



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* optimizavimo
tyrimai**

Baigiamasis magistro projektas

Ieva Kerutytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* optimizavimo
tyrimai**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Ieva Kerutytė

Projekto autorė

Doc. dr. Iona Jonuškienė

Vadovė

Lekt. Kazimieras Anusevičius

Recenzentas

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Ieva Kerutytė

Ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* optimizavimo tyrimai

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Ievos Kerutytės, baigiamasis projektas tema „Ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* optimizavimo 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.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1 Ksantano charakteristika	9
1.2 Fizikinės – cheminės savybės	9
1.3 Ksantano biosintezė.....	10
1.4 <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų charakteristika.....	11
1.5 Genetiškai modifikuoti <i>Xanthomonas campestris</i> mikroorganizmai	12
1.6 Komercinė ksantano gamyba.....	13
1.7 Faktoriai, turintys įtaką gamybos procesui.....	14
1.7.1 Anglies šaltinio įtaka	14
1.7.2 Azoto šaltinio įtaka.....	14
1.7.3 Temperatūros įtaka	15
1.7.4 pH įtaka.....	15
1.7.5 Fermentacijos tipo įtaka.....	15
1.7.6 Kiti faktoriai.....	16
1.8 Panaudojimas	16
1.8.1 Maisto pramonė.....	17
1.8.1.1 Duonos pramonė	17
1.8.1.2 Mėsos pramonė	17
1.8.2 Kosmetikos pramonė	17
1.8.3 Farmacijos pramonė	18
1.8.4 Žemės ūkio pramonė	18
1.8.5 Naftos pramonė	18
1.9 Ekonominiai aspektai	18
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	19
2.1 Tyrimo metu naudota įranga.....	19
2.2 Tyrimo metu naudotos terpės	19
2.3 Tyrimo eiga.....	23
2.3.1 YM terpių paruošimas	25
2.3.2 Dehidratuotų <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų kultūrų paruošimas	25
2.3.3 <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų kultivavimas	26
2.3.4 YM – T terpės paruošimas.....	26
2.3.5 Inokulianto paruošimas	26

2.3.6	Biomasės koncentracijos nustatymas	26
2.3.7	Produkcijos terpės paruošimas.....	26
2.3.8	Fermentacija.....	26
2.3.9	Biomasės koncentracijos nustatymas	27
2.3.10	Ksantano išskyrimas.....	27
2.3.11	Biomasės džiovinimas ir jos kiekio nustatymas	28
2.3.12	Ksantano džiovinimas ir jo kiekio nustatymas	28
3.	TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	29
3.1	Inokulianto koncentracijos įvertinimas	29
3.2	Fermentacija.....	30
3.3	Ksantano kiekio įvertinimas	36
3.4	Išdžiovintos biomasės kiekio įvertinimas.....	43
4.	REKOMENDACIJŲ DALIS	44
	IŠVADOS	47
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	48

Kerutytė, Ieva. Ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* optimizavimo 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: ksantanas, *Xanthomonas campestris*, substratas, tirpiklis, išeiga.

Kaunas, 2019. 51 p.

Santrauka

Ksantanas – tai mikrobinis polisacharidas, sudarytas iš D – gliukozės, D – manozės ir D – glukurono rūgšties likučių, santykiu 2:2:1, bei iš kintančių O – acetilo ir piruvato likučių. Šis biopolimeras pasižymi išskirtinėmis fizikinėmis savybėmis – gerai tirpsta ir šaltame, ir karštame vandenyje, esant mažoms koncentracijoms sudaro didelio klampumo tirpalus, stabilius esant dideliems pH, temperatūros ir druskos koncentracijos pokyčiams.

Šio baigiamojo projekto tyrimo metu buvo atlikti ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* optimizavimo tyrimai, kurių metu panaudoti 9 skirtingi anglies šaltiniai, iš kurių 2 laikomi alternatyviais – glicerolis ir kokosų palmių žiedų cukrus, taip pat išbandyti ir 4 skirtingi tirpikliai.

Didžiausia ksantano išeiga gauta naudojant substratą maltozę, tai yra 11,06 g/l. Iš alternatyviųjų anglies šaltinių polisacharido gamybai labiau tinkamas kokosų palmių žiedų cukrus. Visais atvejais geriausi rezultatai nustatyti naudojant tirpiklį acetoną, mažiausiai tinkamas tirpiklis pasirodė metanolis.

Kerutyte, Ieva. Optimisation research of xanthan derivation from *Xanthomonas campestris*. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. Ilona Jonuskiene; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): biotechnology, technological sciences.

Keywords: xanthan, *Xanthomonas campestris*, substrate, solvent, yield.

Kaunas, 2019. 51 p.

Summary

Xanthan is a microbial polysaccharide, composed of D-glucose, D-mannose and D-glucuronic acid residues in a ratio of 2:2:1 and variable proportions of O-acetyl and pyruvyl residues. This biopolymer has exceptional physical properties - dissolves in both cold and hot water, even in low concentrations xanthan forms high viscosity solutions, which are stable in high variations of pH, temperature and salt concentration.

In this project there was made optimisation research of xanthan synthesis by *Xanthomonas campestris*. There were used 9 different carbon sources, from which 2 are considered to be alternative - glycerol and coconut tree sugar. Also there were used 4 different solvents.

The highest xanthan yield obtained when using maltose as a substrate – 11.06 g/l. Coconut palm sugar as alternative carbon source is better choice for xanthan production than glycerol. In all cases the results show that acetone fits the best for xanthan precipitation and the methanol on the contrary.

SANTRUMPOS

X. campestris – *Xanthomonas campestris*;

ATP – adenozino trifosfatas;

UDP – uridino difosfatas;

GDP – guanozino 5-difosfatas;

Acetil-CoA – acetilo kofermentas A;

pv. – patovaras.

ĮVADAS

Polisacharidai – tai paprastųjų cukrų, sujungtų glikozidiniais ryšiais, polimerai, natūraliai randami gamtoje. Augalai ir mikroorganizmai produkuoja įvairios struktūros ir skirtingomis savybėmis pasižyminčius polisacharidus. Dėl savo fizikinių savybių šie junginiai naudojami įvairiose pramonės srityse, siekiant pakeisti skysčių tekėjimo charakteristikas, stabilizuoti suspensijas, gaminti emulsijas, inkapsuluoti tam tikras medžiagas. Taip pat šios medžiagos naudojamos kaip jonų mainų agentai ar net molekuliniai sietai.

Vykstant nuolatinėms įvairiose pramonės šakose naudingų polisacharidų paieškoms, ksantanas pirmą kartą išgautas 1950 m. iš griežčio augalo. Labai greitai buvo nustatyta, kad tai biopolimeras, pasižymintis potencialiai vertingomis fizikinėmis savybėmis, todėl jau 1964 m. pradėta komercinė ksantano gamyba. Tai vienintelis mikrobinis polisacharidas, patenkantis tarp 10 – ties pasaulyje daugiausiai sunaudojamų polisacharidų [1].

Šiuo metu, ksantanas gaminamas mikrobinės fermentacijos metu, panaudojant *Xanthomonas campestris* rūšies bakterijas. Tai augalams patogeniški mikroorganizmai, sukeliantys juodąjį puvinį, ypač pavojingi bastutinių genties augalams. Pagrindiniai anglies šaltiniai naudojami ksantano gamyboje – gliukozė ir sacharozė. Deja, jie stipriai pabrangina produktą, todėl vis ieškoma alternatyvių substratų, dažniausiai tai yra žemės ūkio ar kitų pramonės šakų atliekos [2]. Nors keičiant substratą fizikinės ksantano savybės labai nekinta, tačiau tai daro didelę įtaką produkto išeigai [3]. Remiantis šia problema, šiame baigiamajame magistro projekte aprašomas tyrimas, kurio metu vykdyta ksantano gamyba naudojant 9 skirtingus substratus, pateikiamos išvados bei rekomendacija optimaliausio proceso vykdymui.

Tyrimo tikslas – optimizuoti ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* bakterijų procesą.

Uždaviniai:

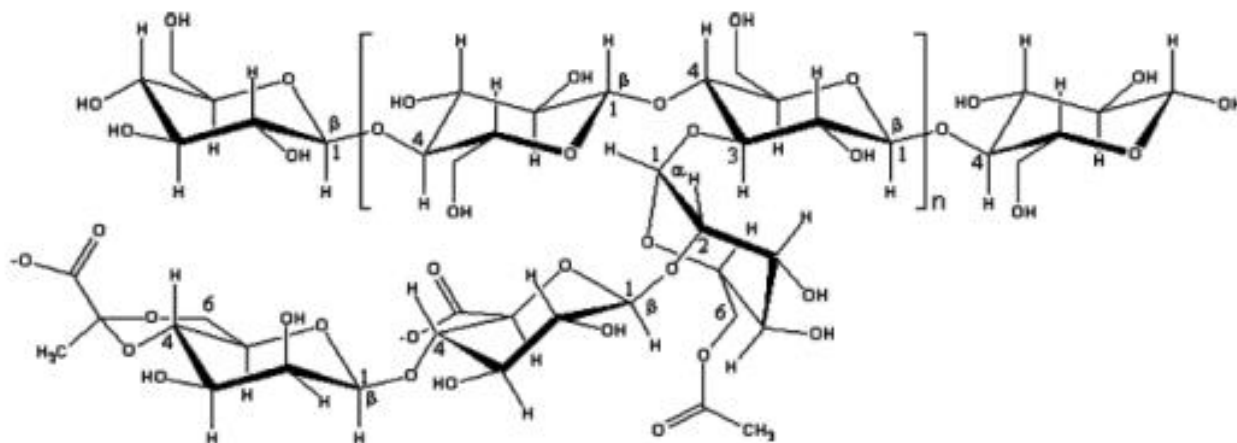
1. optimizuoti ksantano gavimo procesą, mitybinėje terpėje panaudojant skirtingus anglies šaltinius;
2. optimizuoti ksantano gavimo procesą, mitybinėje terpėje panaudojant alternatyvius anglies šaltinius;
3. ištirti ir palyginti skirtingų tirpiklių poveikį ksantano nusodinimui bei galutinei produkto išeigai;
4. pateikti optimalią ksantano gavimo būdą bei aparatūrinę ksantano gavimo schemą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Ksantano charakteristika

Ksantanas – tai mikrobinės kilmės rūgštinis polisacharidas, sudarytas iš D – gliukozės, D – manozės ir D – glukurono rūgšties likučių, santykiu 2:2:1, bei iš kintančių O – acetilo ir piruvato likučių [4]. Egzopolisacharido pagrindas toks pat kaip ir celiuliozės, kur β -1,4-glikozidiniu ryšiu sujungtos gliukozės molekulės, su prie kas antros molekulės 3 – iojo anglies atomo prijungtomis šoninėmis trisacharidų grandinėmis. Šios grandinės sudarytos iš glukurono rūgšties, β -1,4-glikozidiniu ryšiu besijungiančios su terminaline manozės molekule, turinčia piruvato pakaitą, ir β -1,2-glikozidiniu ryšiu – su acetilo pakaitą turinčia vidine manozės molekule, kuri, savo ruožtu, α -1,3-glikozidiniu ryšiu yra prisijungusi prie egzopolisacharido molekulės pagrindo [5]. Šoninėse grandinėse esančių acetilo ir piruvato pakaitų kiekis priklauso nuo bakterijų auginimo sąlygų bei kitų proceso parametru [4]. Kuo ksantano molekulėje mažiau piruvato grupių, tuo klampesnis ir takesnis polisacharido vandeninis tirpalas [7]. Taip pat, acetilo ir piruvato grupės daro įtaką konformacinėms ksantano molekulės savybėms. Acetilo grupė stabilizuoja polisacharido molekulės struktūrą net stipriai padidėjus praskiestų vandeninių tirpalų joninei jėgai, kai, tuo tarpu, piruvato grupė pasižymi destabilizuojančiomis savybėmis. Greičiausiai, tokį poveikį lemia neigiama elektrostatika, atsiradusi dėl abiejų neigiamą krūvį turinčių grupių tarpusavio atostūmio [1].

Ksantano molekulė gali būti dviejų konformacijų – spiralinės ir netaisyklingos vijos. Kai polisacharidas yra kietos būsenos, jo molekulinės struktūra yra spiralinė, tirpaluose, kuriuose esama druskų, ksantano grandinės transformuojasi iš viengubos spiralinės struktūros į dvigubą, o tirpalus kaitinant vyksta konformaciniai pokyčiai ir molekulės struktūra tampa lanksčios, netvarkingos formos [7].



1.1 pav. Struktūrinis ksantano fragmentas

1.2 Fizikinės – cheminės savybės

Ksantanas pasižymi išskirtinėmis fizikinėmis savybėmis – gerai tirpsta tiek šaltame, tiek karštame vandenyje, sudaromi didelio klampumo tirpalai naudojant mažas koncentracijas, stabilumas esant dideliems pH, temperatūros ir druskos koncentracijos pokyčiams [6]. Pavyzdžiui, 0,5 – 1,5 % koncentracijos ksantano tirpalai klampumą išlaiko temperatūros intervale nuo 0 °C iki 100 °C, taip pat esant 0,1 % ar didesnei druskos koncentracijai, o pH vertei svyruojant nuo 2 iki 11. Ksantano tirpalų klampumą ir gebėjimą išlaikyti tokią konsistenciją lemia stabili dvigrandė spiralinė

polisacharido struktūra. Verta paminėti, kad vandeniniai ksantano tirpalai pasižymi itin aukštu cheminiu stabilumu. Pavyzdžiui, vandeninį polisacharido tirpalą sumaišius su 5 % sieros ar azoto rūgštis, su 25 % fosforo rūgštis ar su 5 % natrio hidroksido, kambario temperatūroje išlaikomas stabilumas net iki kelių mėnesių. Tokį cheminį stabilumą aukštoje temperatūroje, stipriai rūgščioje ar stipriai šarminėje terpėje lemia trisacharidų grandinių apsauginis efektas. Šoninės grandinės sąveikauja su pagrindine ksantano molekulės grandine taip apsaugodamos labilius glikozidinius ryšius nuo hidrolitinio skilimo [1].

Ksantano vandeniniai tirpalai pasižymi dideliu pseudoplastišku tekant, tai reiškia, kad veikiant deformacinėms jėgoms tirpalai praranda klampumą, o panaikinus šias jėgas, tirpalo klampumas staiga sugrįžta. Taip nutinka dėl to, kad šlyties jėgos suardo standžių ksantano molekulių tinklą. Ksantano molekulių tinklas susidaro esant didelei molekulių koncentracijai tirpale, kai pastarosios nebegali laisvai judėti ir jungiasi viena su kita [7].

1.3 Ksantano biosintezė

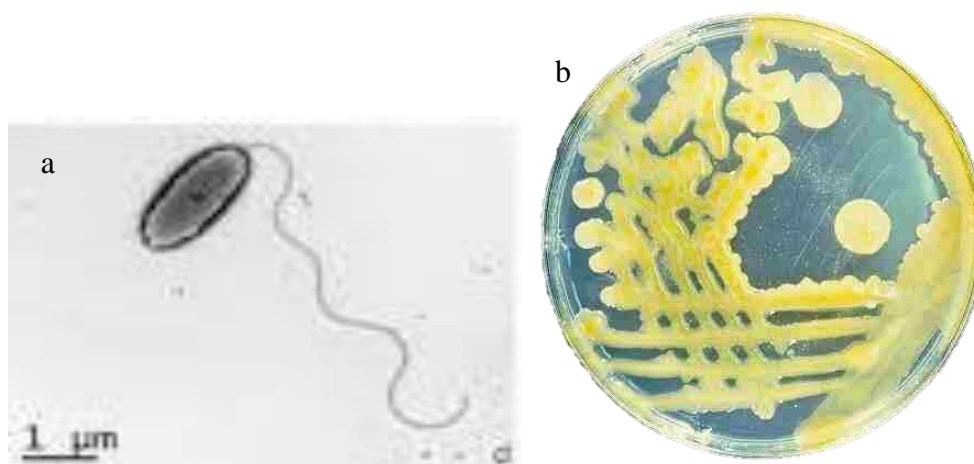
Polimeras išgaunamas pasitelkiant biotechnologinius procesus, t. y. fermentuojant gliukozę, sacharozę, krakmolą ar melasą *X. campestris* bakterijomis [4].

Ksantano biosintezę galima suskirstyti į 3 etapus:

- paprastųjų cukrų įsisavinimas ir jų konversija į nukleotidinius darinius;
- pentasacharidų subvienetų pernešimas izopropilpirofosfato nešikliu;
- pentasacharidų polimerizacija ir jų išskyrimas.

Polimero pagrindas suformuojamas jungiant D-gliukozės-1-fosfatą ir D-gliukozę iš UDP-gliukozės. Tada iš GDP-manozės ir UDP-gliukurono rūgštis prijungiama D-manozė ir D-gliukurono rūgštis. Acetilo grupė prie vidinės manozės likučio perkeliama nuo acetil-CoA, o piruvato grupė nuo fosfoenilpiruvato perkeliama prie terminalinės manozės likučio. Kiekvienas iš šių etapų reikalauja specifinių substratų ar fermentų, tad jei nėra bent vieno iš reikalingų faktorių, proceso etapas yra užblokuojamas.

Kaip jau minėta, visas sintezės procesas prasideda nuo paprastųjų angliavandenių įsisavinimo ir skaidymo. *Entner – Doudoroff* ciklas, kartu su trikarboksirūgščių ciklu, yra dominuojantis gliukozės katabolizmo mechanizmas. Juo remiantis ir siekiant ant akceptoriaus molekulės suformuoti polimerą panaudojami įvairūs aktyvinti angliavandenių donorai. Susidarę pasikartojantys oligosacharidų vienetai, prie jų prisijungiant monosacharidams, fosforilniais ryšiais konstruojami prie izoprenoidinio lipidinio nešiklio. Tuo pat metu, iš atitinkamo aktyvuoto donoro prijungiami acilo pakaitai. Susiformavus pasikartojantiems pentasacharidų vienetais, inaktyvuotas lipidinis nešiklis yra defosforilinamas, siekiant gauti izoprenilfosfatą, kuris toliau gali dalyvauti polimero grandinės biosintezėje. Pasikartojančių vienetų struktūrą lemia monosacharidų ir acilo grupių pernešimas nuo donorų bei nuo polimerazės fermento, atsakingo už pentasacharidų polimerizaciją į makromolekulę. Paskutiniame etape egzopolisacharidas iš citoplazminės membranos per periplazminę ir išorinę membranas išskiriamas į ekstraląstelinę aplinką. Šis procesas reikalauja energijos šaltinio ir gali būti analogiškas lipolisacharidų eksportavimui per išorinę membraną, kur energijos tiekėjas yra ATP [3].



