant gliukozės, kokosų palmių žiedų cukraus, D-sorbitolio ir avokadų žievelių hidrolizatų anglies šaltinius, FT-IR spektrai yra labai panašūs. Tai leidžia spręsti apie kitų anglies šaltinių tinkamumą ksantano gamybai išlaikant komercinio ksantano struktūrą.

3.6. Ksantano panaudojimas

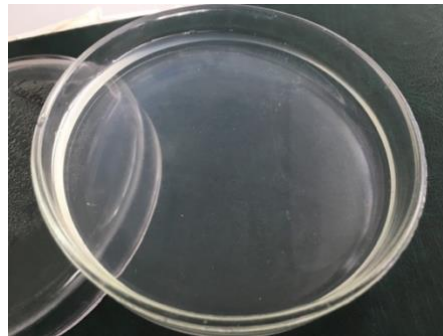
3.6.1. Ksantano ir želatinos hidrogelio plėvelės susidarymas

2021 metais Piola B. ir Sabbatini M. savo tyrimuose aprašė bandymą sukurti hidrogelį, kuris būtų tinkamas 3D biologinėms konstrukcijoms spausdinti [55]. Kuriamo hidrogelio pagrindą sudarė suderinami natūralūs polimerai – želatina ir ksantanas. Šios medžiagos buvo maišomos skirtingu procentiniu dydžiu siekiant gauti optimalų santykį.

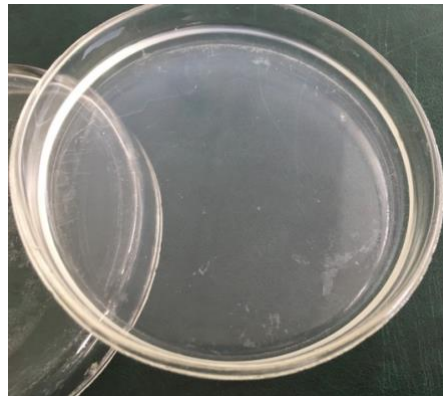
Pagal aprašytą tyrimą, buvo siekta nustatyti ar iš skirtingų anglies šaltinių terpių gautas ksantanas taip pat galėtų būti panaudotas hidrogelių gamybai. Pagal literatūrą, buvo pasirinkti 1,25 g želatinos ir 0,6 g ksantano kiekiai, kurie ištirpinus vandenyje ir sumaišius tarpusavyje suformavo klampų mišinį. Šis mišinys buvo išlietas į *Petri* lėkštelę ir paliekamas parai, jog būtų galima įvertinti plėvelės susidarymą. Kontroliniu pavyzdžiu buvo pasirinktas komercinis ksantanas. Tiriamaisiais mėginiais buvo ksantanas, gautas naudojant gliukozės ir avokadų žievelių hidrolizato anglies šaltinių terpes.



3.17 pav. Kontrolinis hidrogelio plėvelės mėginys – želatina 1,25 g ir komercinis ksantanas 0,6 g



3.18 pav. Hidrogelio plėvelės mėginys – želatina 1,25 g ir ksantanas 0,6 g, išskirtas iš gliukozės terpės



3.19 pav. Hidrogelio plėvelės mėginys – želatina 1,25 g ir ksantanas 0,6 g, išskirtas iš avokadų žievelių hidrolizatų terpės

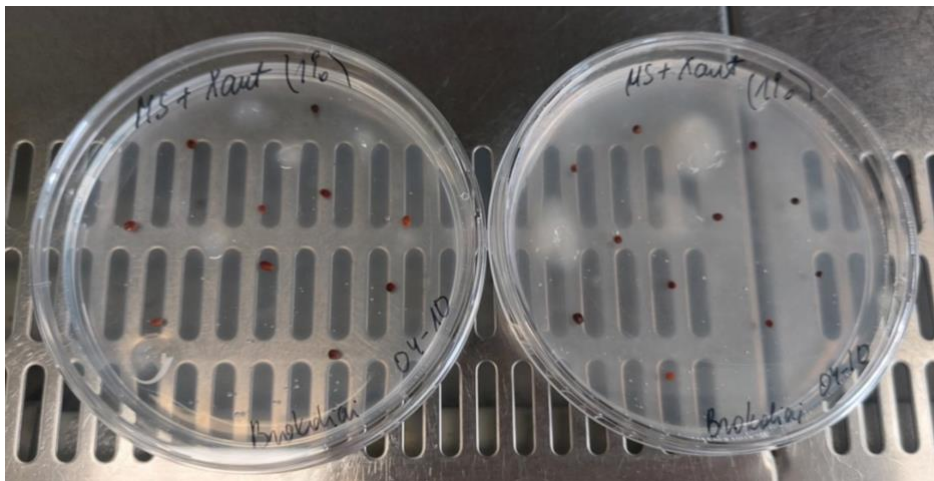
Atlikus tyrimą ir įvertinus lėkšteles buvo pastebėta, jog visose lėkštelėse hidrogelio plėvelės susiformavo. Lyginant kontrolinio komercinio ksantano ir želatinos hidrogelį su tiriamaisiais mėginiais buvo pastebėta, jog kontrolės plėvelė buvo mažiausiai skaidri. Tuo tarpu mėginiai su išskirtu ksantanu iš gliukozės ir avokadų žievelių hidrolizatų terpių buvo labai skaidrūs ir tolygūs.