1.3 pav. a: *X. campestris* pv. *campestris* mikroskopinis vaizdas; b: *X. campestris* pv. *campestris* bakterijų kolonijos YM terpėje

1.5 Genetiškai modifikuoti *Xanthomonas campestris* mikroorganizmai

Ksantano gamyba yra genetiškai kontroliuojama genų grupės, susidedančios iš 12 genų, žymimų: guma B, – C, – D, – E, – F, – G, – H, – I, – J, – K, – L ir – M. Genetinis bakterijų modifikavimas galimas norint pagerinti gaunamo produkto savybes ar išeią, pritaikyti bakterijas prie tiekiamos mitybinės terpės, padidinti proceso našumą, sumažinant jo trukmę, ar siekiant palengvinti tolimesnį produkto gryninimo procesą. Vienas iš aprašytų genetinio modifikavimo pavyzdžių, kai tai atlikta norint supaprastinti pasikartojančių vienetų struktūrą, tačiau pastebėta, kad, tokiu atveju, gaunama kur kas mažesnė ksantano išeią nei naudojant įprastas *X. campestris* bakterijas.

Siekiant praplėsti ksantano gamyboje efektyvių substratų diapazoną, atliktas dar vienas genetinio bakterijų modifikavimo bandymas. Įprastai, dėl β -galaktozidazės fermento trūkumo *X. campestris* mikroorganizmai neskaido laktozės, tačiau mokslininkai bakterijose įdiegė minėtąjį fermentą koduojantį geną. Tuo pavyko pasiekti, kad *X. campestris* bakterijos vykdytų ksantano sintezę, kai mitybinės terpės sudėtyje yra išrūgų, kas leistų stipriai atpiginti gamybos procesą [3].

Išrūgos – varškės, sūrio, kazeino gamybos šalutinis produktas, gaunamas iš surauginto pieno atskyrus sutrauką. Tai didelė biologine verte pasižymintis produktas, kadangi po perdirbimo jame lieka apie 50 % visų pieno maistinių medžiagų. Priklausomai nuo to, ar išrūgos gautos rūgštinio (rūgščios), ar fermentinio (saldžios) traukinimo metu, jų sudėtis labai nežymiai skiriasi [54]. Išrūgų sudėtis pateikta 1.1 lentelėje:

1.1 lentelė. Išrūgų sudėtis [54]

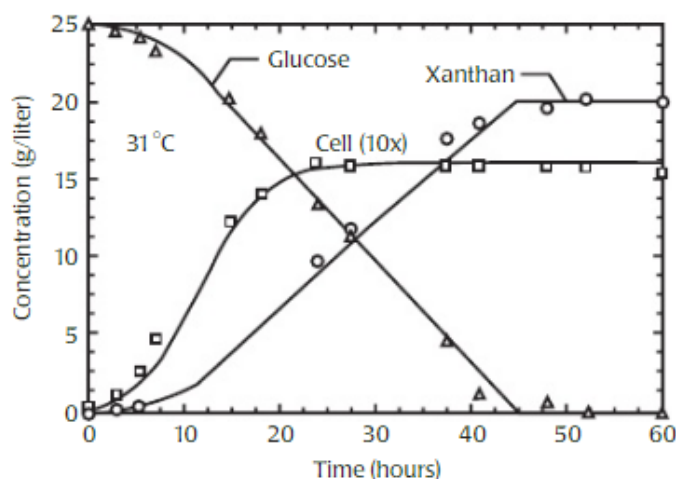
Komponentas	Saldžios išrūgos, %	Rūgščios išrūgos, %
Vanduo	93,6	93,5
Sausosios medžiagos	6,4	6,5
Baltymai	0,55	0,55
Nebaltyminis azotas	0,18	0,18
Riebalai	0,05	0,04
Laktozė	4,8	4,9
Pelenai	0,5	0,8

Didžiausi pasiekimai mikrobinės genetikos srityje yra paremti mutacijų, kurias gali sukelti cheminiai ir fiziniai mutagenai, pvz., ultravioletinė spinduliuotė, tyrimais.

1.6 Komerčinė ksantano gamyba

Pramoninėje gamyboje gali būti taikoma tiek periodinė, tiek nepertraukiama fermentacija. Deja, taikant periodinę fermentaciją gaunama prastesnė išeiga dėl mažo ląstelių gyvybingumo, kai, tuo tarpu, nepertraukiamos fermentacijos metu net iki 80 % substrato bakterijos gali paversti ksantanu.

Tipinė komercinė ksantano gamyba periodiniu būdu prasideda nuo *X. campestris* pv. *campestris* inokuliuoto paruošimo ir perkėlimo į bioreaktorių, į fermentacijos terpę. Inokuliuoto paruošimas apima kelis etapus, kurių metu reikalingi bioreaktoriai nuo 10 litrų talpos – pradinėms kultūroms, iki 100 m³ – fermentacijai. Fermentacijos metu užtikrinamas ne mažesnis kaip 1kW/m³ nuolatinis maišymas, palaikoma 28-30 °C temperatūra, pH vertė svyruoja apie 7. Kadangi naudojami aerobiniai mikroorganizmai, fermentacijos terpė aeruojama ne mažesniu kaip 0,3 v/v (tūrio vienetas/ tūrio vienetas). Fermentacijos procesas trunka apie 100 valandų, per šį laiką apie 50 % gliukozės yra paverčiama į produktą. Proceso pradžioje greitai suvartojamas azoto šaltinis, bakterijų skaičius auga geometrinės progresijos seka, vėliau pradedamas vartoti gliukozės šaltinis ir produkuojamas polisacharidas [3]. Gliukozės koncentracijos mažėjimo bei biomasės ir produkto augimo schema vykstant fermentacijai iki 60 valandų pateikta 1.4 paveiksle.



1.4 pav. *X. campestris* bakterijų augimas, gliukozės suvartojimas ir ksantano formavimasis [1]

Po fermentacijos terpė pasterizuojama. Šio etapo metu inaktyvuojami fermentai ir sunaikinamos bakterijų ląstelės. Polisacharido išskyrimui dažniausiai naudojamas didelis kiekis alkoholio. Po nusodinimo ksantanas išdžiovinamas purkštuvinėje džiovvykloje ar liofilizatoriuje arba papildomai praplaunamas vandeniu, pakartotinai nusodinamas alkoholiu ir tik tada išdžiovinamas. Papildomas plovimas užtikrina kietųjų dalelių, tokių kaip mikroorganizmų ląstelių likučiai, organiniai likučiai ir pigmentai, pašalinimą. Išdžiovintas ksantanas susmulkinama į miltelius [3].

Jei gaminamą ksantaną numatoma naudoti maisto pramonėje, reikalinga neutralizacijos reakcija. Šoninių grandinių sudėtyje esanti glukurono rūgštis bei piruvato likučiai stipriai sumažina produkto pH, todėl rūgštys neutralizuojamos naudojant natrio, kalio ar kalcio jonus [7]. Fizikinės komercinio ksantano savybės pateikiamos 1.2 lentelėje.

1.2 lentelė. Fizikinės komercinio ksantano savybės

Savybė	Vertė
Fizinė būseną	Kreminės spalvos milteliai
Drėgmė, %	8-15
Pelenų kiekis, %	7-12
Azoto kiekis, %	0,3-1,0
Acetato kiekis, %	1,9-6,0
Piruvato kiekis, %	1,0-5,7
Vienvalenčių druskų kiekis, g/l	3,6-14,3
Dvivalenčių druskų kiekis, g/l	0,085-0,17
Klampa, cP	13-35

1.7 Faktoriai, turintys įtaką gamybos procesui

Siekiant išgauti didžiausią produkto išėigą ir geriausias savybes, būtina įvertinti bioreaktoriaus parametrus, t. y. nustatyti fermentacijos tipą, terpės sudėtį, proceso parametrus – temperatūrą, pH vertę, maišymo greitį, aeravimo bei pačios fermentacijos trukmę [5].

1.7.1 Anglies šaltinio įtaka

Atlikti bandymai naudojant fruktozę, laktozę, sorbitolį, maltozę, ksilozę ir kitas medžiagas, bet nustatyta, kad geriausia ksantano išėiga bei aukščiausia kokybė gaunama, kai anglies šaltinis yra gliukozė arba sacharozė. Atlikus tyrimus nustatyta, kad naudojant gliukozę gaunama 14,744 g/l ksantano išėiga, kai, tuo tarpu, naudojant fruktozę – 5,232 g/l, o sorbitolį – 1,401 g/l [3]. Remiantis mokslininkų atliktais tyrimais, optimaliausia išėiga pasiekama naudojant mitybinę terpę, kurios sudėtyje yra 4 % sacharozės ar gliukozės [8]. Vis dėlto, kylanti gliukozės kaina verčia gamintojus ieškoti alternatyvių žaliavų ksantano gamybai. Dėl šios priežasties, substratais naudojami miežiai, hidrolizuoti ryžiai, kukurūzų miltai, kviečiai, cukranendrių cukrus, persikų pulpa. Pakeitus substratą galutinis produktas kardinaliai nepasikeičia, kadangi anglies šaltinis neturi įtakos produkuojamo polisacharido molekulės pagrindui, tačiau pastarasis lemia šoninių grandinių struktūrą, molekulinę masę, išėigą [3].

1.7.2 Azoto šaltinio įtaka

Pramoninėje ksantano gamyboje naudojama 0,05 – 0,1 % medžiagos, veikiančios kaip azoto šaltinis, pvz., mielių ekstrakto, peptono, amonio nitrato ar urėjos, natrio nitrato. Dėl tinkamiausio azoto šaltinio mokslininkų nuomonės išsiskiria. Vieni tvirtina, kad klampesni ksantano tirpalai gaunami, kai polisacharido gamyboje pritaikomų terpių sudėtyje naudojamas amonio hidrofosfatas, kitiems tyrėjams tinkamesnis azoto šaltinis glutamatas [9].

Taip pat, atlikus tyrimus nustatyta, kad naudojant amonio jonus *X. campestris* bakterijų ląstelių augimo greitis 0,52 mmol/g per valandą, o naudojant nitrato jonus – 0,79 mmol/g per valandą, o acetilo ir piruvato pakaitų kiekis molekulėje sudaro atitinkamai 4,6 % ir 6 %. Biomase geriausiai auga kaip anglies šaltinį naudojant amonio jonus, o didžiausia išėiga gaunama, kai naudojamas nitratas. Pastebėta, kad kai mitybinėje terpėje yra abu minėtieji komponentai, pirmiausia išėikvojamos amonio druskos. Taip pat tyrimų metu nustatyta, kad azoto šaltinio koncentracija ksantano molekulinei masei įtakos neturi [3].

1.7.3 Temperatūros įtaka

Temperatūra yra labai svarbus kintamasis. *X. campestris* bakterijų ląstelės geriausiai auga esant 24-27 °C temperatūroje, kai, tuo tarpu, didžiausia ksantano išeiga gaunama esant 30-33 °C temperatūrai. Atsižvelgiant į tai, pramoninėje gamyboje fermentacijos metu palaikoma 28 °C temperatūra [1]. Proceso metu palaikant 25 °C temperatūrą gaunama didžiausia ksantano molekulinė masė, tačiau piruvato ir acetato pakaitų molekulėje yra mažiausias [3].

1.7.4 pH įtaka

Dėl pH kontroliavimo fermentacijos metu specialistų nuomonė nėra vieninga. Vienur teigiama, kad pH reguliavimas proceso metu būtinas, kadangi pH vertei sumažėjus iki 5, bakterijos nustoja produkuoti ksantaną. Tokia situacija galima todėl, kad vienas iš fermentacijos produktų – rūgštys, tad norint palaikyti pH kuo arčiau neutralios vertės papildomai pridedama natrio arba kalio šarmo [1]. Kiti mokslininkai teigia, kad pH gali būti reguliuojamas arba nereguliuojamas. Kai proceso metu pH kontroliuojamas, ksantano gamyba sustoja bakterijoms pasiekus stacionarią fazę, nepriklausomai nuo to, koks šarmas naudojamas pH reguliavimui. Jeigu proceso metu pH nekontroliuojamas, ksantano gamyba vyksta net ir bakterijoms pasiekus stacionarią fazę [10].

1.7.5 Fermentacijos tipo įtaka

Kol kas nėra vieningos nuomonės, kuris fermentacijos tipas yra tinkamesnis. Vieni specialistai tvirtina, kad geriau naudotini periodinės fermentacijos tipą, kadangi tokiu atveju yra daug mažiau kontroliuojamų parametru. Kituose moksliniuose šaltiniuose labiau rekomenduojama taikyti nepertraukiamą fermentaciją, kadangi periodinės fermentacijos metu aplinkos keitimasis bakterijų augimo ciklo metu gali sukelti toksinių medžiagų produkavimą, ekstremalų pH arba maistinių medžiagų išsekimą. Tuo tarpu, nepertraukiamos fermentacijos metu terpė nuolat praskiedžiama ir pašalinama iš fermentavimo talpų, todėl nėra galimybės susidaryti jokioms ekstremalioms sąlygoms. Vis dėlto, vykdant nepertraukiamą fermentaciją sudėtinga išlaikyti sterilumą ir yra tikimybė mutavusių *X. campestris* bakterijų, kurios negamina reikiamo polisacharido, atsiradimui. Nepaisant to, nepertraukiamas procesas yra ekonomiškai tinkamesnis ir su tinkamai parinktais parametrais gali vykti iki 2000 valandų [3].

Dar vienas periodinės fermentacijos trūkumas – maišymas. Tai būtina fermentacijos sąlyga – taip padidinamas sąlytis su oru, kas paskatina deguonies įsisavinimą. Deguonis reikalingas mikroorganizmams augti bei polimero komponentų sintezei, taip pat redukuotų piridino nukleotidų oksidacijai. Dėl ksantano struktūros klampumo, periodinės fermentacijos metu mitybinė terpė tampa itin tiršta, todėl ją sudėtinga maišyti [1]. Maišymo metu yra tikimybė suardyti bakterijų ląsteles, tačiau atsiranda specialistų, siūlančių naudoti periodinę fermentaciją, ir teigiančių, kad ląstelių suardymo problemą galima išspręsti pridedant medvilninės vatos ar kito audinio, ant kurio adsorbuojasi mikroorganizmai ir taip užtikrinama natūrali fizinė bakterijų ir skystosios fazės, kurioje yra maistinių medžiagų bei fermentacijos produktų, atskirtis [3]. Vis dėlto, norint, kad metodas, kai naudojama vilna, medvilnė ar kitoks audeklas, visiškai pasiteisintų reikalingi naujo dizaino bioreaktoriai, kuriuose skysta terpė ir oras galėtų judėti laisvai per porėtą pluoštinę matricą. Tokiu atveju, būtų užtikrintas geras mikroorganizmų, adsorbuotų ant audeklo, ir maisto medžiagų kontaktas. Ši strategija turėtų pagerinti deguonies pernašą, taip pat galėtų padidinti reakcijos greitį bei sulėtinti mutacijos augimą [11].

1.7.6 Kiti faktoriai

Tyrimų metu nustatyta, kad organinės rūgštys, tokios kaip sukcinatas, piruvatas ar α -ketoglutaratas, ksantano gamybos procese veikia kaip inhibitoriai. Vis dėlto, apie citrato naudojimą teigiama priešingai – 0,09 – 0,18 % citrato paspartina procesą [9].

Magnio ir fosfato jonų trūkumas lemia mažesnę piruvato grupių susidarymą ksantano molekulėje, o esant amonio jonų trūkumui – padidėja polisacharido išėiga. Tuo pačiu nustatyta, kad ilgėjant fermentacijos trukmei didėja piruvato ir acetilo pakaitų kiekis.

Didelė mielių ekstrakto koncentracija padeda pasiekti didelį bakterijų tankį dar prieš joms pasiekiant stacionarią fazę [3].

1.8 Panaudojimas

Dėka savo fizikinių savybių, ksantanas, kitaip dar vadinamas ksantano guma ar ksantano derva, plačiai naudojamas įvairiose pramonės šakose – kosmetikos, naftos, žemės ūkio, maisto pramonėje. Taipogi, be šio mikrobinio hidrokoloido neapsieinama ir medicinoje [6].

Šiuo metu apie 65 % viso pasaulyje pagaminamo ksantano panaudojama maisto pramonėje, 15 % naftos pramonėje ir 20 % kitose srityse [7]. Pagrindinės ksantano panaudojimo sritys, rekomenduojama koncentracija bei atliekamos funkcijos pateiktos 1.3 lentelėje.

1.3 lentelė. Ksantano panaudojimo sritys [1, 7]

Panaudojimo sritis	Koncentracija, %	Funkcija
Maisto pramonė:		
Padažai	0,1-0,5	Emulsijų stabilizatorius, tirštiklis
Sirupai	0,05-0,2	Tirštiklis, užtikrina stabilumą kaitinant ir tolygų klampumą
Gėrimai	0,05-0,2	Stabilizatorius
Šaldytas maistas	0,05-0,2	Pagerina stabilumą po užšaldymo ir atšildymo
Greitai paruošiamos sriubos	0,3-0,5	Užtikrina didelę klampą
Pieno produktai	0,05-0,5	Tirštiklis, emulsijų stabilizatorius, lėtina sinerezę
Mėsos produktai	0,05-0,5	Suriša laisvą vandenį, lėtina sinerezę
Duonos gaminiai be glitimo	0,2-0,5	Imituoja viskoelastines glitimo savybes, suteikia duonai „trupančią“ struktūrą
Farmacijos ir kosmetikos pramonė:		
Kremai	0,1-1,0	Emulsijų stabilizatorius
Šampūnai, dantų pasta, skystas muilas	0,2-1,0	Pagerina tekėjimo savybes ir putojimo stabilumą
Prailginto atpalaidavimo tabletės	0,2-1,0	Reguliuoja suirimo greitį
Žemės ūkio pramonė:		
Pašarų priedai	0,03-0,4	Suspensijų stabilizatorius
Trąšos	0,03-0,4	Suspensijų stabilizatorius, pagerina trąšų išsilaikymą
Naftos pramonė:		
Naftos išgavimas	0,05-0,4	Tirštiklis, įtrauktas į tirpalų, naudojamų grąžo apiplovimui, sudėtį; padidina vandens klampą, taip pagerinant naftos ištraukimą

1.3 lentelės tęsinys

Kitos pramonės šakos:		
Tekstilės dažymas	0,2-0,5	Pagerina dažų tekėjimo savybes
Spausdinimas ant tekstilės	0,2-0,5	Pagerina spausdinimui naudojamų putų stabilumą aukštoje temperatūroje
Keraminė glazūra	0,2-0,05	Stingdantis agentas

1.8.1 Maisto pramonė

Jungtinėse Amerikos Valstijose maisto pramonėje ksantano pradėtas naudoti 1969 m [3]. Šiuo metu Europos Sąjungos maisto priedų sąrašė ksantanas žymimas numeriu E 415. Daugumoje maisto produktų gali būti naudojamas pagal poreikį (*quantum satis*), išskyrus džemus, želė, marmeladus ir saldintą kaštainių tyrę, perdirbtus grūdinius maisto produktus bei maistą kūdikiams, kuriuose maksimalus leidžiamas šio priedo kiekis 10000 mg/kg ar mg/l. Grūdiniuose produktuose be glitimo maksimalus leidžiamas šio priedo kiekis 20000 mg/kg ar mg/l. Maksimali dozė 1200 mg/kg arba mg/l specialios medicininės paskirties maisto produktuose kūdikiams bei mažiems vaikams [12].

Dėka savo fizikinių savybių, ksantanas veikia kaip tirštiklis, emulsijų ir suspensijų stabilizatorius, kas daro teigiamą įtaką maisto produktų reologinėms savybėms [6]. Dėl savybės suteikti reikiamą konsistenciją nepakeičiant galutinio produkto skonio, ksantanas naudojamas labai skirtingose maisto pramonės srityse – salotų padažų, ledų, mėsos, pieno produktų, duonos, gėrimų gamyboje [8]. Dažniausiai maisto pramonėje naudojama ksantano koncentracija 0,05-0,5 %. Maisto pramonėje naudojamas ksantanas turi būti gaminama kaip natrio, kalio arba kalcio druska [7].

1.8.1.1 Duonos pramonė

Ksantanas prailgina duonos tinkamumo vartoti terminą, kadangi lėtina krakmolo retrogradacijos procesą. Taip pat ksantanas yra naudojamas duonos be glitimo gamyboje. Šis priedas suteikia norimą produkto konsistencijos, pavyzdžiui, trupėjimo pojūtį burnoje [7].

1.8.1.2 Mėsos pramonė

Ksantanas yra miltelių pavidalo, todėl lengvai tirpsta vandenyje ir sūrymuose. Dėl didelio tirpumo ir gebėjimo sujungti laisvą vandenį, mėsos gaminiuose ksantanas naudojamas kaip drėgmę sulaikantis agentas. Ksantano įsiterpimas tarp baltymų ryšių apibrėžiamas labiau kaip fizinis intarpas negu cheminė reakcija. Taip pat, dėl gebėjimo sudaryti didelės klampos skysčius bei sulaikyti kietąsias daleles, pavyzdžiui, prieskonius, šis maisto priedas naudojamas ir marinatų gamyboje. Dažniausiai naudojama apie 0,5 % nuo receptūros kiekio. Priklausomai nuo reikiamos gaminio išėigos, ksantano kiekis gali būti sumažintas ir iki 0,3-0,4 % [7].

1.8.2 Kosmetikos pramonė

Dauguma kūno priežiūros priemonių yra sudarytos iš vandeninių ir riebalinių komponentų. Taigi, siekiant, išvengti fazių susisluoksniavimo naudojami emulsijų stabilizatoriai. Šiuo atveju, ksantanas yra vienas dažniausių pasirinkimų. Polisacharidas taip pat naudojamas kaip tirštiklis kremų, šampūnų bei kitų higienos priemonių gamyboje [7]. Tačiau bene svarbiausia ir pagrindinė ksantano panaudojimo kosmetikos pramonėje sritis – dantų pastos gamyba. Polisacharido fizikinės savybės lemia galimybę pastą išspausti iš tūbelės, taip pat užtikrina standų pastos išsilaikymą ant dantų šepetuko [13].

1.8.3 Farmacijos pramonė

Dėka savo reologinių savybių ksantanas naudojamas suspensijų gamyboje, kaip tirštiklis, stabilizatorius ar medžiaga, suspenduojanti kietas daleles. Taip pat ksantanas naudojamas prailginto veikimo vaistų gamyboje, kur polisacharidas naudojamas hidrogeliui sudaryti. Prailginto veikimo vaistų veikimas pagrįstas veikliosios medžiagos išsiskyrimu tik po kurio laiko suvartojus vaistą [14]. Dėl biologinio suderinamumo ir struktūrinio panašumo į hialurono rūgštį, esančią kremzlėse, ksantanas naudojamas kaip biomimetinis vaistas, skirtas žmonių, sergančių osteoartritu, audiniams atkurti [15].

Dar viena sritis, kur naudojamas ksantanas – auksinių nanodalelių, taikomų vėžiui gydyti, gamyba. Čia biopolisacharidas pritaikomas kaip stabilizatorius ir redukuojantis agentas. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad padengus auksines nanodaleles polisacharidu, jų koloidinis stabilumas padidėja [16].

1.8.4 Žemės ūkio pramonė

Žemės ūkio pramonėje minėtasis polisacharidas naudojamas siekiant pagerinti fungicidų, herbicidų ir insekticidų tirpalų galimybę tekėti [8]. Taip pat net ir maža ksantano koncentracija žemės ūkio pramonėje naudojamuose tirpaluose užtikrina tolygų netirpių ingredientų pasiskirstymą net po ilgo laikymo. Taip pat šio priedo naudojimas pagerina medžiagų, pavyzdžiui, trąšų, išpurškimą ir išsilaikymą ant augalų [13].

1.8.5 Naftos pramonė

Suspensijų stabilizavimas net ir esant ekstremalioms temperatūros sąlygoms, didelėms druskos koncentracijoms yra pagrindinė priežastis, dėl ko ksantanas naudojamas naftos gręžimo skysčiuose kaip naftos išstūmimo agentas. Naftai išgauti naudojamas ksantanas, kurio molekulėje nėra piruvato pakaitų, kadangi šiuose procesuose nereikalingas mikrogelių susidarymas [13]. Naftos pramonėje sunaudojamas labai didelis gręžimo skysčio kiekis, kurio sudėtyje yra 4,28 g/l ksantano, todėl nuolat ieškomas pigesnis polisacharido pakaitalas. Vis dėlto, nėra lengva rasti „draugišką“ aplinkai, vandenyje tirpų, didelės molekulinės masės ir šakotos grandinės polimerą, pasižymintį tokiais pat reologinėmis savybėmis kaip ir ksantanas. Bandyta ksantaną pakeisti ksilogliukanu, tačiau bandymas nepasiteisino, kadangi gauto gręžimo skysčio reologinės savybės kur kas prastesnės [17].

1.9 Ekonominiai aspektai

Pasaulyje didėjant gaminių be glitimo paklausai, didėja ir ksantano paklausa, todėl jau iki 2022 m. planuojama peržengti 418 tūkst. tonų sunaudojimo ribą, kas sudarys 972 mln. JAV dolerių apyvartą, kai, tuo tarpu, 2016 m. buvo sunaudota vos 250 tūkst. tonų. Kaip jau minėta, pagrindinė ksantano panaudojimo sritis – maisto pramonė. Būtent šioje srityje pastebimas kasmetinis 6 % maisto priedo sunaudojimo augimas [18].

Ksantanas yra pakankamai brangus, t. y. 4,95-5,50 JAV dolerių už kilogramą, dėl gamyboje naudojamos gliukozės arba sacharozės, todėl vis dažniau siūloma šį polisacharidą gaminti panaudojant žemės ūkio ir pramonės atliekas, pavyzdžiui, cukrų melasas, poliolių. Vienas iš patraukliausių variantų – glicerolio, susidarančio biodyzelino gamybos metu, panaudojimas. Tokiu būdu pagamintas ksantanas negali būti naudojamas kaip maisto priedas [2]. Pagal pateiktą informaciją, šio baigiamojo magistro projekto tyrimas atliktas taip pat panaudojant alternatyvius anglies šaltinius – glicerolį ir kokosų palmių žiedų cukrų.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1 Tyrimo metu naudota įranga

2.1 lentelė. Naudota laboratorinė įranga ir inventorius

Įrengimo pavadinimas	Modelis/Gamintojas	Charakteristikos
Laminarinė traukos spinta	<i>Telstar BV 100</i>	Oro greitis 0,4 m/s, apšvietimas > 800 lux, triukšmas < 60 dB
Autoklavas	<i>Certoclav CV – EL</i>	Maksimali temperatūra 140 °C, maksimalus slėgis 2,7 bar
Svarstyklės	<i>Shimadzu ATX 8400</i>	Padala 0,1 mg, svėrimo riba 82 g
pH metras	<i>Winlab</i>	pH riba -1,00-15,00, paklaida 0,01
Mėgintuvėlių maišyklė	<i>Biosan BioVortex VI</i>	Maišymo greitis 500-3000 rpm
Magnetinė maišyklė	<i>Heidolph Mr Hei – Tec</i>	Temperatūros intervalas 20-300 °C, maišymo greitis 100-1400 rpm
Termostatas	<i>Binder BD23</i>	20 l talpos, temperatūros intervalas 5-100 °C
Termostatas – maišyklė	<i>Biosan ES – 20</i>	Temperatūros intervalas 5-42 °C, maišymo greitis 50-250 rpm
Centrifuga	<i>Universal 320 R</i>	Temperatūros intervalas -20-4 °C
Vandens vonelė	<i>Memmert WNE 7</i>	7l talpos, temperatūros intervalas 5-95 °C
Spektrofotometras	<i>Shimadzu UV – 1280</i>	Bangos ilgio intervalas 190-1100 nm
Inventorius		
Erlenmejerio kolbos		
Automatinės pipetės		
Vienkartiniai mėgintuvėliai		
Petri lėkštelė		
Mikrobiologinė kilpelė		
Kiuvetės		
Magnetas maišymui		

2.2 Tyrimo metu naudotos terpės

YM terpė (angl. *Yeast and Mold agar*) – selektyvi mitybinė terpė, naudojama mielėms, pelėsiams ar acidofiliniams mikroorganizmams kultivuoti. Terpės sudėtyje esantis peptonas yra anglies, azoto bei kitų būtinų mitybinių medžiagų šaltinis. Komponentas gliukozė – anglies bei energijos šaltinis. Salyklo ekstraktas veikia kaip papildomas anglies šaltinis, o mielių ekstrakto sudėtyje yra vitamino B ir kitų augimo faktorių [12].

Tyrimo metu naudotos dviejų tipų YM terpės – kieta ir skysta. Kietosios terpės sudėtyje papildomai naudotas agaras.

YM – T terpė – tai mitybinė terpė, savo sudėtimi labai panaši į YM terpę, tačiau papildomai turinti dar vieną azoto šaltinį – diamonio fosfatą [12].

2.2 lentelė. Mitybinės terpės ir jų sudėtis [19]

Komponentas	Koncentracija, g/l
YM terpė	
Gliukozė	10,000
Peptonas	5,000
Mielių ekstraktas	3,000
Salyklo ekstraktas	3,000
Agaras (<i>tik kietoje terpėje</i>)	20,000
YM – T terpė	
Gliukozė	10,000
Peptonas	5,000
Mielių ekstraktas	3,000
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,500
K ₂ HPO ₄	2,500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,050

Gliukozė (C₆H₁₂O₆) – monosacharidas, kitaip dar vadinamas dekstroze, sudėtyje turintis šešis anglies atomus ir aldehido grupę. Tai saldi, gerai tirpstanti vandenyje kristalinė medžiaga. Gliukozė yra pirminis gyvųjų organizmų energijos šaltinis. Naudoto komponento sudėtyje D-gliukozės yra ne mažiau kaip 99,5 % sausųjų medžiagų masės [20].

Peptonas – tai nevysiškos baltymų hidrolizės produktas. Peptonas dažniausiai gaminamas vykdant fermentinę ar rūgštinę mėsos audinių ar pieno hidrolizę. Pastarasis vertinamas kaip vienas geriausių aminorūgščių, peptidų ar baltymų šaltinių, todėl naudojamas mikroorganizmų mitybinių terpių sudėtyje [21].

Mielių ekstraktas – tai azotinių junginių, anglies, sieros, mikroelementų ir vitamino B kompleksas, gaunamas vykdant mielių ląstelių autolizę. Vykdoma fermentacija, kurios metu mielių ląstelės auginamos iki tokios didelės koncentracijos, kad žūva, dėl ko suyra ląstelių sienelės. Dėl ypatingai geros sudėties mielių ekstraktai naudojami mikrobiologinių terpių gamyboje [22].

Salyklo ekstraktas – tai krakmolo ar grūdų pagrindu pagamintas saldiklis. Dažniausiai gamyba vyksta grūdus sumaišant su vandeniu, taip sudarant galimybę fermentams suskaidyti krakmolą ir baltyminę grūdų dalį. Netirpios medžiagos pašalinamos, o tirpalas koncentruojamas iki kol gaunamas stabilus klampus sirupas, kurį išdžiovinus gaunami milteliai. Dėl natūraliai grūduose esančių fermentų, salyklo ekstraktas labai panašus į maltozės sirupus [23].

Agaras – angliavandenių kompleksas, kurį sudaro 70 % linijinio polisacharido agarozės ir 30 % šakotos grandinės komponento – agaropektino. Agarozė sudaryta iš kintančių β-D-galaktozės ir 3,6-anhidro-α-L-galaktozės fragmentų. Agaropektiną sudaro D-galaktozės monomerinės grandys. Tai miltelių pavidalo medžiaga, netirpstanti šaltame vandenyje, bet gerai tirpstanti 95-100 °C temperatūros vandenyje, o temperatūrai vėstant iki 45 °C prasideda tirpalų želatinizacija. Europos Sąjungos maisto priedų sąrašė agaras žymima E 406 [24].

Amonio hidrofosfatas ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) – baltos spalvos kristalinė medžiaga, naudojama kaip azoto ir fosforo šaltinis, reikalingas bakterijoms augti [25].

Kalio hidrofosfatas (K_2HPO_4) – labai gerai vandenyje tirpi medžiaga, naudojama kaip kalio ir fosforo šaltinis bakterijoms augti [26].

Magnio sulfatas ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – tai heptahidrato sulfato mineralinis epsomitas, kitaip dar vadinamas Epsom druska. Ši neorganinė druska naudojama kaip magnio šaltinis mikroorganizmams augti [27].

Produkcijos terpė – tai ksantano gamybai reikalingų komponentų rinkinys. Terpės sudėtyje yra bakterijoms reikalingi anglies, azoto, fosfato, citrato ir kitų medžiagų šaltiniai.

2.3 lentelė. Produkcijos terpės sudėtis [19]

Komponentas	Koncentracija, g/l
<i>Anglies šaltinis</i>	40,000
Citrinų rūgštis	2,100
NH_4NO_2	1,140
KH_2PO_4	2,860
MgCl_2	0,500
Na_2SO_4	0,080
H_3BO_3	0,006
ZnO	0,006
FeCl_3	0,020
CoCO_3	0,020

Citrinų rūgštis ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) – tai terpės rūgštingumą reguliuojanti medžiaga, pramonėje išgaunama angliavandenių fermentacijos metu, panaudojant grybą *Aspergillus niger*. Ši medžiaga Europos Sąjungos maisto priedų sąraše žymima E 330 [28].

Amonio nitritas (NH_4NO_2) – visiškai nestabili amonio druska, į vandenį ir azotą skylanti jau kambario temperatūroje. Produkcijos terpėje šis komponentas naudojamas kaip azoto šaltinis [29].

Monokalio fosfatas (KH_2PO_4) – didelė buferine talpa pasižyminti, vandenyje tirpi kalio druska, naudojama kaip kalio ir fosforo šaltinis mikroorganizmams [30].

Magnio chloridas (MgCl_2) – gerai vandenyje tirpi magnio druska, naudojama kaip magnio jonų šaltinis. Ši druska terpių sudėtyje gali būti naudojama tik mažomis koncentracijomis, priešingu atveju, pasireiškia inhibitorinis poveikis bakterijų augimui [31].

Natrio sulfatas (Na_2SO_4) – natrio druska, vandenyje disocijuojanti į natrio ir sulfato jonus. Mikrobiologinių terpių gamyboje natrio sulfatas naudojamas kaip natrio šaltinis [32].

Boro rūgštis (H_3BO_3) – silpna rūgštis, dažniausiai naudojama buferiniuose tirpaluose, tirpi tiek vandenyje tiek etanolyje. Ši rūgštis pasižymi antivirusinėmis ir fungicidinėmis savybėmis [33].

Cinko oksidas (ZnO) – tai neorganinis oksidas, netirpus vandenyje. Produkcijos terpėje naudojamas kaip cinko šaltinis [34].

Geležies chloridas (FeCl₃) – vandenyje tirpi geležies druska. Tirpimo metu ši medžiaga dalinai hidrolizuoja, vyksta egzoterminė reakcija ir susidaro labai rūgštus druskos rūgštis tirpalas, naudojamas nuotekų valymo procesuose arba geriamojo vandens gamyboje [35].

Kobalto karbonatas (CoCO₃) – rožinės spalvos miltelių pavidalo kobalto druska [36].

Tyrimas buvo atliekamas produkcijos terpės sudėtyje pakeičiant 9 skirtingus anglies šaltinius, tačiau nekeičiant jo koncentracijos. Medžiagos, naudotos kaip anglies šaltinis:

Gliukozė – šis komponentas naudotas YM terpės sudėtyje ir yra aprašytas anksčiau.

Fruktozė – tai gliukozės izomeras, saldesnis tiek už pačią gliukozę, tiek už sacharozę. Šis angliavandenis gali būti ir kietosios, ir skystosios būsenos [37]. Fruktozė tirpi vandenyje ir šiek tiek tirpi etanolyje, jos kiekis augaluose ar vaisiuose mažėja jiems bręstant. Kaip ir gliukozė, tai yra redukuojantis sacharidas, tik vietoje aldehido grupės, fruktozės sudėtyje yra keto grupė [38];

Sacharozė – tai populiariausias cukrus pasaulyje. Šis disacharidas, sudarytas iš α -1,2-glikozidiniu ryšiu sujungtų gliukozės ir fruktozės molekulių [39]. Sacharozė tirpsta tiek vandenyje, tiek etanolyje, o jos kristalai yra monoklininės prizmės formos [38];

Maltozė – disacharidas, sudarytas iš dviejų α -1,4-glikozidiniu ryšiu sujungtų gliukozės molekulių [39];

Nerafinuotas cukranendrių cukrus – tai iš vienos iš trijų cukranendrių augalo (lot. *Saccharum officinarum*, *Saccharum robustum*, *Saccharum spontaneum*) rūšių išgaunamas cukrus, kurio sudėtyje yra sacharozė ir invertuotas cukrus. Pastarojo kiekis priklauso nuo augalo brandos. Kuo cukranendrės labiau subrendusios, tuo mažiau invertuoto cukraus jose yra. Invertuoto cukraus kiekis gali stipriai padidėti perlaikius cukranendres laukuose.