Gauti rezultatai parodė, jog iš skirtingų anglies šaltinių išgauto ksantano ir želatinos hidrogeliai gali suformuoti plėveles. Tai galėtų būti tolimesnių tyrimų kryptis siekiant pritaikyti šiuos hidrogelius 3D biologiniam spausdinimui.

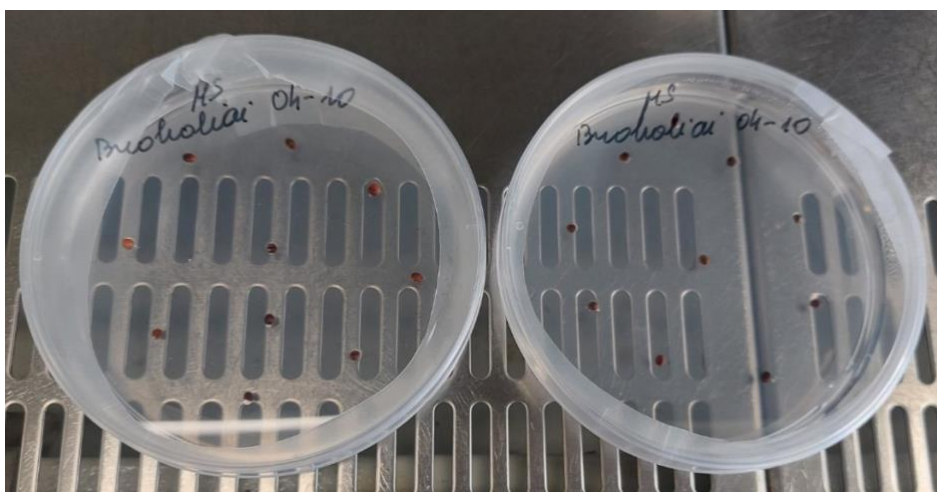
3.6.2. Ksantano kaip agaro pakaitalo įvertinimas brokolių sėkloms daiginti

2005 metais Babbar S. B. ir Jain R. aprašė tyrimą [56], kurio metu siekė pritaikyti ksantaną vietoj agaro bakterijoms ir grybams auginti mitybinėse terpėse. Šio tyrimo metu buvo gauta, jog grybų auginimas terpėje su ksantanu buvo intensyvesnis, lyginant mikroorganizmus, augintus terpėje su agaru [56].

Pagal mokslinį straipsnį, atliktas tyrimas, kurio metu buvo siekta pritaikyti ksantaną brokolių sėkloms daiginti. Buvo paruoštos 2 skirtingos terpės: MS ir agaro, MS ir ksantano. Tyrimų rezultatai palyginti vizualiai.



3.20 pav. MS ir 1% ksantano terpė su pasodintomis brokolių sėklomis



3.21 pav. MS ir 1% agaro terpė su pasodintomis brokolių sėklomis



3.22 pav. MS ir 1% ksantano terpė su sudygusiomis brokolių sėklomis



3.23 pav. MS ir 1% agarų terpė su sudygusiomis brokolių sėklomis

Pagal gautus rezultatus matome, jog MS terpėje tiek su 1% agaru, tiek su 1% ksantanu, brokolių sėklos sudygo. Lyginant terpę su agaru (3.18 pav.) ir terpę su ksantanu (3.17 pav.) galime pastebėti, jog ksantanas ne tik tinkamas agarų pakaitalas dėl sėkmingo sėklų dygimo, bet ir gauti daigai pasižymėjo vizualiai geresnėmis savybėmis. Terpėje su ksantanu daiginti brokoliai turėjo vešlesnius ir didesnius lapus.

Dėl šių priežasčių galime teigti, jog ksantanas yra tinkamas pakaitalas agarui brokolių sėklų daiginime. Šioje srityje galimi tolimesni tyrimai, bandant pritaikyti ksantaną sėklų daiginimui, gautą panaudojant skirtingus anglies šaltinius.

3.6.3. Chlorofilo A ir B bei karotinoidų koncentracijos nustatymas brokoliuose

MS terpės su ksantanu tinkamumas brokolių sėklų daiginimui papildomai buvo įvertintas nustatant chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijas bei išaugintuose daiguose. Tyrimas buvo atliktas brokoliams, kurie buvo išauginti MS ir agarų terpėje bei MS ir ksantano terpėje.

Metodas yra paremtas sugerties nustatymu spektrofotometru atitinkamuose bangos ilgiuose: 662 nm (chlorofilo *a*), 644 nm (chlorofilo *b*) ir 441 nm (karotinoidai). Pigmentų kiekis naudojantis formulėmis išreikštos mg/100 g.