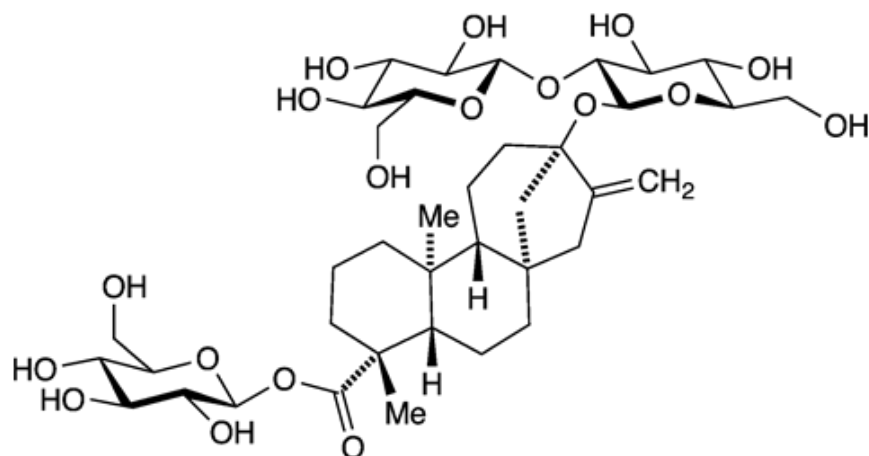
Invertuotas cukrus – tai rūgštimis arba invertazės fermentu veikiant sacharozę gaunamas monosacharidų mišinys, sudarytas, santykiu 1:1, iš D-gliukozės ir D-fruktozės [40];

Manitolis – natūralus angliavandenis alkoholis. Tai bespalvis saldus junginys, naudojamas kaip cukraus pakaitalas ir Europos Sąjungos maisto priedų sąrašė žymimas E 421 [41];

Saldiklių mišinys „Stevia“ – eritritolio pagrindu (99,8 %) sudarytas saldiklių mišinys, kurio sudėtyje yra 0,2 % steviolio glikozidų ekstrakto.

- **Eritritolis** – tai keturis anglies atomus turintis poliolis, gaunamas iš gliukozės, pasitelkiant *Aureobasidium* genties mikroorganizmus, taip pat gali būti gaminamas naudojant osmofilines mieles arba *Pseudozyma tsukubaensis* bakterijas. Tai natūralus saldiklis, kurio saldumas 75-80 % prilygsta sacharozės saldumui. Eritritolis yra nehigroskopinė medžiaga, naudojama kaip cukraus pakaitalas cukriniu diabetu sergančių žmonių mityboje. Šis saldiklis JAV Maisto ir Vaistų Administracijos maistiniu požiūriu pripažintas esantis saugus vartoti [42].
- **Steviolio glikozidai** – tai saldžiosios stevijos (lot. *Stevia rebaudiana*) lapuose esančių saldiklių grupė, kurie yra iki 300 kartų saldesni už sacharozę. Į komerciniams tikslams naudojamo ekstrakto sudėtį įeina steviozidas, rebaudiozidai A, B, C, D, E ir kiti junginiai. Pagrindinis komponentas, kurio ekstrakto sudėtyje yra apie 80 %, – steviozidas, sudarytas iš

necukrinės dalies – steviolio ir trijų gliukozės molekulių [43]. Remiantis JAV Maisto ir Vaistų Administracijos duomenimis, maistiniu požiūriu steviolio glikozidai pripažinti esantys saugūs vartoti [44].



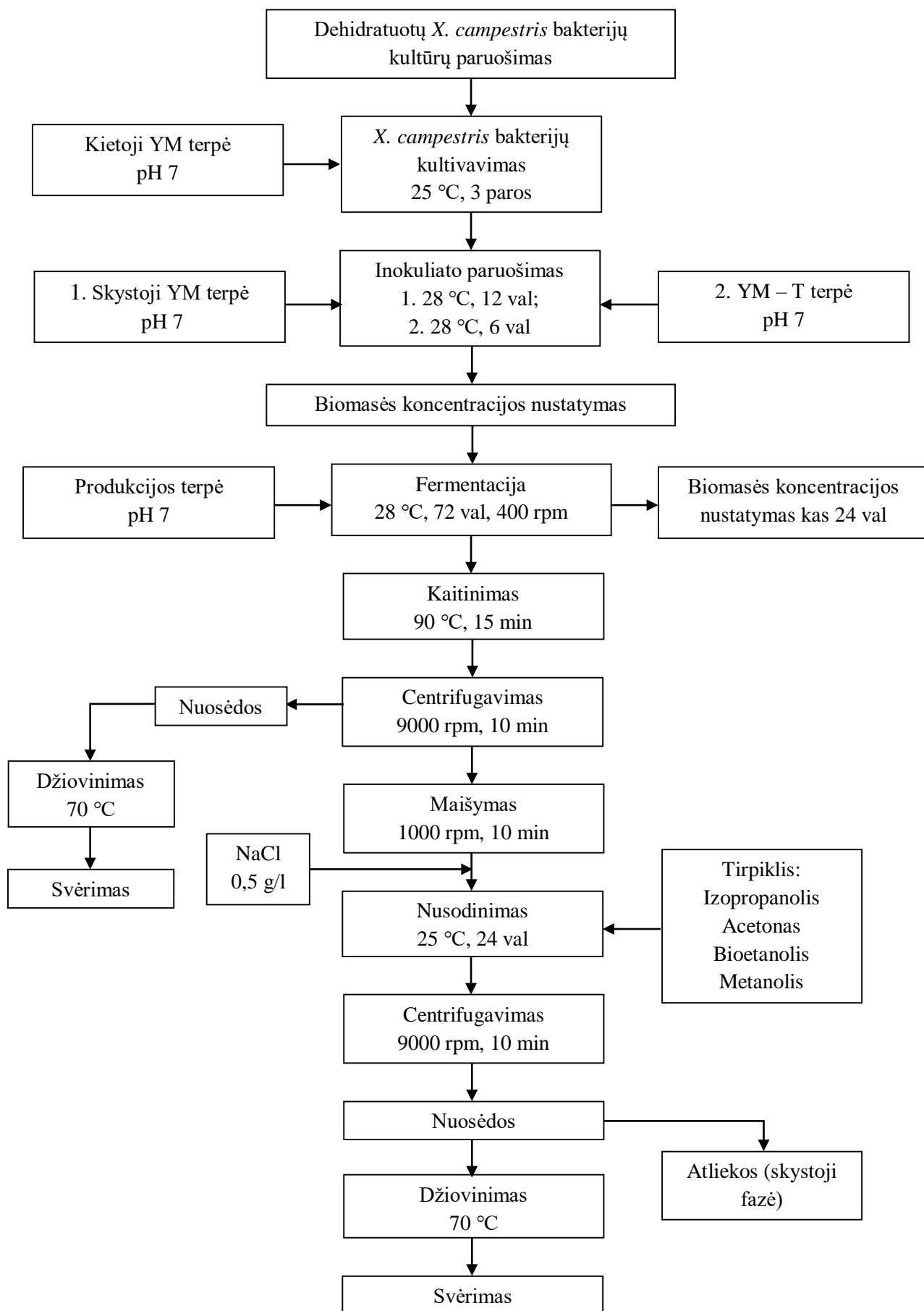
2.1 pav. Steviozido struktūrinė formulė

Glicerolis ($C_3H_8O_6$) – tirštas, tąsus, bekvapis, bespalvis poliolis, tirpus alkoholyje ir vandenyje. Tai dirbtinis saldiklis, Europos Sąjungos maisto priedų sąrašė žymimas E 422 [2]. Glicerolis yra šalutinis biodyzelino gamybos produktas, susidarantis triacilglicerolių transesterifikacijos metu. Šis poliolis stabilus esant normalioms aplinkos sąlygoms, t. y. esant 0 °C temperatūrai ir 1 atm slėgiui, nedirginantis, tinkamas sąveikai su kitais cheminiais junginiais ir neturintis neigiamo poveikio aplinkai [45];

Kokosų palmių žiedų cukrus – iš kokosų palmių (lot. *Cocos nucifera*) išgaunamas cukrus, sudarytas iš trijų pagrindinių angliavandenių – apie 85 % sacharozės, 3 % fruktozės ir 2 % gliukozės. Šio cukraus gamyba prasideda nuo sulos, kuri sudaryta iš 80 % vandens ir 12-15 % sacharozės, surinkimo. Vandenį garinant susidaro tirštas sirupas, iš kurio toliau formuojamas kristalinės, blokinės ar pastos formos cukrus. Iš esmės, galutinė produkto būseną priklauso nuo sirupo drėgmės kiekio. Kokosų palmių žiedų cukraus sudėtyje yra net 16 aminorūgščių, taip pat gausu mineralinių medžiagų – kalio, magnio, cinko, geležies, kalcio ir kitų [46].

2.3 Tyrimo eiga

Ksantano gavimo iš *X. campestris* bakterijų schema pateikta 2.2 paveiksle.



2.2 pav. Ksantano gavimo iš *X. campestris* bakterijų schema

2.3.1 YM terpių paruošimas

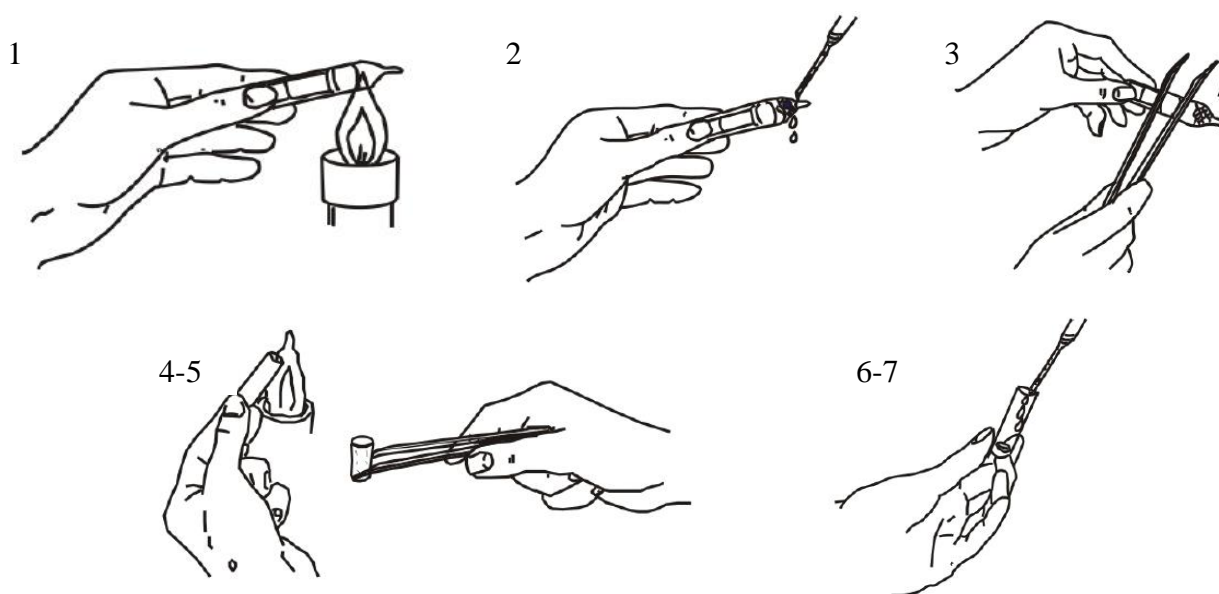
Visi komponentai, išskyrus gliukozę ir agarą, remiantis proporcijomis, pateiktomis 2.2 lentelėje, pasveriami, suberiami į vieną kolbą ir ištirpinami distiliuotame vandenyje. Gliukozė ir agaras ištirpinami distiliuotame vandenyje atskirose kolbose. Naudojant pH metrą nustatoma pagamintų tirpalų pH vertė, kurią reikia priartinti prie 7. Tai pasiekama lašinant 1 N ir 0,1 N koncentracijų sieros rūgšties ir natrio šarmo tirpalus. Pagaminti tirpalai autoklavuojami 15 min 121 °C temperatūroje, po to atvėsunami ir sumišomi į vieną kolbą. Gauta terpė padalinama į *Petri* lėkšteles ir paliekama stingti.

Skystoji YM terpė ruošiama analogiškai, tik nenaudojamas agaras. Po autoklavavimo gliukozės ir kitų komponentų tirpalai atvėsunami, sumaišomi, gauta mitybinė terpė dedama į šaldytuvą, kuriame palaikoma 6 °C temperatūra, ir jame laikoma iki naudojimo.

2.3.2 Dehidratuotų *Xanthomonas campestris* bakterijų kultūrų paruošimas

Tyrimui naudojamos išdžiovinotos *X. campestris* bakterijų kultūros, patalpintos ampulėje, kurioje sudarytas vakuumas. Ampulės atidarymo ir bakterijų rehidratavimo instrukcija:

1. ampulės galiukas pakaitinamas liepsnoje;
2. siekiant sudaužyti stiklą (ampulę) užlašinami 2-3 lašai vandens;
3. atsargiai metaliniu įrankiu nudaužiamas ampulės galiukas;
4. žnyplėmis pašalinama izoliacinė medžiaga ir išimama vidinė kapsulė;
5. naudojant žnyples ištraukiamas medvilninis kamštis, o viršutinė vidinės kapsulės dalis nudeginama liepsnoje;
6. į kapsulę įpilama 0,5 ml terpės rehidratavimui, uždengiama kamščiu ir paliekama 30 min;
7. naudojant mikrobiologinę kilpelę kapsulės turinys sumaišomas;
8. gautas mišinys perkeliamas į mėgintuvėlį su 5 ml rekomenduojamos skystosios terpės, iš kurios bakterijos gali būti sėjamos giluminiu ar paviršiniu būdu į kietąsias agaros terpes ar į skystąsias terpes.



2.3 pav. Dehidratuotų *X. campestris* bakterijų ampulės atidarymo ir rehidratavimo schema

2.3.3 *Xanthomonas campestris* bakterijų kultivavimas

X. campestris bakterijos sėjamos paviršiniu būdu naudojant mikrobiologinę kilpelę į kietąją YM terpę ir inkubuojamos 25 °C temperatūroje 3 paras.

2.3.4 YM – T terpės paruošimas

Mitybinė terpė ruošama analogiškai kaip ir skystoji YM terpė, pagal 2.2 lentelėje pateiktas sudedamųjų dalių koncentracijas.

2.3.5 Inokulianto paruošimas

Naudojant mikrobiologinę kilpelę 3 – jų dienų *X. campestris* bakterijos perkeliama į 7 ml skystosios YM terpės ir inkubuojama termostate-maišyklėje 28 °C temperatūroje 12 val. Inokuliantas perkeliama į 250 ml talpos Erlenmejerio kolbą, kurioje yra 43 ml YM – T terpės. Mišinys inkubuojamas termostate-maišyklėje, 28 °C temperatūroje 6 val.

2.3.6 Biomasės koncentracijos nustatymas

Prieš perkeliama bakterijas į YM – T terpę nustatoma biomasės koncentracija, t. y. į kiuvetę įpilama apie 1 ml inokulianto ir analizuojama spektrofotometru 600 nm bangos ilgyje. Kaip kontrolinis mėginys naudojamas YM terpės tirpalas. Prieš pradėdant fermentaciją atliekama ta pati procedūra, tik YM ir YM – T terpių mišinys analizuojamas 540 nm bangos ilgyje. Kaip kontrolinis mėginys naudojamas YM – T terpės tirpalas. Spektrofotometro rodmenys perskaičiuojami į biomasės koncentraciją pagal 2.1 formulę:

$$C\beta = 0,2845 \cdot OD_{600/540}, \text{ g/l} \quad (2.1)$$

čia:

$C\beta$ – biomasės koncentracija, g/l;

OD_{540} – spektrofotometro rodmenys.

2.3.7 Produkcijos terpės paruošimas

Produkcijos terpė ruošama pagal 2.3 lentelėje pateiktą receptūrą. Visi komponentai, išskyrus anglies šaltinį, pvz., sacharozę, pasveriami, suberiami į vieną kolbą ir ištirpinami distiliuotame vandenyje. Sacharozė ištirpinama atskirai. Naudojant pH metrą nustatoma pagamintų tirpalų pH vertė, kurią reikia priartinti prie 7. Tai pasiekama lašinant 1 N ir 0,1 N koncentracijų sieros rūgšties ir natrio šarmo tirpalus. Pagaminti tirpalai autoklavuojami 15 min 121 °C temperatūroje, po to atvėsunami ir sumišomi. Kiekvieno bandymo atveju kaip anglies šaltinis naudojama vis kita medžiaga.

2.3.8 Fermentacija

30 ml paruošto inokulianto įleidžiama į 500 ml Erlenmejerio kolbą, kurioje yra 200 ml produkcijos terpės. Fermentacijos terpė inkubuojama termostate-maišyklėje, 28 °C temperatūroje 72 val, esant 400 rpm maišyklės greičiui. Kas 24 val imami mėginiai biomasės koncentracijai nustatyti.

2.3.9 Biomės koncentracijos nustatymas

Į kiuvetę įpilama apie 1 ml fermentacijos terpės ir analizuojama spektrofotometru 540 nm bangos ilgyje. Kaip kontrolinis mėginys naudojama produkcijos terpė. Spektrofotometro rodmenys perskaičiuojami į biomasės koncentraciją pagal anksčiau pateiktą 2.1 formulę.

2.3.10 Ksantano išskyrimas

Fermentacijos terpė 15 min kaitinama vandens vonelėje, kur vandens temperatūra siekia 90 °C. Šio proceso metu padidinamas ksantano tirpumas, aukšta temperatūra sukelia *X. campestris* bakterijų suirimą bei baltymų, galinčių suardyti ksantaną ar sumažinti tirpalo klampą, denatūraciją. Po kaitinimo tirpalas atvėsinamas, padalinamas į 5 mėgintuvėlius ir centrifuguojamas 10 min esant 9000 rpm greičiui. Skystoji frakcija supilama atgal į kolbą, į ją taip pat įdedamas magnetukas. Siekiant sudaryti suspensiją ir išvengti išsisluoksniavimo maišoma 10 min ant magnetinės maišyklės esant 1000 rpm. Tada filtrate ištirpinama 0,1125 g NaCl (0,5 g/l).

Tuo tarpu, paruošiami 4 sterilūs užsukami mėgintuvėliai, užfiksuojamas jų svoris *mo*. Ištirpus NaCl, į mėgintuvėlius santykiu 3:1 pilamas tirpiklis ir centrifugatas. Mėgintuvėlių turinys išmaišomas momentine maišykle ir mėgintuvėliai dedami į termostatą-maišyklę parai, kur palaikoma 25 °C temperatūra.

Po nusodinimo tirpikliais tirpalas centrifuguojamas 10 min esant 9000 rpm greičiui. Nudekantuojama. Centrifugatas išpilamas į atliekų surinkimo talpas.

Ksantano nusodinimui pasirinkti 4 skirtingi tirpikliai:

Izopropanolis – tai pats paprasčiausias antrinis alkoholis, turintis stiprų būdingą kvapą ir pasižymintis antiseptinėmis savybėmis. Tai bespalvis degus alkoholis, tirpus vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, bet netirpus druskų tirpaluose, todėl gali būti išgrynintas įdėjus natrio ar geležies chlorido. Izopropanolis naudojamas dažnai naudojamas kaip tirpiklis, pavyzdžiui, kaip šio tyrimo atveju, ksantano nusodinimo reakcijoje [47].

Acetonas – kitaip dar vadinamas propanonas – yra paprasčiausias ketonų klasės junginys, natūraliai randamas augaluose, taip pat tai yra šalutinis gyvųjų organizmų metabolizmo produktas. Tai aštraus kvapo, bespalvis, lakus, degus skystis, bet kokiomis proporcijomis lengvai sumaišomas su vandeniu, alkoholiais, daugeliu angliavandenių ir kitais organiniais skysčiais. Acetonas pasižymi savybe gerai tirpinti augalinės bei gyvulinės kilmės riebalus, celiuliozę, natūralias ir sintetines dervas. Dėl šio privalumo ketonas plačiai žinomas kaip itin geras tirpiklis ir naudojamas daugelyje pramonės sričių [48].

Bioetanolis – bespalvis, būdingo kvapo alkoholis, gaunamas mikrobinės fermentacijos metu iš angliavandenių. Pirmosios kartos bioetanolis gaminamas iš augalinių žaliavų, pavyzdžiui, grūdų, kukurūzų, cukranendrių ir kt. Antrosios kartos bioetanolis gaminamas iš kukurūzų stiebų, šiaudų arba biomasės, kuri gaunama cukrų ar krakmolo hidrolizės ir fermentacijos metu. Biomasės atliekose yra kompleksas angliavandenių polimerų, tokių kaip celiuliozė, hemiceliuliozė, ligninas, kuriuos veikiant fermentais arba rūgštimis vyksta hidrolizė. Gautus hidrolizės produktus fermentuojant susidaro bioetanolis [49].

Metanolis – plačiai žinomas tirpiklis, naudojamas dažų, klijų, lakų bei kitų produktų gamyboje. Metilo alkoholis yra bespalvis, lakus, degus skystis, pasižymintis etanolio būdingu kvapu. Metanolis,

patekęs į žmogaus organizmą, fermento alkoholio dehidrogenazės pagalba suskaidomas į formaldehidą ir skruzdžių rūgštį. Pastaroji pasižymi toksiniu poveikiu neuronams, ypatingai tinklainės gangliono ląstelėms, dėl ko pirmiausia paveikiamas žmogaus regėjimas. Vėliau gali pasireikšti traukuliai, kvėpavimo sutrikimai, ištikti koma ar net mirtis. Apsinuodijimo atveju, į žmogaus organizmą leidžiamas etanolis, kuris konkuruoja su metanolio dėl fermento alkoholio dehidrogenazės, taip sulėtindamas metanolio metabolizmą iki toksiškų produktų [50].

2.3.11 Biomasės džiovinimas ir jos kiekio nustatymas

Pirmojo centrifugavimo metu mėgintuvėliuose likusios nuosėdos dedamos į termostatą, kur palaikoma 70 °C temperatūra. Džiovinama iki nebekintančios mėgintuvėlio su nuosėdomis masės. Išdžiovintos nuosėdos išimamos iš mėgintuvėlių ir pasveriamos. Gautas nuosėdų kiekis yra fermentacijos metu susidaręs biomasės kiekis.

2.3.12 Ksantano džiovinimas ir jo kiekio nustatymas

Po nusodinimo tirpikliais ir centrifugavimo gautos nuosėdos dedamos į termostatą, kur palaikoma 70 °C temperatūra. Džiovinama iki nebekintančios mėgintuvėlio su nuosėdomis masės. Išdžiovintus susidariusį ksantaną, mėgintuvėliai pasveriami, užregistruojamas jų svoris m_1 ir pagal 2.2 formulę apskaičiuojamas gamybos proceso metu, iš 10 ml fermentacijos terpės, išgautas ksantano kiekis [19]:

$$m_{\text{ksantano}} = m_1 - m_0, \text{ g}/10\text{ml}; \quad (2.2)$$

čia:

m_{ksantano} – ksantano masė, g;

m_1 – mėgintuvėlio su išdžiovintomis nuosėdomis masė, g;

m_0 – tuščio mėgintuvėlio masė, g.

Anksčiau aprašytas tik vienas iš daugelio ksantano gamybos iš *X. campestris* bakterijų variantų. Pavyzdžiui, viename iš analizuotų mokslinių straipsnių siūloma pakeisti inokuliacijos etape naudojamos YM terpės sudėtį. Vietoje, šiuo atveju, naudotos gliukozės, tyrime naudojama sacharozė, o vietoje peptono bei salyklo ekstrakto naudojamas citratas ir glutamatas. Siūlomos YM terpės pH vertė 6, o biomasė auginta 27 °C temperatūroje 24 val, kai, šio baigiamojo magistro projekto tyrimo atveju, procesas vyko 28 °C temperatūroje 12 val [9]. Kitame straipsnyje siūloma ksantano gamybos proceso metu panaudoti vištų plunksnas. Apie 10 % vištos svorio sudaro plunksnos, kurių sudėtyje yra 90 % keratino, potencialaus baltymų ir aminorūgščių šaltinio. Remiantis minėtomis savybėmis ir ekonomine nauda, iš šių bioorganinių atliekų siūloma gaminti peptoną, kuris būtų įtraukiamas į *X. campestris* bakterijų mitybinių terpių sudėtį. Moksliniame straipsnyje teigiama, kad lyginant su standartiniu ksantano gamybos metodu, naudojant peptoną iš vištų plunksnų pastebimas cukrų suvartojimo, biomasės augimo ir ksantano formavimo padidėjimas ir fermentacijos trukmės sumažėjimas. Tačiau taip pat nustatyta, kad naudojant didesnę nei 6 g/l peptono iš vištų plunksnų koncentraciją, jis pasižymi inhibitoriniu poveikiu dėl plunksnose esančios druskos bei toksinių medžiagų [51].

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Siekiant optimizuoti ksantano gavimą iš *X. campestris*, atlikti 9 bandymai, įvertinant 9 skirtingus substratus, t. y. anglies šaltinius:

- 1 bandymas. Sacharozė;
- 2 bandymas. Gliukozė;
- 3 bandymas. Maltozė;
- 4 bandymas. Cukranendrių cukrus;
- 5 bandymas. Fruktozė;
- 6 bandymas. Manitolis;
- 7 bandymas. Saldiklių mišinys „Stevia“;
- 8 bandymas. Glicerolis;
- 9 bandymas. Kokosų palmių žiedų cukrus.

3.1 Inokulianto koncentracijos įvertinimas

X. campestris bakterijas pasėjus ant selektyviosios YM agaro terpės, po 3 parų buvo pastebimos geltonos spalvos, stambios – 4-5 mm skersmens kolonijos. Šios kolonijos perkeltos į skystąją YM terpę, kur jų koncentracija nustatyta matuojant šviesos sugertį 600 nm bangos ilgyje. Remiantis spektrofotometro rodmenimis, pagal 2 – amę skyriuje pateiktą 2.1 formulę apskaičiuojama biomasės koncentracija:

$$C\beta = 0,2845 \cdot 0,834 = 0,237 \text{ g/l};$$

Tokios koncentracijos inokuliantas naudotas atliekant visus bandymus.

Inokuliatą perkėlus į YM – T terpę, biomasės koncentracija nustatyta matuojant šviesos sugertį 540 nm bangos ilgyje. Matavimai atlikti iš karto po perkėlimo ir po 6 val trukusios inkubacijos. Kiekvieno bandymo metu gauti rezultatai pateikiami 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Biomasės koncentracija

Inkubacijos trukmė, val	Šviesos sugertis, kai $\lambda = 540 \text{ nm}$	Koncentracija, g/l
1 bandymas		
0	0,097	0,028
6	2,077	0,591
2-3 bandymai		
0	0,081	0,023
6	1,785	0,508
4-5 bandymai		
0	0,068	0,019
6	1,228	0,349
6-7 bandymai		
0	0,025	0,007
6	1,306	0,372
8-9 bandymai		
0	0,014	0,004
6	1,659	0,472

Remiantis lentelėje pateiktais duomenimis, galima teigti, kad didžiausia bakterijų koncentracija nustatyta 1 – ojo bandymo atveju, mažiausia 4 – ojo ir 5 – ojo. Iki šios proceso stadijos kintamųjų nebuvo, tai reiškia, kad visi bandymai atlikti vienodomis sąlygomis.

3.2 Fermentacija

Fermentacijos pradžioje ir kas 24 val atliekamas biomasės koncentracijos nustatymas. Taip stebimas bakterijų koncentracijos kitimas fermentacijos metu. Spektrofotometru nustatoma fermentacijos terpės šviesos sugertis 540 nm bangos ilgyje. Rezultatai pateikti 3.2 lentelėje.

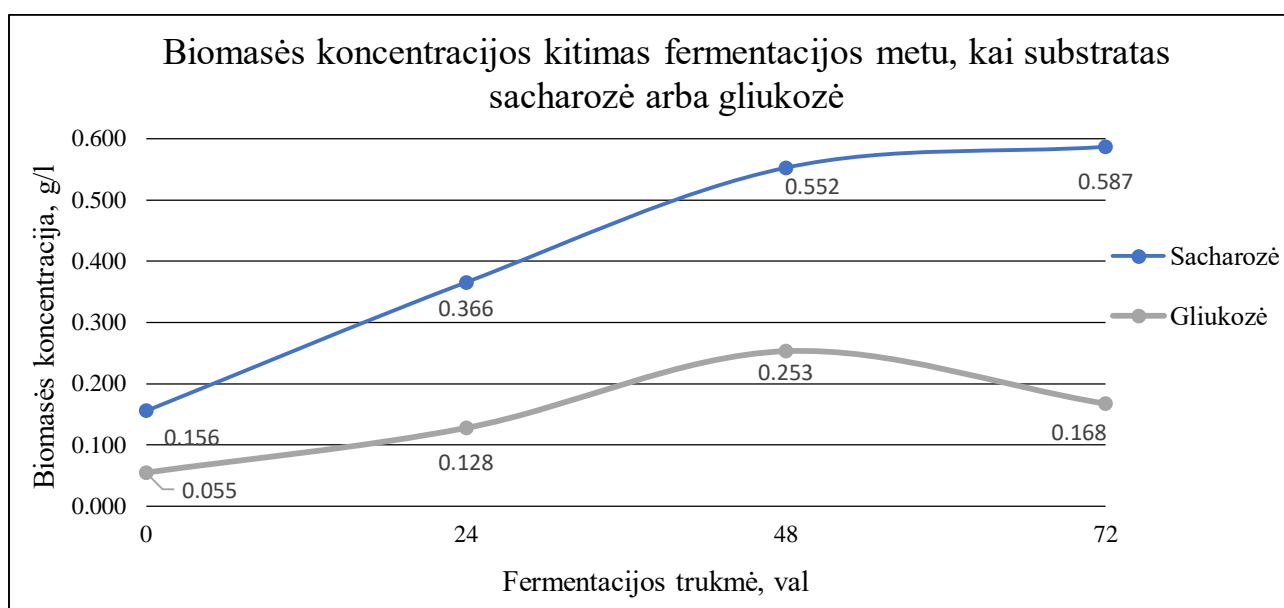
3.2 lentelė. Fermentacijos terpės šviesos sugertis, esant skirtingiems substratams

Substratas	Šviesos sugertis, kai $\lambda = 540 \text{ nm}$			
	Po 0 val	Po 24 val	Po 48 val	Po 72 val
Sacharozė	0,548	1,285	1,942	2,062
Gliukozė	0,193	0,449	0,890	0,589
Maltozė	0,411	0,926	0,805	0,837
Cukranendrių cukrus	0,159	1,175	1,593	2,383
Fruktozė	0,197	1,110	1,405	1,277
Manitolis	0,199	1,192	1,232	1,189
Saldiklių mišinys „Stevia“	0,156	1,085	1,278	1,466
Glicerolis	0,311	0,881	1,084	1,154
Kokosų palmių žiedų cukrus	0,317	0,964	1,086	1,127

Iš lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausia šviesos sugertis buvo fermentacijos terpės, kurioje kaip anglies šaltinis naudota sacharozė. Šviesos sugerties matavimų rezultatai perskaičiuojami į biomasės koncentraciją pagal 2 – amę skyriuje pateiktą 2.1 formulę.

1-2 bandymai. Substratas – sacharozė ir gliukozė

Rezultatai, gauti šviesos sugerties vertes perskaičius į biomasės koncentraciją, pateikiami 3.1 paveiksle.



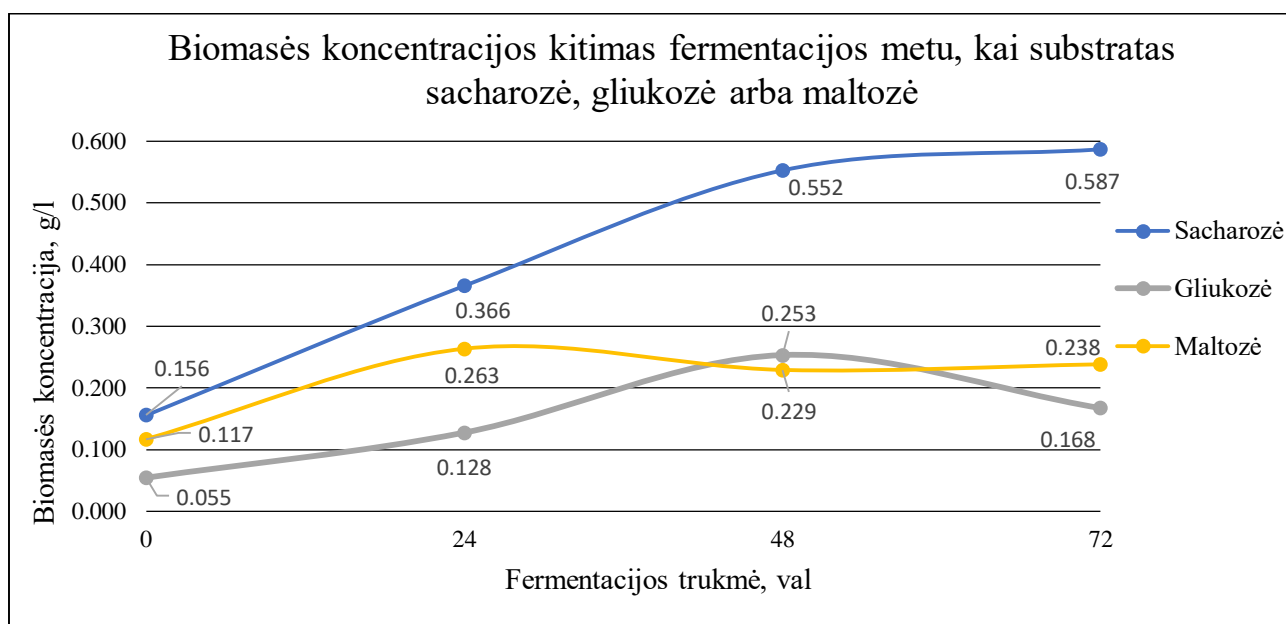
3.1 pav. Biomasės koncentracijos kitimas fermentacijos metu, kaip substratą naudojant sacharozę arba gliukozę

Iš grafiko matyti, kad bandymo metu su sacharozė 48 val biomasės koncentracija didėjo tolygiai, o paskutines 24 val fermentacijos valandas biomasės augimas sulėtėjo. Fermentacijos metu, kai kaip anglies šaltinis buvo naudojama gliukozė, biomasės koncentracija didėjo 48 val iki 0,253 g/l, o po 72 val jau buvo sumažėjusi iki 0,168 g/l. Lyginant abiejų bandymų metu gautą biomasės koncentraciją po 72 val fermentacijos, akivaizdžiai matoma, kad 1 – ojo bandymo, kai naudota sacharozė, biomasės gauta daugiau, t. y. 0,587 g/l, kai, tuo tarpu, naudojant gliukozę tik 0,168 g/l.

3 bandymas. Substratas – maltozė

Kadangi literatūros šaltiniuose sacharozė ir gliukozė minimi kaip geriausi anglies šaltiniai ksantano gamybos procesui, tolimesnių bandymų rezultatai lyginami su pirmųjų dviejų bandymų rezultatais.

Biomasės koncentracijos kitimo fermentacijos metu duomenys pateikti 3.2 paveiksle.