Gauti rezultatai parodė, jog chlorofilo *a* koncentracija MS ir agaro terpėje daiginto brokolio (26,40 mg/100 g) yra šiek tiek aukštesnė už brokolių daigus augusius MS ir ksantano terpėje (21,08 mg/100 g). Chlorofilo *b* koncentracija taip pat buvo nustatyta didesnė MS ir agaro terpėje daiginto brokolio (10,93 mg/100 g) negu brokolių augusių MS ir ksantano terpėje (8,08 mg/100 g). Karotinoidų koncentracijos skirtumas panašus kaip ir chlorofilo. MS ir agaro terpėje auginto brokolio - 9,84 mg/100g, MS ir ksantano terpėje auginto brokolio - 7,86 mg/100g.

Taigi, iš gautų rezultatų galime spręsti, jog nors vizualiai MS ir ksantano terpėje brokoliai išaugo gražesni ir vešlesni, tačiau pigmentų juose yra mažiau lyginant su brokoliais daigintais įprastoje MS ir agaro terpėje.

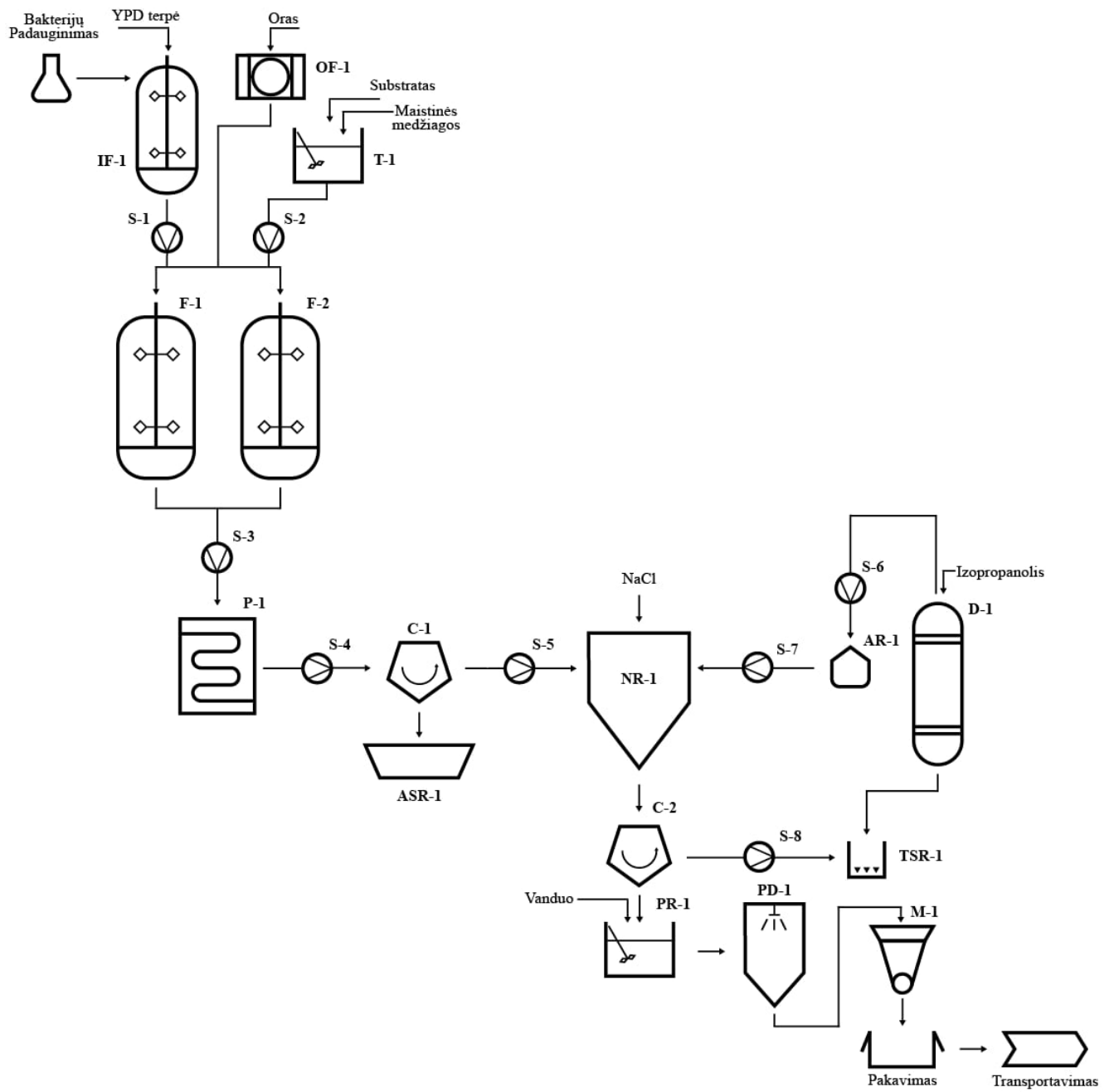
4. Rekomendacijų dalis

Ksantano gamybai su *Xanthomonas campestris* bakterijomis rekomenduojama naudoti antrinių žaliavų šaltinius: **ksilozę, kokosų palmių žiedų cukrų, avokadų žievelių hidrolizatą**. Fermentacijos trukmė neturėtų viršyti **48 val**, o temperatūra turėtų būti palaikoma apie **37 °C**. Viso proceso metu labai svarbus stabilus **maišymas**. Gamybos procesas gali būti atliekamas pagal žemiau pateiktą **aparatinę schemą** (4.1 pav.)