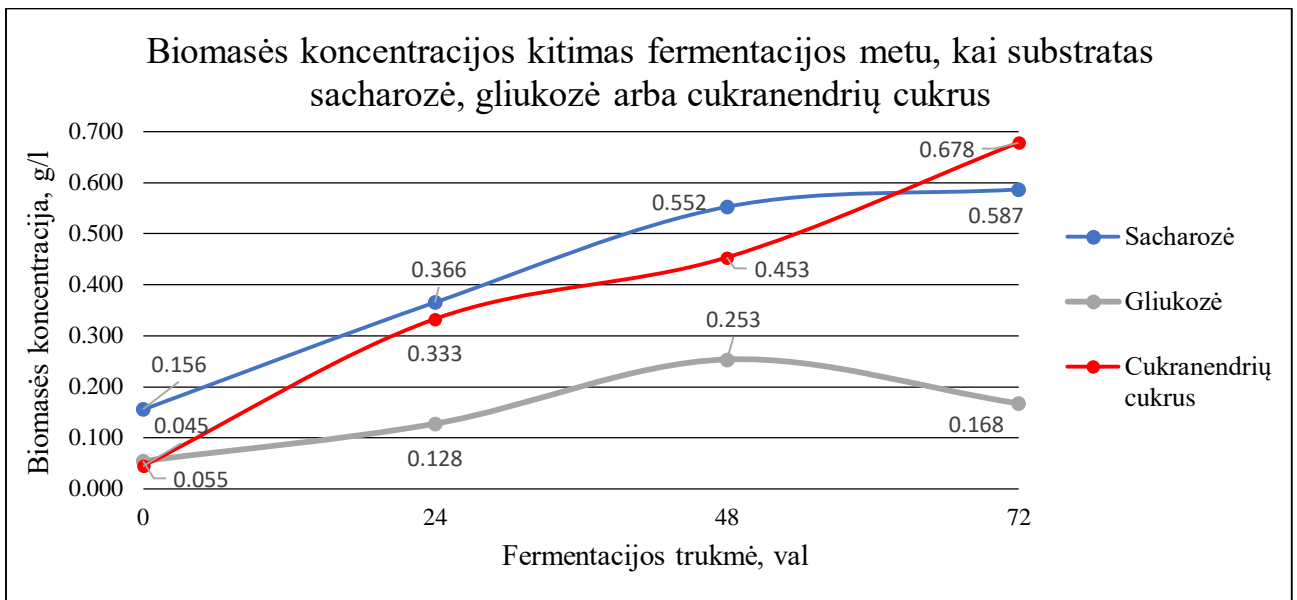


3.2 pav. Biomasės koncentracijos kitimas fermentacijos metu, kaip substratą naudojant sacharozę, gliukozę arba maltozę

Remiantis duomenimis, pateiktais grafike, fermentacijos metu, kai naudojama maltozė, matomas biomasės augimo nepastovumas. Pirmas 24 val matomas staigus biomasės augimas (0,263 g/l), po 48 val pastebimas biomasės koncentracijos sumažėjimas (0,229 g/l), o po 72 val vėl matomas nežymus augimas (0,238 g/l). Lyginant šio bandymo metu gautus rezultatus ir 1 – ojo bandymo, kai naudota sacharozė, pastebimas ryškus skirtumas – bandymo su maltoze metu biomasės koncentracija daugiau nei dvigubai mažesnė. Tačiau 3 – ojo bandymo metu gautas biomasės kiekis yra didesnis nei bandymo metu, kai buvo naudota gliukozė.

4 bandymas. Substratas – cukranendrių cukrus

Rezultatai pateikti 3.3 paveiksle.

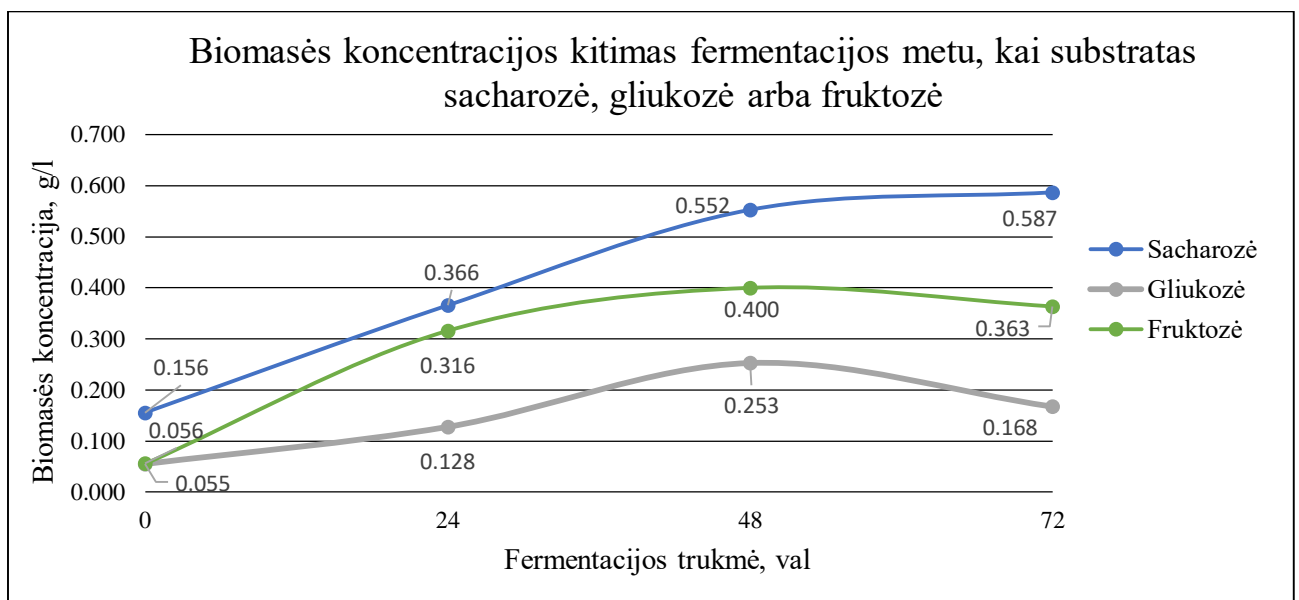


3.3 pav. Biomės koncentracijos kitimas fermentacijos metu, kaip substratą naudojant sacharozę, gliukozę arba cukranendrių cukrų

4 – ojo bandymo metu, kai substratas buvo cukranendrių cukrus, biomasės koncentracija visą fermentacijos laiką didėjo gana tolygiai. Remiantis grafiku galima teigti, kad šio bandymo metu, po 72 val fermentacijos, biomasės koncentracija (0,678 g/l) didesnė nei tais atvejais, kai kaip anglies šaltinis naudota sacharozė (0,587 g/l) ar gliukozė (0,168 g/l).

5 bandymas. Substratas – fruktozė

Rezultatai pateikti 3.4 paveiksle.

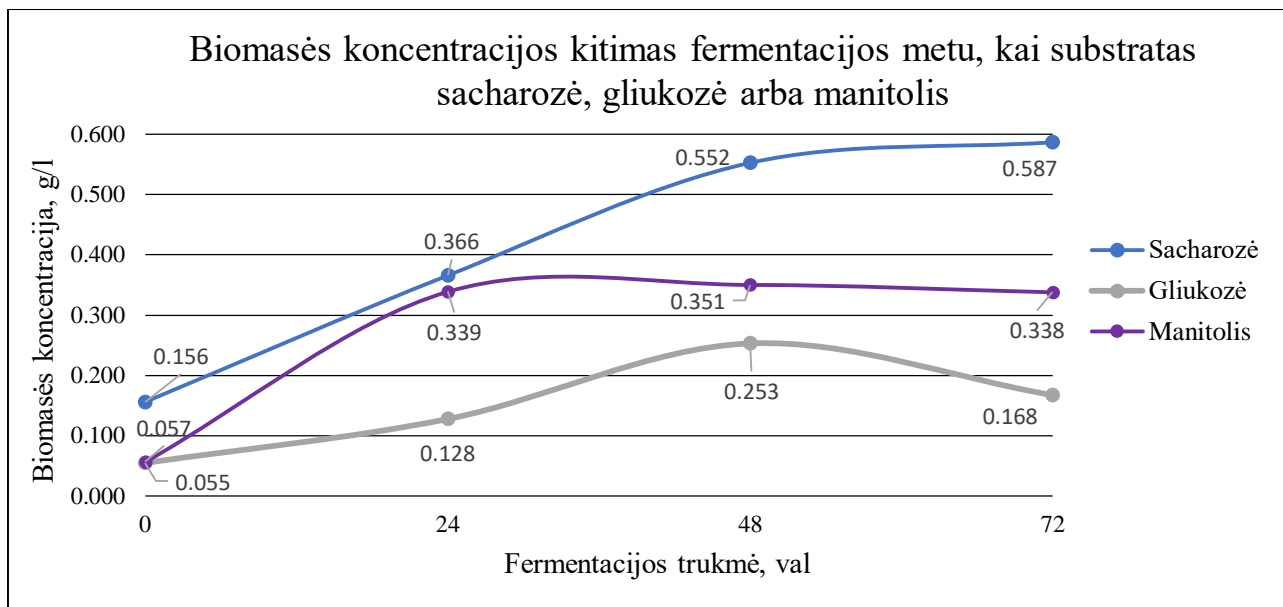


3.4 pav. Biomės koncentracijos kitimas fermentacijos metu, kaip substratą naudojant sacharozę, gliukozę arba fruktozę

Iš grafiko matyti, kad 5 – ojo bandymo metu, kai naudota fruktozė, biomasės koncentracija didėjo 48 val, o jau po 72 val pastebėtas koncentracijos sumažėjimas. Lyginant anglies šaltinio įtaką biomasės koncentracijai, galima teigti, kad naudojant fruktozę biomasės koncentracija po 72 val fermentacijos yra mažesnė nei naudojant sacharozę, bet didesnė nei naudojant gliukozę.

6 bandymas. Substratas – manitolis

Rezultatai pateikti 3.5 paveiksle.

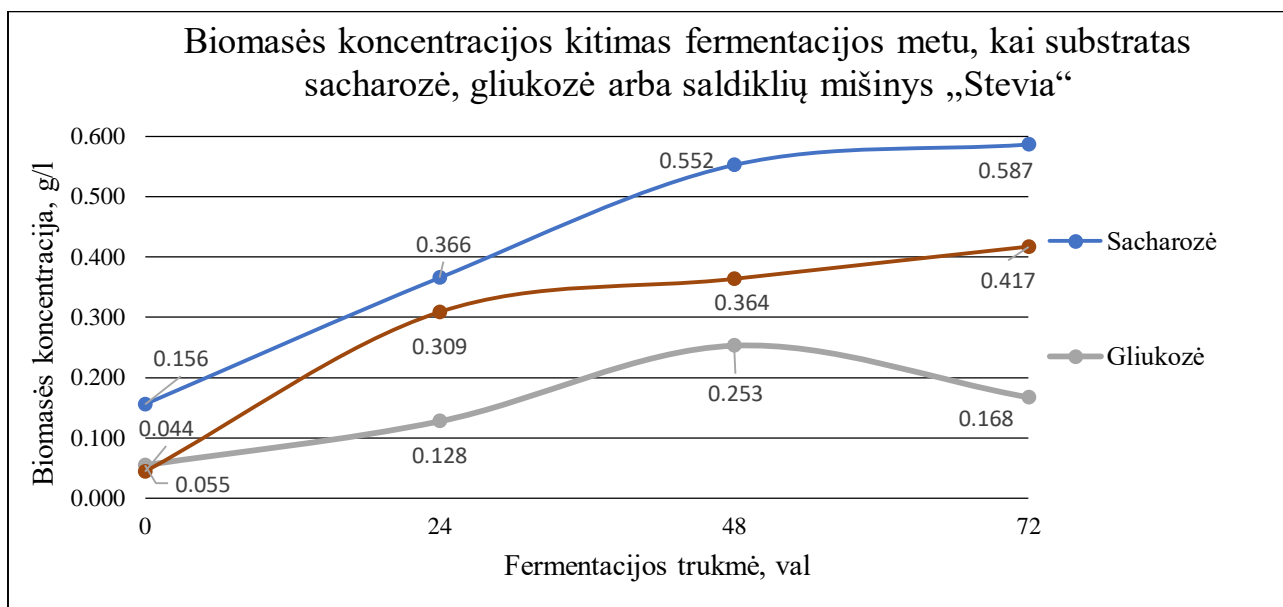


3.5 pav. Biomės koncentracijos kitimas fermentacijos metu, kaip substratą naudojant sacharozę, gliukozę arba manitolį

6 – ojo bandymo metu pastebimas analogiška situacija, kaip ir bandymo prieš tai – pirmas 48 val biomasės koncentracija didėjo, o po 72 val pastebėtas koncentracijos sumažėjimas. Lyginant substrato įtaką biomasės koncentracijai, galima teigti, kad naudojant manitolį biomasės koncentracija po 72 val fermentacijos yra mažesnė nei naudojant sacharozę, bet didesnė nei naudojant gliukozę.

7 bandymas. Substratas – saldiklių mišinys „Stevia“

Rezultatai pateikti 3.6 paveiksle.

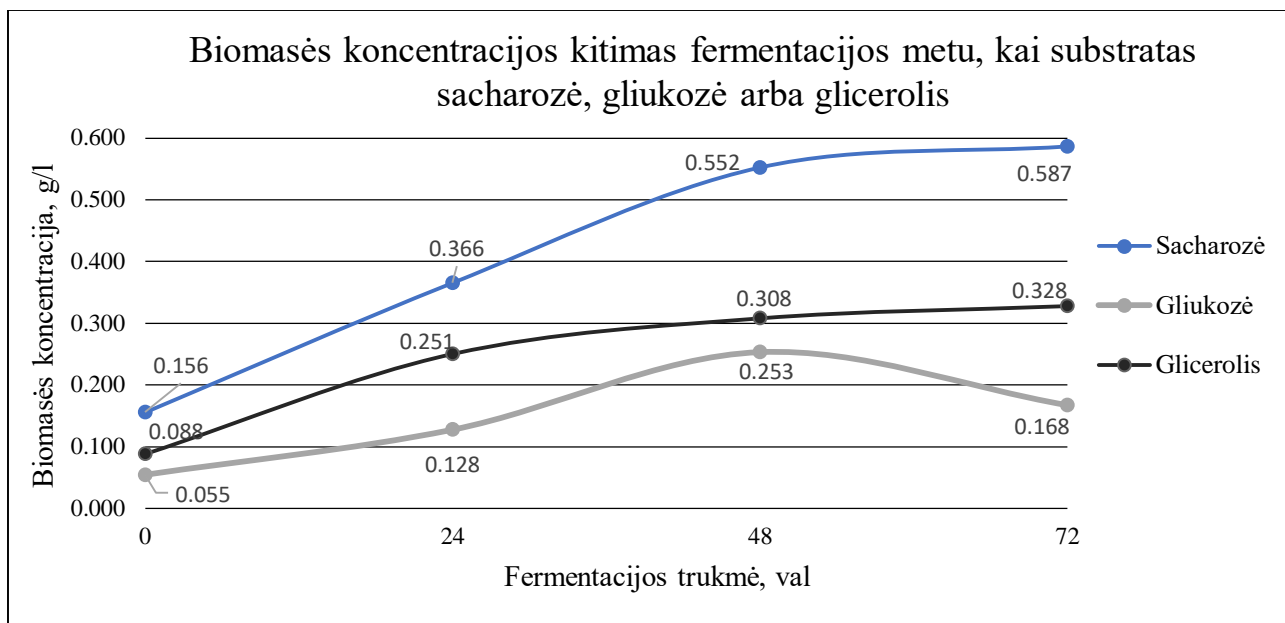


3.6 pav. Biomės koncentracijos kitimas fermentacijos metu, kaip substratą naudojant sacharozę, gliukozę arba saldiklių mišinį „Stevia“

Biomės koncentracija, kai buvo naudotas saldiklių mišinys „Stevia“, stipriai padidėjo per pirmąsias 24 fermentacijos valandas, toliau augimas vyko lėčiau. Vis dėlto, lyginant 1 – ojo, 2 – ojo ir 7 – ojo bandymo metu gautą biomasės koncentraciją, matoma, kad pastarojo bandymo metu gauta koncentracija didesnė nei naudojant gliukozę, bet mažesnė nei naudojant sacharozę.

8 bandymas. Substratas – glicerolis

Rezultatai pateikti 3.7 paveiksle.

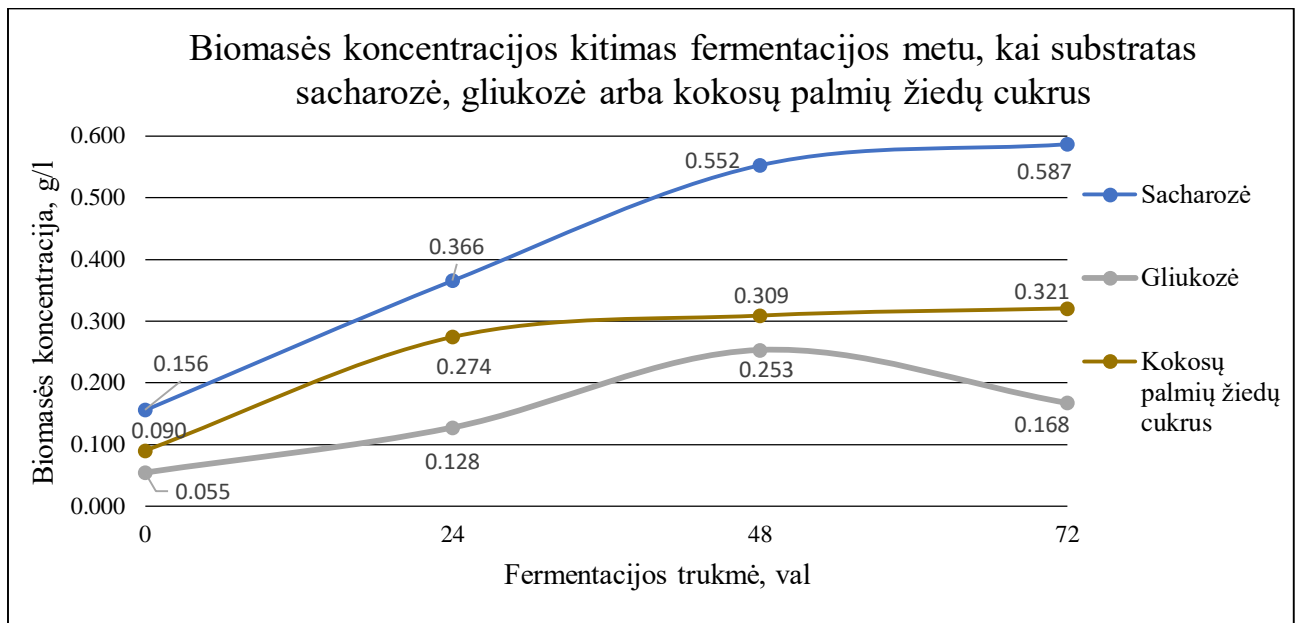


3.7 pav. Biomės koncentracijos kitimas fermentacijos metu, kaip substratą naudojant sacharozę, gliukozę arba glicerolį

8 – ojo bandymo metu, kai substratas buvo glicerolis, biomasės koncentracija visą fermentacijos laiką didėjo gana tolygiai. Remiantis grafiku galima teigti, kad šio bandymo metu, po 72 val fermentacijos, biomasės koncentracija mažesnė nei gautoji bandymo metu, kai naudota sacharozė, bet dvigubai didesnė nei tada, kai buvo naudota gliukozė.

9 bandymas. Substratas – kokosų palmių žiedų cukrus

Rezultatai pateikti 3.8 paveiksle.



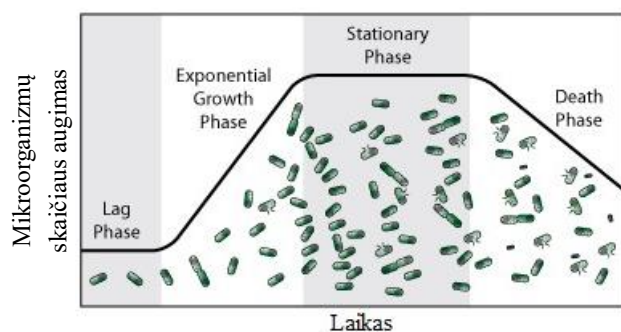
3.8 pav. Biomasės koncentracijos kitimas fermentacijos metu, kaip substratą naudojant sacharozę, gliukozę arba kokosų palmių žiedų cukrų

8 – ojo bandymo metu, kai substratas buvo kokosų palmių žiedų cukrus, biomasės koncentracija visą fermentacijos laiką didėjo. Remiantis grafiku galima teigti, kad šio bandymo metu, po 72 val fermentacijos, biomasės koncentracija mažesnė nei gautoji bandymo metu, kai naudota sacharozė, bet beveik dvigubai didesnė nei tada, kai buvo naudota gliukozė.

Visų bandymų metu, pirmajame fermentacijos etape, t. y. po 24 val pastebimas staigus mikroorganizmų augimas, dėl ko žymiai sumažėja ištirpusio deguonies koncentracija. Kuo didesnė biomasės koncentracija inokuliuojama į bioreaktorių, tuo sparčiau mažėja ištirpusio deguonies kiekis [9]. Kadangi *X. campestris* mikroorganizmai yra griežti aerobai, toliau vykstant fermentacijai bakterijų augimas lėtėja. Proceso metu fermentacijos terpė tampa klampi ir ryškiai geltonos spalvos. Terpės klampa didėja, didėjant biomasės ir produkto koncentracijai.

Didžiausia biomasės koncentracija po 72 val trukusio proceso nustatyta 1 – ame ir 4 – ame bandiniuose, atitinkamai, 0,587 g/l ir 0,678 g/l, kur, atitinkamai, kaip substratas naudota sacharozė ir cukranendrių cukrus. Kaip jau minėta anksčiau, pagrindinė cukranendrių cukraus sudedamojo dalis yra sacharozė.

Praėjus 24 val nuo fermentacijos pradžios, pastebėtas biomasės koncentracijos mažėjimas 3 – iame bandinyje, kur kaip substratas naudota maltozė. Toks pat reiškinys po 48 val fermentacijos matomas 2 – ame ir 6 – ame bandiniuose, kur anglies šaltiniai yra, atitinkamai, gliukozė ir manitolis. Šiuos pastebėjimus galima pagrįsti tuo, kad mikroorganizmai mitybinėje terpėje auga ir dauginasi tol, kol suvartojamos maisto medžiagos. Fermentacijos metu nebuvo papildomai pridėta maistinių medžiagų, taip pat nebuvo šalinami metabolizmo produktai, todėl bakterijų kultūra tapo statine (periodine). Toks mikroorganizmų augimas uždaroje sistemoje apibūdinamas augimo kreive, pateikta 3.9 paveiksle [52].



3.9 pav. Gyvųjų ląstelių skaičiaus priklausomybė nuo laiko

Taigi, galima teigti, kad mikroorganizmams pradėjo stigti maisto medžiagų, todėl jų augimas ne tik sustojo, bet ir dalis ląstelių žuvo.

3.3 Ksantano kiekio įvertinimas

Ksantano išskyrimas buvo vykdomas naudojant 4 skirtingus tirpiklius: izopropanolį, acetoną, bioetanolį ir metanolį. Prieš sumaišant tirpiklį su fermentacijos terpe, įdėta natrio chlorido, kuris, sumažindamas alkoholio koncentraciją, padidina ksantano išsiskyrimą. Tam gali būti naudojamos ir divalenčių katijonų druskos, tačiau tada ksantanas išskiriamas kaip mažo tirpumo druska, dėl ko, norint gauti didelio tirpumo ksantano druską, divalentį katijoną reikia pakeisti vienvaleščiu, pavyzdžiui, natrio ar kalio, katijonu [53].

1-2 bandymai. Substratas – sacharozė ir gliukozė

Kiekvieno bandymo atveju, buvo paruošti 4 sterilūs mėgintuvėliai, kurių kiekvieno masė buvo žinoma. Mėgintuvėliai su išdžiovintu ksantanu buvo sveriami ir pagal 2 – amę skyriuje pateiktą 2.2 formulę apskaičiuojamas ksantano kiekis, pavyzdžiui:

$$m_{\text{ksantano}} = 12,1371 - 12,1180 = 0,0191 \text{ g} / 10 \text{ ml};$$

Bandymo, kurio metu naudota sacharozė, rezultatai pateikti 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. Susidariusio ksantano kiekis, kai substratas sacharozė

Tirpiklis	Tuščio mėgintuvėlio masė, g	Mėgintuvėlio su ksantanu masė, g	Ksantano kiekis, g/10 ml
Izopropanolis	12,1180	12,1371	0,0191
Acetonas	12,7120	12,7511	0,0391
Bioetanolis	12,0700	12,0818	0,0118
Metanolis	13,5478	13,5580	0,0102

Bandymo, kurio metu naudota gliukozė, rezultatai pateikti 3.4 lentelėje.

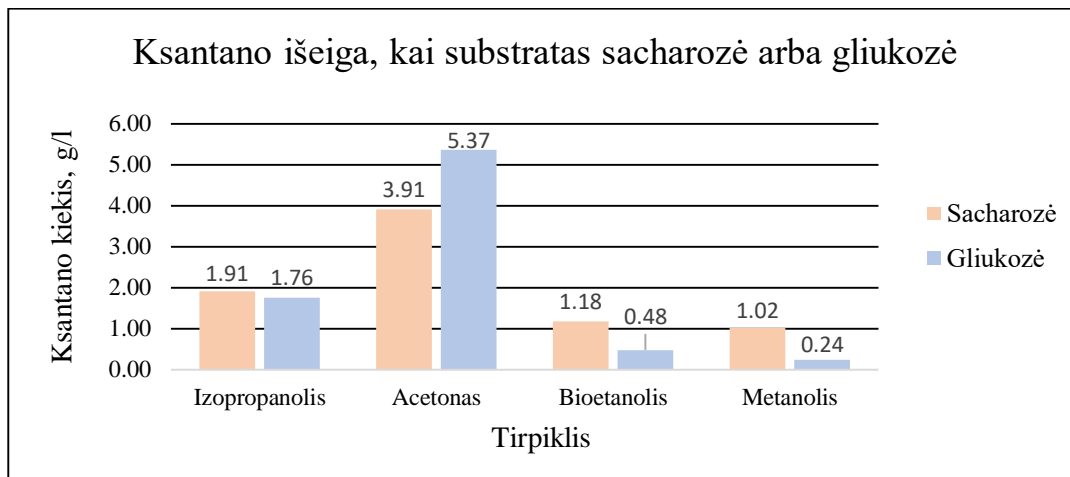
3.4 lentelė. Susidariusio ksantano kiekis, kai substratas gliukozė

Tirpiklis	Tuščio mėgintuvėlio masė, g	Mėgintuvėlio su ksantanu masė, g	Ksantano kiekis, g/10 ml
Izopropanolis	13,1542	13,1718	0,0176
Acetonas	11,9434	11,9971	0,0537
Bioetanolis	12,3573	12,3621	0,0048
Metanolis	13,4858	13,4882	0,0024

Lentelėse pateikti rezultatai parodo ksantano kiekį, išgautą iš 10 ml fermentacijos terpės, todėl atliekamas perskaičiavimas į kiekį, išgaunamą iš 1 litro terpės:

$$m_{\text{ksantano}} = 0,0191 \cdot 100 = 1,91 \text{ g/l};$$

Rezultatai pateikti 3.10 paveiksle.



3.10 pav. Ksantano išėigos priklausomybė nuo tirpiklio, kai substratas sacharozė arba gliukozė

Iš grafiko matyti, kad sacharozę naudojant kaip anglies šaltinį, daugiausiai ksantano, t. y. 3,91 g/l, išgauta jį nusodinant acetonu. Mokslinės literatūros šaltiniuose pateikiama išėiga kone 4 kartus didesnė nei gauta šio tyrimo metu, t. y. 13,234 g/l, tik literatūroje minimu atveju kaip tirpiklis naudotas ne acetonas, o izopropanolis [3].

Kaip substratą naudojant gliukozę, daugiausiai ksantano, t. y. 5,37 g/l, išgauta naudojant acetoną. Mokslinės literatūros šaltiniuose pateikiama išėiga kur kas didesnė nei gauta šio tyrimo metu, t. y. 14,744 g/l. Vis dėlto, straipsnyje aprašomo tyrimo atveju, ksantano nusodinimui naudotas izopropanolis, o ne acetonas [3]. Šiuo atveju, ksantano išėiga didesnė nei naudojant sacharozę. Nepaisant naudoto anglies šaltinio, mažiausia išėiga gauta nusodinant ksantaną su metanoliumi.

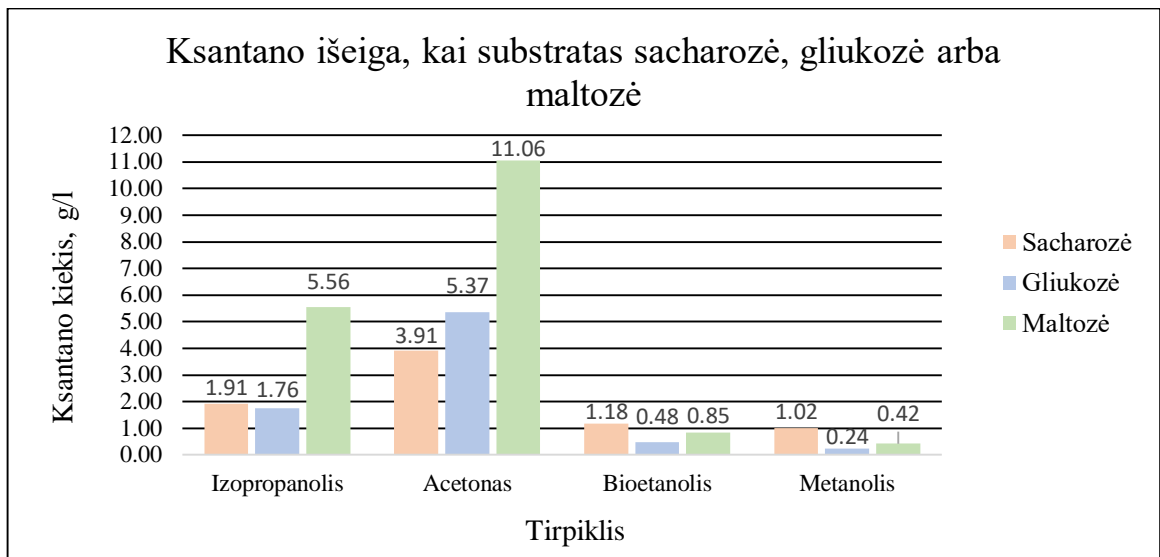
Kaip ir biomasės koncentracijos įvertinimo metu, taip ir šiuo atveju, tolimesnių bandymų rezultatai lyginami su pirmųjų dviejų bandymų rezultatais.

3 bandymas. Substratas – maltozė

Skaičiavimai atliekami analogiškai kaip ir 1 – ojo bandymo atveju. Rezultatai pateikti 3.5 lentelėje ir 3.11 paveiksle.

3.5 lentelė. Susidariusio ksantano kiekis, kai substratas maltozė

Tirpiklis	Tuščio mėgintuvėlio masė, g	Mėgintuvėlio su ksantanu masė, g	Ksantano kiekis, g/10 ml
Izopropanolis	12,1871	12,2427	0,0556
Acetonas	13,3784	13,4690	0,1106
Bioetanolis	13,7531	13,7616	0,0085
Metanolis	13,7329	13,7371	0,0042



3.11 pav. Ksantano išeigos priklausomybė nuo tirpiklio, kai substratas sacharozė, gliukozė arba maltozė

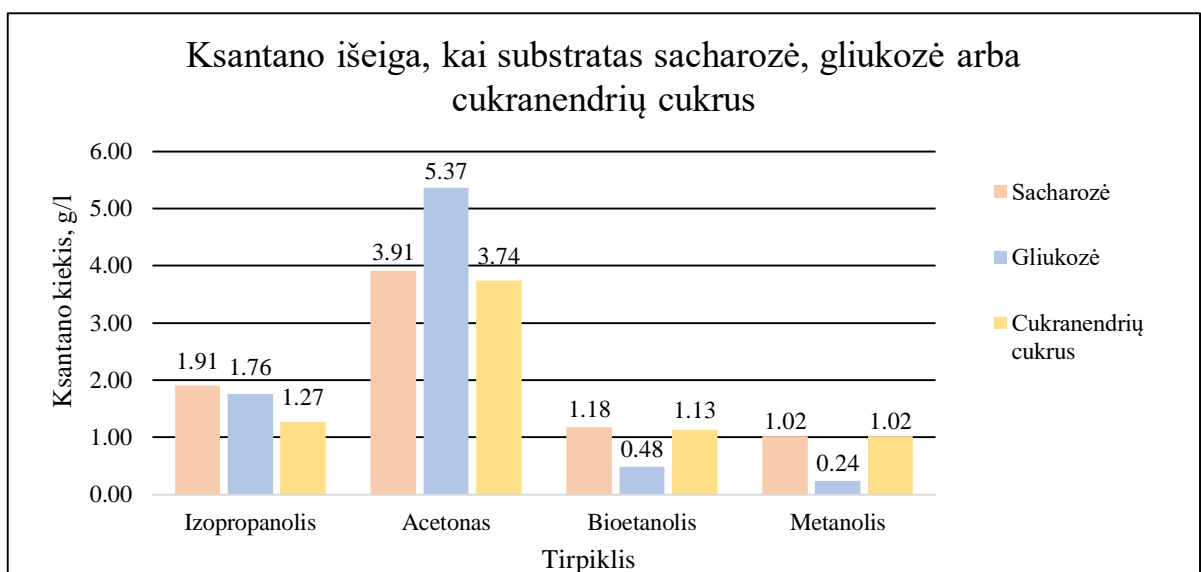
Gauti rezultatai rodo, kad maltozė naudojant kaip substratą, daugiausiai ksantano, t. y. 11,06 g/l, išgauta naudojant acetoną. Tai, apskritai, geriausias rezultatas iš visų bandymų, kurių metu buvo keičiamas substratas. Prasčiausia polisacharido išeiga, kaip ir ankstesniuose bandymuose, gauta naudojant metanolį.

4 bandymas. Substratas – cukranendrių cukrus

Rezultatai pateikti 3.6 lentelėje ir 3.12 paveiksle.

3.6 lentelė. Susidariusio ksantano kiekis, kai substratas cukranendrių cukrus

Tirpiklis	Tuščio mėgintuvėlio masė, g	Mėgintuvėlio su ksantanu masė, g	Ksantano kiekis, g/10 ml	Ksantano kiekis, g/l
Izopropanolis	13,6408	13,6535	0,0127	1,27
Acetonas	13,7978	13,8352	0,0374	3,74
Bioetanolis	13,5754	13,5867	0,0113	1,13
Metanolis	13,0164	13,0266	0,0102	1,02



3.12 pav. Ksantano išeigos priklausomybė nuo tirpiklio, kai substratas sacharozė, gliukozė arba cukranendrių cukrus

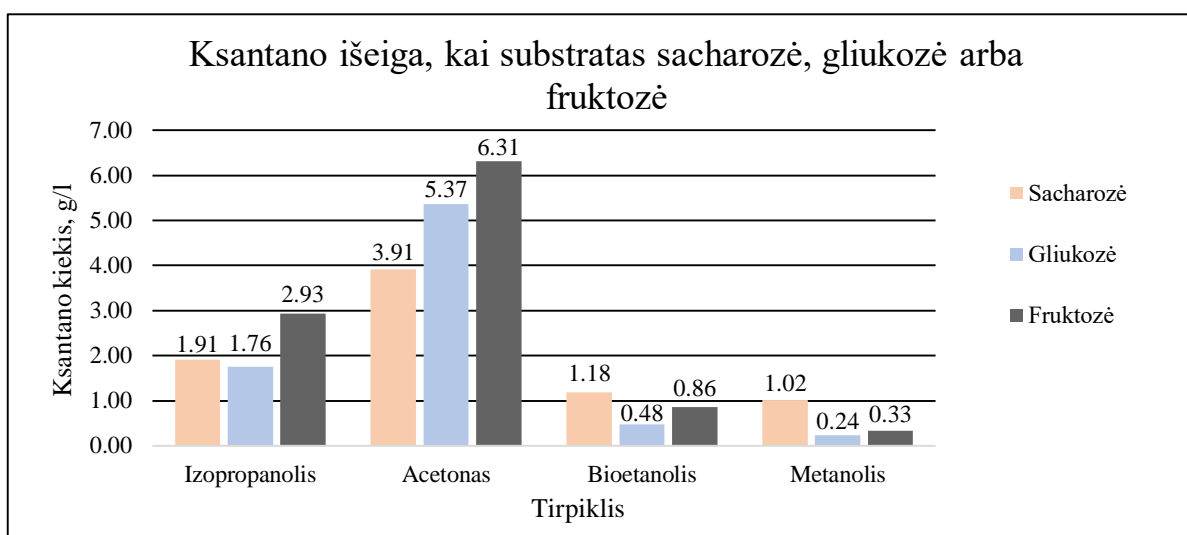
Pateikti rezultatai rodo, kad naudojant cukranendrių cukrų kaip anglies šaltinį, daugiausiai ksantano, t. y. 3,74 g/l, išgauta naudojant acetoną. Cukranendrių cukruje didžioji dalis angliavandenių yra sacharozė, todėl 4 – ojo bandymo metu gauta ksantano išeiga labai panaši į 1 – ojo bandymo rezultata, kai substratas buvo sacharozė. Vis dėlto, naudojant cukranendrių cukrų ksantano išeiga mažesnė nei kaip anglies šaltinį naudojant gliukozę. Mažiausia polisacharido išeiga gauta naudojant metanolį.

5 bandymas. Substratas – fruktozė

Rezultatai pateikti 3.7 lentelėje ir 3.13 paveiksle.