Siekiant pakelti ksantano pridėtinę vertę galimas redukcinių savybių didinimas. Rekomenduojama bakterijų mitybinei terpei naudoti **kokosų palmių žiedų cukrų**, kuris pasižymėjo didesnėmis redukcinėmis savybėmis už komercinį ksantaną, dviejų tyrimų metu. Taip pat šis substratas pasižymi ir didele išeiga, todėl tai būtų optimali žaliava ksantano gamyboje.

Rekomenduojami papildomi tyrimai su laktoze ir galaktoze, kurių terpėse augusios bakterijos išskyrė didesnes ksantano koncentracijas lyginant su literatūros šaltiniais. Šiuos junginius turintys substratai dažnai nepasižymi didele išeiga dėl *Xanthomonas campestris* esančios beta-galaktozidazės, kuri slopina ksantano išskyrimą terpėse su vieninteliu laktozės šaltiniu.

Platesniam ksantano pritaikymui rekomenduojami tolimesni tyrimai. Reikalingas ksantano ir želatinos hidrogelių tyrimas, kurio metu būtų galima patikrinti ar tai yra tinkama kompozicija 3D biospausdinimui ir naudojimui sveikatos srityje žaizdoms gydyti. Ksantano kaip agarų pakaitalo terpės turėtų būti ištirtos su didesniu kiekiu ksantano mėginių.



4.1 pav. Ksantano gamybos aparatūrinė schema

4.1 lentelė. Ksantano gamybos aparatūrinės schemos žymėjimų reikšmės

Žymėjimas	Įrengimo pavadinimas
OF – 1	Oro filtras
IF – 1	Inokulianto fermentatorius
T – 1	Žaliavų tiekimo talpa
S – 1, S – 2, S – 3, S – 4, S – 5, S – 6, S – 7, S – 8	Siurblys
F – 1, F – 2	Fermentatorius
P – 1	Pasterizatorius
C – 1, C – 2	Centrifuga
D – 1	Distiliatorius
TSR - 1	Tirpalo surinkimo rezervuaras
ASR - 1	Atliekų surinkimo rezervuaras
AR – 1	Alkoholio rezervuaras
PR – 1	Praplovimo rezervuaras
PD – 1	Purkštuvinė džiovykla
M – 1	Malūnas

Atlikus tyrimus ir įvertinus bei išanalizavus gautus rezultatus, remiantis Lopes B. M. ir kt. [14] pateiktu ksantano gamybos aprašymu, rekomenduojama taikyti pateiktą aparatūrinę gamybos schemą (4.1 pav.) Į inokulianto fermentatorių **IF – 1** yra tiekiami padaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų kultūra bei skysta YDP terpė. Fermentatoriuje rekomenduojama palaikyti 37 °C temperatūrą ir nuolatinį maišymą. Paruoštas inokuliantas bei sumaišytas substratas su maistinėmis medžiagomis **T - 1** yra tiekiami išcentrinio siurbliu **S – 1** ir **S – 2** į fermentatorius **F – 1, F – 2**. Taip pat į juos pro oro filtrą **OF – 1** tiekiamas aerobinėms bakterijoms reikalingas oras. Fermentaciją rekomenduojama vykdyti 48 val palaikant 37 °C temperatūrą ir nuolatinį maišymą. Po fermentacijos išcentrinio siurbliu **S – 3** terpė su bakterijomis yra transportuojamos į pasterizatorių **P – 1** ir pasterizuojamos 5 min 90 °C temperatūroje [61]. Po pasterizacijos išcentrinio siurbliu **S – 4** vyksta terpės su bakterijomis transportavimas į centrifugą **C – 1**, kurioje yra atskiriama ląstelių biomasė taikant 9000 aps./min greitį. Gauta ląstelių biomasė pašalinama į atliekų surinkimo talpą **ASR – 1**. Likusi skystoji terpė išcentrinio siurbliu **S – 5** yra tiekama į nusodinimo rezervuarą **NR – 1**, kuriame palaikoma 25 °C temperatūra. Į šį rezervuarą papildomai yra tiekiamas NaCl ir išcentrinio siurbliu **S – 7** izopropanolis iš distiliatoriaus **D – 1**. Po ksantano nusodinimo mišinys transportuojamas į centrifugą **C – 2**. Joje atskiriamas ksantanas nuo tirpiklio atliekų, kurios yra šalinamos išcentrinio siurbliu **S – 8** į tirpalo surinkimo rezervuarą. Atskirta ksantano dalis yra perkeliama į praplovimo rezervuarą **PR – 1**. Po praplovimo ksantanas yra džiovinamas purkštuvinėje džiovykloje **PD – 1** ir smulkinamas į miltelius malūne **M – 1**. Gautas produktas supakuojamas ir transportuojamas klientams.

Išvados

1. Ksantano gamybai su *Xanthomonas campestris* bakterijomis buvo išbandyta 20 skirtingų substratų. Įvertinus išskirto ksantano koncentracijas didžiausia išeiga pasižymėjo bakterijos, augusios laktozės terpėje po 72 val fermentacijos (25,63 g/l), ksilozės terpėje po 24 val (27,20 g/l), kokosų palmių žiedų cukraus terpėje po 48 val (26,37 g/l), avokadų žievelių hidrolizato terpėje po 24 val (26,11 g/l) fermentacijos. Įvertinus biomasės koncentraciją buvo pastebėta, jog didžiausios buvo gautos laktozės (1,61 g/l), fruktozės (1,28 g/l), citrinų (0,426 g/l) ir avokadų žievelių hidrolizatų (0,536 g/l), ksilitolio (0,524 g/l) terpėse. O biomasės koncentracijas, lyginant su ksantano koncentracijomis tiek laktozės, tiek avokadų ir citrinų žievelių hidrolizatų mėginiai turėjo dideles abiejų produktų koncentracijas.
2. Iš 20 tirtų skirtingų anglies šaltinių 13 yra priskiriami antrinėms žaliavoms. Palyginus pramonėje naudojamus anglies šaltinius (gliukozė - 23,43 g/l) su antriniais anglies šaltiniais (kokosų palmių žiedų cukrus - 26,37 g/l), galima pastebėti, jog antriniais anglies šaltiniais pasižymėjo panašia arba didesne ksantano išeiga.
3. Optimizuojant ksantano išskyrimą, geriausi išeigos rezultatai ir didžiausios redukcinės savybės buvo gautos, naudojant kokosų palmių žiedų cukraus anglies šaltinį (26,37 g/l). Taikant 48 val fermentaciją, 37 °C temperatūrą ir nuolatinį maišymą, išskyrimui naudojant tirpiklį - izopropanolį. Pagal atliktą FT-IR spektroskopinę analizę šis ksantanas beveik nesiskyrė nuo komercinio ksantano.
4. Ištyrus ksantano, gauto iš skirtingų anglies šaltinių, antioksidacines savybes buvo nustatyta, jog didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo ksantanas išskirtas iš galaktozės (0,32 A), arabinozės (0,33 A), ksilozės (0,31 A), cukranendrių cukraus (0,32 A), kokosų palmių žiedų cukraus (0,33 A), D-manitolio (0,32 A), apelsinų žievelių hidrolizato (0,30 A) ir mandarinų žievelių hidrolizato (0,33 A) terpių. FRAP metodu tirtuose mėginiuose didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo sacharozės (6,526 μmol/l), laktozės (6,714 μmol/l) ir kokosų palmių žiedų cukraus (5,915 μmol/l) terpėse išskirtas ksantanas.
5. Tyrimų metu ksantanas buvo sėkmingai pritaikytas hidrogelių kompozicijai su želatina, bei kaip agaro pakaitalas brokolių sėkloms daiginti.

Literatūros sąrašas

1. KUPPUSWAMI, G.M. FERMENTATION (INDUSTRIAL) | Production of Xanthan Gum. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2014, 816-821, [žiūrėta 2023 11 20]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00110-5>
2. PALANIRAJ A., JAYARAMAN V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*. 2011, 106(1), 1-12, [žiūrėta 2023 11 20] Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.035>
3. CRUGEIRA P.J.L., ALMEIDA H.H.S., MARCET I. ir kt. Biosynthesis of antioxidant xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using substrates added with moist olive pomace. *Food and bioprocesses processing*. 2023, 141:210-218, [žiūrėta 2023 11 20] Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.08.008>
4. DOMB A., MIZRAHI B., FARAH S. *Biomaterials and Biopolymers*. Springer Nature, 2023. ISBN 9783031361357.
5. DONOT F., FONTANA A., BACCOU J.C., SCHORR-GALINDO S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*. 2012, 87(2), 951-962. [žiūrėta 2023 12 28] Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>
6. VAISHNAV A., CHOUDHARY D.K. *Microbial Polymers : Applications and Ecological Perspectives*. Springer, 2021. ISBN 9789811600456.
7. YOUNES M., AQUILINA G., CASTLE L. ir kt. Re-evaluation of xanthan gum (E 415) as a food additive in foods for infants below 16 weeks of age and follow-up of its re-evaluation as a food additive for uses in foods for all population groups. *EFSA Journal*. 2023, 21(5), [žiūrėta 2024 01 15]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7951>
8. BHAT I.M., WANI S.M., MIR S.A., MASOODI F.A. Advances in xanthan gum production, modifications and its applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2022, 42:102328, [žiūrėta 2024 01 15]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102328>
9. KHAN T.N. *Xanthomonas Campestris-A Brief Overview*. *Journal of Pharmacy and Drug Development*. 2022, 4(1), [žiūrėta 2024 01 15]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/367334989_Xanthomonas_Campestris-A_Brief_Overview
10. SILVA M.F., FORNARI R.C.G., MAZUTTI M.A., ir kt. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*. 2009, 90(1), 119-123, [žiūrėta 2024 01 15]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.010>
11. VORHOLTER F.J., SCHNEIKER S., GOESMANN A. ir kt. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *Journal of Biotechnology*. 2008, 134, 33–45, [žiūrėta 2024 01 15]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.12.013>

12. HAHN J., KOCH D., NIEHAUS K., ORTSEIFEN V. Analysis of Gum proteins involved in xanthan biosynthesis throughout multiple cell fractions in a “single-tube”. *Journal of Proteomics*. 2022, 257:104513, [žiūrėta 2024 02 21]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104513>
13. GARCÍA-OCHOA F., SANTOS V.E., CASAS J.A., GÓMEZ E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*. 2000, 18(7), 549-579 [žiūrėta 2024 02 21]. Prieiga per doi: [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(00\)00050-1](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(00)00050-1)
14. LOPES B.D.M., LESSA V.L., SILVA B.M. ir kt. Xanthan gum: Properties, production conditions, quality and economic perspective. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2015, 54(3), 185-194. ISSN: 336-8672.
15. NIKNEZHAD S.V., ASADOLLAHI M.A., ZAMANI A., BIRIA D. Production of xanthan gum by *Xanthomonas* species using starch as carbon source. *Minerva Biotecnologica*. 2014, 26, 191–197, [žiūrėta 2024 02 21]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/269762173_Production_of_xanthan_gum_by_Xanthomonas_species_using_starch_as_carbon_source
16. MURAD H.A., ABO-ELKHAIR A.G., AZZAZ H.H. Production of Xanthan Gum from Nontraditional Substrates with Perspective of the Unique Properties and Wide Industrial Applications. *JSMC Microbiology*. 2019, [žiūrėta 2024 02 21]. Prieiga per: <https://www.jsmccentral.org/Microbiology/jsmcm619628.php>
17. ZAHIDAH NORDIN N., RAMLI RASHIDI A., JOE DAILIN D. ir kt. Xanthan biopolymer in pharmaceutical and cosmeceutical applications: critical review. *Bioscience Research*. 2020, 17(1), 205–220. ISSN: 2218-3973.
18. CHAVAN S., BAIG M. Relationship of Biomass and Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris*: Optimization of Parameters. *British Biotechnology Journal*. 2016, 11(1), 1-8, [žiūrėta 2024 02 21]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.9734/bbj/2016/22431>
19. FREITAS F., ALVES V.D., REIS M.A.M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*. 2011, 29, 388–398, [žiūrėta 2024 02 21]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>
20. JESUS M.S., MATA F., BATISTA R.A. ir kt. Corncob as Carbon Source in the Production of Xanthan Gum in Different Strains *Xanthomonas* sp. Sustainability. *Food Security and Nutrition and Sustainable Agriculture*. 2023, 15(3), 2287-2287 [žiūrėta 2024 02 21]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3390/su15032287>
21. KERUTYTĖ I. Ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* optimizavimo tyrimai. *Kauno Technologijos Universitetas*. 2019. [žiūrėta 2024 02 21]
22. DEMIRCI A.S., PALABIYIK I., APAYDIN D. ir kt. Xanthan gum biosynthesis using *Xanthomonas* isolates from waste bread: Process optimization and fermentation kinetics. *LWT*. 2019, 101, 40-47 [žiūrėta 2024 02 21]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.018>

23. LI P., LI T., ZENG Y. ir kt. Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* LREL-1 using kitchen waste as the sole substrate. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 151, 684-691 [žiūrėta 2024 02 21]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.017>
24. PSOMAS S.K., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M., KYRIAKIDIS D.A. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 2007, 35(3), 273-280 [žiūrėta 2024 03 11]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.036>
25. NEJADMANSOURI M., RAZMJOOEI M., SAFDARIANGHOMSHEH R. ir kt. M. Semi-continuous production of xanthan in biofilm reactor using *Xanthomonas campestris*. *Journal of Biotechnology*. 2021, 328:1-11 [žiūrėta 2024 03 11]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.01.004>
26. REVIN V.V., LIYASKINA E.V., PARCHAYKINA M.V. ir kt. Production of Bacterial Exopolysaccharides: Xanthan and Bacterial Cellulose. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, 24(19), 14608 [žiūrėta 2024 03 11]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3390/ijms241914608>
27. SINGHVI G., HANS N., SHIVA N. ir kt. Chapter 5 - Xanthan gum in drug delivery applications. Iš: *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications*. Academic Press, 2019, pp. 121 - 144. ISBN: 978-0-12-817055-7.
28. PIOLA B., SABBATINI M., GINO S. ir kt. 3D Bioprinting of Gelatin–Xanthan Gum Composite Hydrogels for Growth of Human Skin Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23(1), 539 [žiūrėta 2024 03 11]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3390/ijms23010539>
29. SHARMA B.R., NARESH L. Xanthan Gum - A Boon to Food Industry. *Agricultural and Food Sciences*. 2006, 1(5), 27 - 30. [žiūrėta 2024 03 11]. Prieiga per: <https://www.semanticscholar.org/paper/Xanthan-Gum-A-Boon-to-Food-Industry-Sharma-Naresh/5511daf350daf05c0da0ee7db9cbe0a879d8f3e6>
30. RAMOS DE SOUZA E., RODRIGUES P.D., SAMPAIO I.C.F. ir kt. Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* using produced water and crude glycerin as an environmentally friendlier agent to enhance oil recovery. *Fuel*. 2022, 310, 122421, [žiūrėta 2024 03 11]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122421>
31. SEZONOV G., JOSELEAU-PETIT D., D'ARI R. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*. 2007, 189(23), 8746-8749. [žiūrėta 2024 03 23]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1128/jb.01368-07>
32. DYMOND J.S. Chapter Twelve - *Saccharomyces Cerevisiae* Growth Media. *Methods in Enzymology*. 2013, 533, 101-204. [žiūrėta 2024 03 23]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00012-X>
33. YU E.Y., REN Z., MEHRKANOON S. ir kt. Plasma metabolomic profiling of dietary patterns associated with glucose metabolism status: The Maastricht Study. *BMC Med*. 2022, 20(1), 450. [žiūrėta 2024 03 23]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02653-1>

34. PLAZA-DIAZ J., GIL A. Sucrose: Dietary Importance. *Encyclopedia of Food and Health*. 2016, 199 - 204. [žiūrēta 2024 03 23]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00668-1>
35. KOLTUNIEWICZ A. 4.05 - Integrated Membrane Operations in Various Industrial Sectors. *Comprehensive Membrane Science and Engineering*. 2010, 4, 109 - 164, [2024 04 13]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-093250-7.00029-3>
36. WRAGE J., BURMESTER S., KUBALLA J. ir kt. Coconut sugar (*Cocos nucifera* L.): Production process, chemical characterization, and sensory properties. *LWT*. 2019, 112, 108227, [žiūrēta 2024 04 13]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.125>
37. WOLFSDORF J.I., GARVEY K.C. Chapter 49 - Management of Diabetes in Children: Chapter titles shaded in green indicate chapters dedicated predominantly to pediatric endocrinology content. *Endocrinology: Adult and Pediatric*. 2016, 854 - 882, [žiūrēta 2024 04 13]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-18907-1.00049-4>
38. KEIM N.L., HAVEL P.J. Fructose: Absorption and Metabolism. *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2013, 361 - 365, [žiūrēta 2024 04 13]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00128-8>
39. ARONSON J.K. Lactose. *Meyler's Side Effects of Drugs*. 2016, 441-442. [žiūrēta 2024 04 13]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.00119-0>
40. MARKS V. Glucose: Metabolism and Maintenance of Blood Glucose Level. *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2013, 387-392, [žiūrēta 2024 04 26]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-375083-9.00135-5>
41. MATANO C., MEISWINKEL T.M., WENDISCH V.F. Amino Acid Production from Rice Straw Hydrolyzates. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. 2014, 493-505, [žiūrēta 2024 04 26]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-401716-0.00038-6>
42. QIN Y. 6 - Applications of Bioactive Seaweed Substances in Functional Food Products. *Bioactive Seaweeds for Food Applications*. 2018, 111 - 134, [žiūrēta 2024 04 26]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813312-5.00006-6>
43. SHARMA R, BHARDWAJ R, THUKRAL A. K. ir kt. Osmolyte Dynamics. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. 2014, 2, 405-430, [žiūrēta 2024 04 26]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800875-1.00017-x>
44. ABDEL-HAMID A.M., SOLBIATI J.O., CANN I.K.O. Chapter One - Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*. 2013, 82, 1-28, [žiūrēta 2024 04 26]. Prieiga per doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124076792000016>
45. KOMESU A., OLIVEIRA J., NETO J.M., ir kt. Xylose fermentation to bioethanol production using genetic engineering microorganisms. *Genetic and Metabolic Engineering for Improved Biofuel Production from Lignocellulosic Biomass*. 2020, 143-154, [žiūrēta 2024 04 26]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817953-6.00010-5>

46. DAVARITOUCHAE M., MOSLEH I., DADMOHAMMADI Y. ir kt. Abbaspourrad A. One-Step Oxidation of Orange Peel Waste to Carbon Feedstock for Bacterial Production of Polyhydroxybutyrate. *Polymers*. 2023, 15(3), 697, [žiūrėta 2024 04 26]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3390/polym15030697>
47. MICHAEL-IGOLIMA U., ABBEY S.J., IFELEBUEGU A.O. ir kt. Modified Orange Peel Waste as a Sustainable Material for Adsorption of Contaminants. *Materials*. 2023, 16(3), 1092, [žiūrėta 2023 11 20]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3390/ma16031092>
48. DOĞAN M., SABAZ P., BİCİL Z. ir kt. Activated carbon synthesis from tangerine peel and its use in hydrogen storage. *Journal of the Energy Institute*. 2020, 93(6), :2176-2185, [žiūrėta 2023 11 20]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.joei.2020.05.011>
49. WELDEKIDAN H., PATEL H.J., MOHANTY A.K. ir kt. Synthesis of porous and activated carbon from lemon peel waste for CO2 adsorption. *Carbon Capture Science & Technology*. 2024, 10, 100149-100149, [žiūrėta 2024 04 26]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccst.2023.100149>
50. AVALOS-VIVEROS M., SANTOLALLA-VARGAS C. E., SANTES-HERNÁNDEZ V. F. Ir kt. Valorization of avocado peels by conventional extraction and hydrothermal carbonization for cosmeceutical applications. *Sustainable chemistry and pharmacy*. 2023, 36, 101335-101335, [žiūrėta 2024 03 16]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101335>
51. AHMAD T., DANISH M. A review of avocado waste-derived adsorbents: Characterizations, adsorption characteristics, and surface mechanism. *Chemosphere*. 2022, 296, 134036, [žiūrėta 2024 03 16]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134036>
52. GÓMEZ-GARCÍA R., MADUREIRA A. R, AGUILAR C.N. ir kt. Valorization of melon fruit (*Cucumis melo* L.) by-products: Phytochemical and Biofunctional properties with Emphasis on Recent Trends and Advances. *Trends in Food Science & Technology*. 2020, 99, 507-519, [žiūrėta 2024 03 16]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.033>
53. GUARDIA L., SUÁREZ L., QUEREJETA N. ir kt. Apple Waste: A Sustainable Source of Carbon Materials and Valuable Compounds. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2019, 7(20), 17335-17343, [žiūrėta 2024 03 16]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b04266>
54. GULSUNOGLU Z., PURVES R., KARBANCIOGLU-GULER F. ir kt. Enhancement of phenolic antioxidants in industrial apple waste by fermentation with *Aspergillus* spp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020, 25, 101562, [žiūrėta 2024 03 19]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101562>
55. SALLI K., LEHTINEN M.J., TIIHONEN K. ir kt. Xylitol's Health Benefits beyond Dental Health: A Comprehensive Review. *Nutrients*. 2019, 11(8), 1813, [žiūrėta 2024 03 19]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3390/nu11081813>
56. FRIGAARD N. Sugar and Sugar Alcohol Production in Genetically Modified Cyanobacteria. *Genetically Engineered Foods*. 2018, 31-47, [žiūrėta 2024 03 19]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811519-0.00002-9>

57. JAIN R., BABBAR S.B. Xanthan gum: an economical substitute for agar in plant tissue culture media. *Cell Biology and Morphogenesis*. 2006, 25(2), 81–84, [žiūrēta 2024 03 19]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0039-8>
58. FU J.F., TSENG Y.H. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, 56(4), 919-923, [žiūrēta 2024 03 19]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1128/aem.56.4.919-923.1990>
59. HABIBI H., KHOSRAVI-DARANI K. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017, 10, 130-140, [žiūrēta 2024 04 01]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.02.013>
60. ASSIS J., BRANDÃO L. V., ALVES L. ir kt. A Study of the Effects of Aeration and Agitation on the Properties and Production of Xanthan Gum from Crude Glycerin Derived from Biodiesel Using the Response Surface Methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014, 172(5), 2769-2785 [žiūrēta 2024 03 19]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0723-7>
61. CP Kelco (JAV) High viscosity xanthan and process for preparing same. Inventors: Todd A. TALASHEK, William Scott BOUSMAN. US patent US 6391596 B1. 2000-09-19, [žiūrēta 2024 04 01]. Prieiga per: <https://patents.google.com/patent/US6391596B1/en>
62. UNDAVALLI V.K., LING C., KHANDELWAL B. Chapter 6 - Impact of alternative fuels and properties on elastomer compatibility. *Aviation Fuels*. 2021, 113 - 132, [žiūrēta 2024 04 01]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818314-4.00001-7>
63. HU X., WANG K., YU M. ir kt. Characterization and Antioxidant Activity of a Low-Molecular-Weight Xanthan Gum. *Biomolecules*. 2019, 9(11), 730. [žiūrēta 2024 04 01]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3390/biom9110730>