3.7 lentelė. Susidariusio ksantano kiekis, kai substratas fruktozė

Tirpiklis	Tuščio mėgintuvėlio masė, g	Mėgintuvėlio su ksantanu masė, g	Ksantano kiekis, g/10 ml
Izopropanolis	12,9723	13,0016	0,0293
Acetonas	13,4170	13,4801	0,0631
Bioetanolis	13,2955	13,3041	0,0086
Metanolis	13,3184	13,3217	0,0033



3.13 pav. Ksantano išeigos priklausomybė nuo tirpiklio, kai substratas sacharozė, gliukozė arba fruktozė

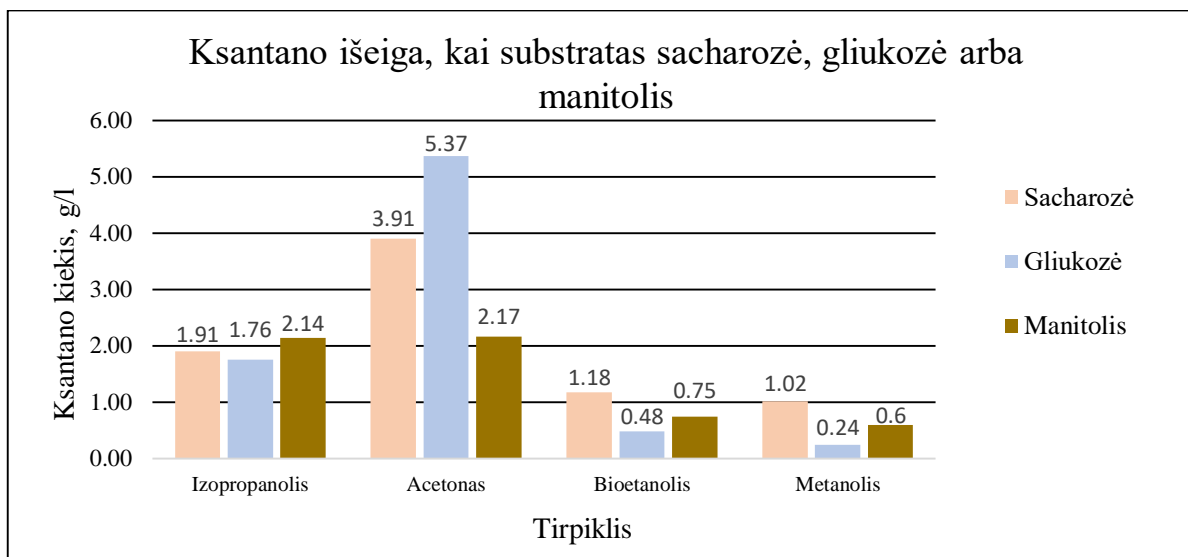
Gauti rezultatai rodo, kad fruktozę naudojant kaip substratą, daugiausiai ksantano, t. y. 6,31 g/l, išgauta naudojant acetoną. Literatūros šaltiniuose pateikiama šiek tiek mažesnė polisacharido išeiga, t. y. 5,232 g/l [3]. Šio bandymo metu gauta didesnė išeiga nei kaip substratą naudojant sacharozę ar gliukozę. Mažiausia ksantano išeiga, kaip ir ankstesniuose bandymuose, gauta naudojant metanolį.

6 bandymas. Substratas – manitolis

Rezultatai pateikti 3.8 lentelėje ir 3.14 paveiksle.

3.8 lentelė. Susidariusio ksantano kiekis, kai substratas manitolis

Tirpiklis	Tuščio mėgintuvėlio masė, g	Mėgintuvėlio su ksantanu masė, g	Ksantano kiekis, g/10 ml
Izopropanolis	13,4182	13,4396	0,0214
Acetonas	13,7341	13,7558	0,0217
Bioetanolis	13,5100	13,5175	0,0075
Metanolis	12,6184	12,6244	0,0060



3.14 pav. Ksantano išeigos priklausomybė nuo tirpiklio, kai substratas sacharozė, gliukozė arba manitolis

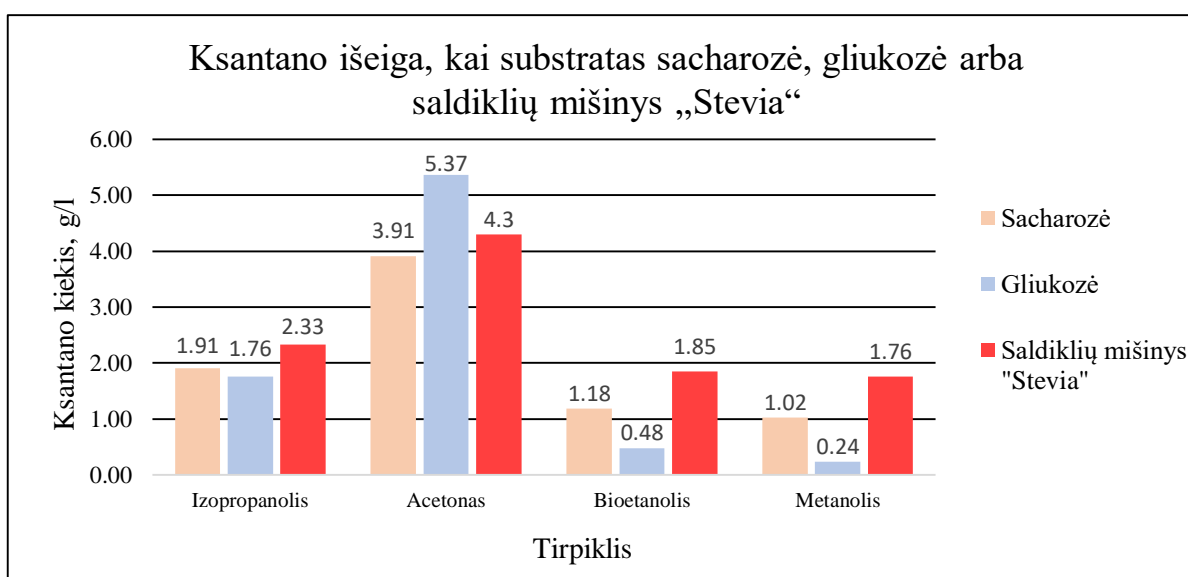
Grafike matyti, kad manitolį naudojant kaip anglies šaltinį, ksantano išeiga labai panaši tiek naudojant izopropanolį, tiek acetoną, atitinkamai, 2,14 g/l ir 2,17 g/l. 6 – ojo bandymo metu gauta ksantano išeiga kur kas prastesnė, ją lyginant su ksantano išeiga, gauta kaip substratą naudojant gliukozę arba sacharozę. Prasčiausia išeiga pastebima vertinant bandymą su metanoliu.

7 bandymas. Substratas – saldiklių mišinys „Stevia“

Rezultatai pateikti 3.9 lentelėje ir 3.15 paveiksle.

3.9 lentelė. Susidariusio ksantano kiekis, kai substratas saldiklių mišinys „Stevia“

Tirpiklis	Tuščio mėgintuvėlio masė, g	Mėgintuvėlio su ksantanu masė, g	Ksantano kiekis, g/10 ml
Izopropanolis	14,5375	14,5608	0,0233
Acetonas	14,2650	14,3080	0,0430
Bioetanolis	13,5117	13,5302	0,0185
Metanolis	14,1526	14,1702	0,0176



3.15 pav. Ksantano išeigos priklausomybė nuo tirpiklio, kai substratas sacharozė, gliukozė arba saldiklių mišinys „Stevia“

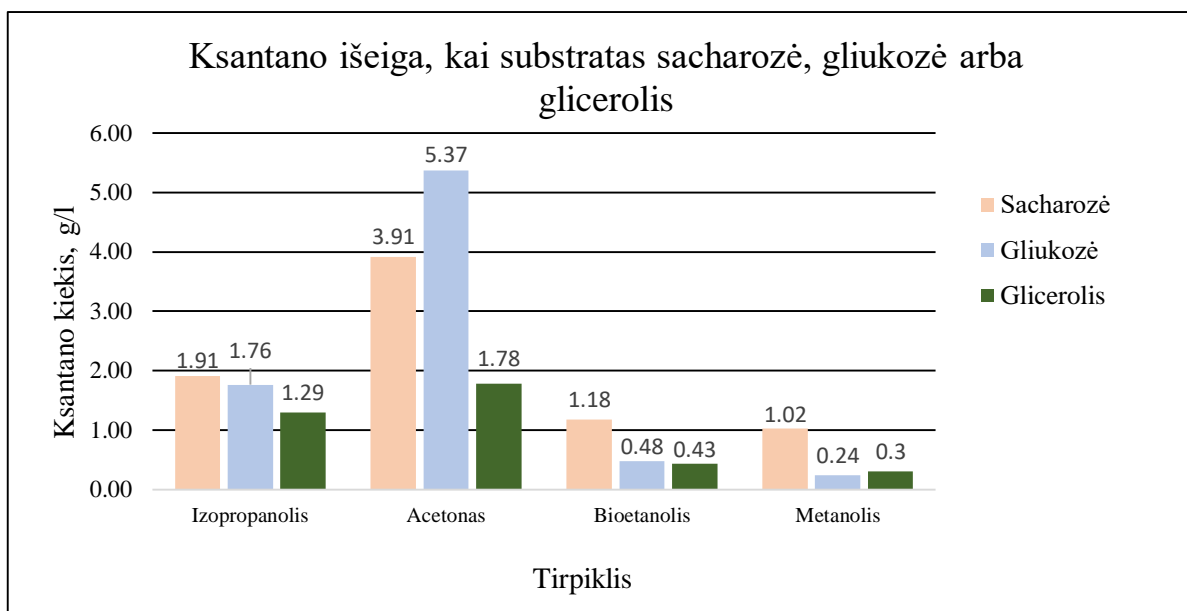
Gauti rezultatai rodo, kad saldiklių mišinį „Stevia“ naudojant kaip substratą, daugiausiai ksantano, t. y. 4,30 g/l, išgauta naudojant acetoną. Šio bandymo metu gauta išeiga prastesnė nei bandymo su gliukoze, bet geresnė nei gauta naudojant sacharozę. Prasčiausia ir labai panaši polisacharido išeiga gauta naudojant metanolį ir bioetanolį.

8 bandymas. Substratas – glicerolis

Rezultatai pateikti 3.10 lentelėje ir 3.16 paveiksle.

3.10 lentelė. Susidariusio ksantano kiekis, kai substratas glicerolis

Tirpiklis	Tuščio mėgintuvėlio masė, g	Mėgintuvėlio su ksantanu masė, g	Ksantano kiekis, g/10 ml
Izopropanolis	12,1513	12,1642	0,0129
Acetonas	12,2209	12,2387	0,0178
Bioetanolis	12,2232	12,2275	0,0043
Metanolis	12,1460	12,1490	0,0030



3.16 pav. Ksantano išeišos priklausomybė nuo tirpiklio, kai substratas sacharozė, gliukozė arba glicerolis

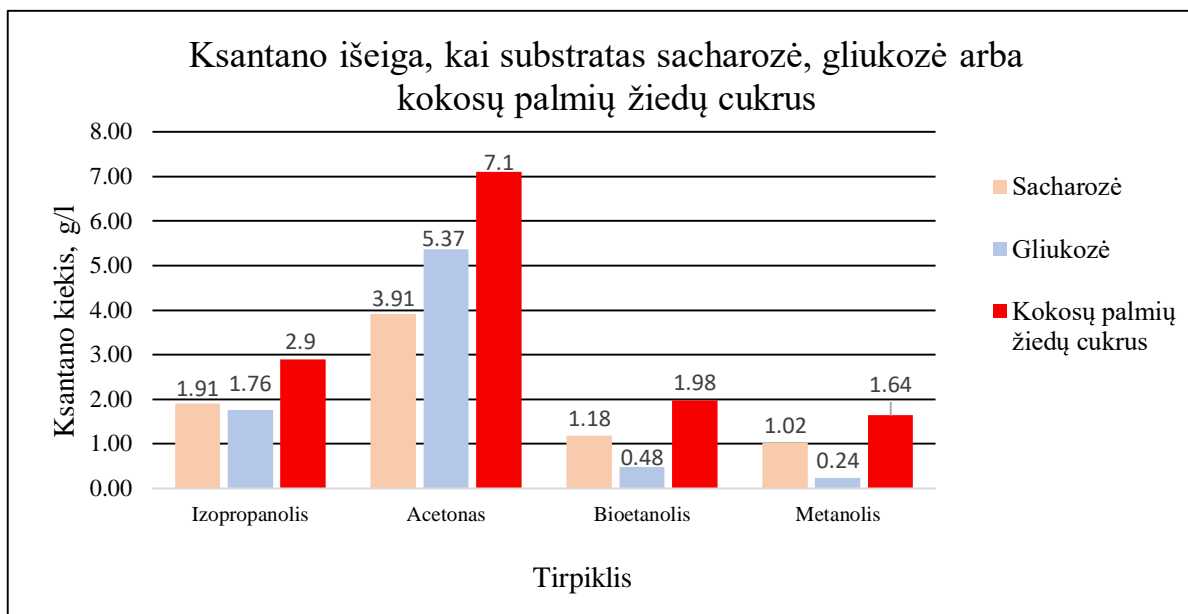
Gauti rezultatai rodo, kad glicerolį naudojant kaip substratą, daugiausiai ksantano, t. y. 1,78 g/l, išgauta naudojant acetoną. Vis dėlto, 8 – ojo bandymo rezultatai yra prasčiausi lyginant su visais kitais bandymais. Nors literatūros šaltiniuose teigiama, kad produkcijos terpėje naudojant 2 % glicerolio galima gauti ir keliskart didesnę ksantano išeišą, t. y. 7,23 g/l [2]. Mažiausia polisacharido išeišą gauta naudojant tirpiklį metanolį.

9 bandymas. Substratas – kokosų palmių žiedų cukrus

Rezultatai pateikti 3.11 lentelėje ir 3.17 paveiksle.

3.11 lentelė. Susidariusio ksantano kiekis, kai substratas kokosų palmių žiedų cukrus

Tirpiklis	Tuščio mėgintuvėlio masė, g	Mėgintuvėlio su ksantanu masė, g	Ksantano kiekis, g/10 ml
Izopropanolis	13,2707	13,2997	0,0290
Acetonas	11,9070	11,9780	0,0710
Bioetanolis	11,8918	11,9116	0,0198
Metanolis	11,8623	11,8787	0,0168



3.17 pav. Ksantano išeišos priklausomybė nuo tirpiklio, kai substratas sacharozė, gliukozė arba kokosų palmių žiedų cukrus

Pateikti rezultatai rodo, kad naudojant kokosų palmių žiedų cukrų kaip anglies šaltinį, daugiausiai ksantano, t. y. 7,10 g/l, išgauta naudojant acetoną. Pagrindinė kokosų palmių žiedų cukraus sudėtinė dalis yra sacharozė, tad tuo ir galima paaiškinti gautą ganę gerą išeišą. Vis dėlto, literatūroje aprašyto mokslinio tyrimo rezultatuose deklaruojama šiek tiek didesnė ksantano išeišą, t. y. apie 10 g/l [56]. Mažiausia polisacharido išeišą, kaip ir visų prieš tai vykdytų 8 – ių bandymų metu, gauta naudojant metanolį.

Geriausi rezultatai gauti, kai acetonas ir izopropanolis naudoti kaip tirpikliai. Ksantanas nesusimaišo nei su izopropanoliu, nei su acetonu, dėl to sumažinamas išskiriamo polisacharido tirpumas ir susidaro kietos ksantano nuosėdos. Taip pat, fermentacijos terpėje esančios priemaišos, spalvoti komponentai bei druskos yra išplaunami tirpiklio [7].

Duomenų palyginimui sudaryta 3.12 lentelė, kurioje pateikti kiekvieno bandymo rezultatai mažėjimo tvarka, vertinant ksantano išeišą, gautą polisacharido nusodinimui naudojant acetoną.

3.12 lentelė. Ksantano išeišą esant skirtingam substratui ir skirtingiems tirpikliams

Substratas	Tirpiklis			
	Izopropanolis	Acetonas	Bioetanolis	Metanolis
	Ksantano kiekis, g/l			
Maltozė	5,56	11,06	0,85	0,42
Kokosų palmių žiedų cukrus	2,90	7,10	1,98	1,64
Fruktozė	2,93	6,31	0,86	0,33

3.12 lentelės tęsinys

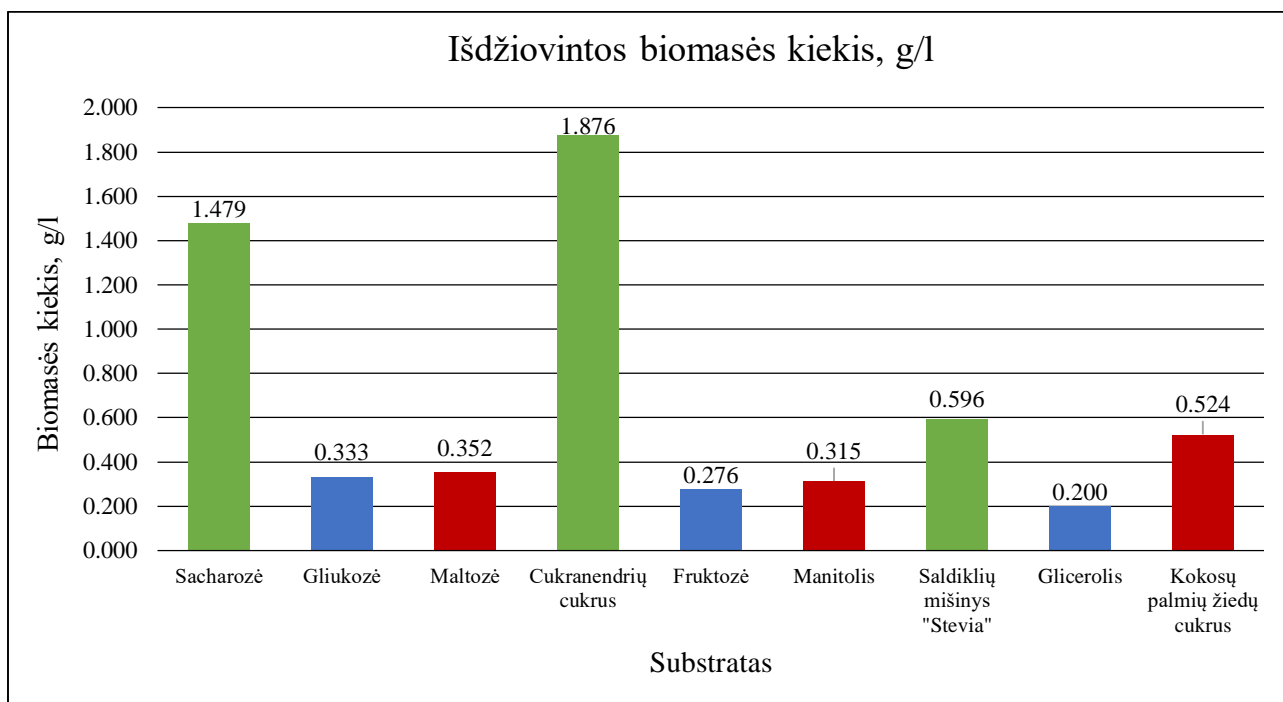
Gliukozė	1,76	5,37	0,48	0,24
Saldiklių mišinys "Stevia"	2,33	4,30	1,85	1,76
Sacharozė	1,91	3,91	1,18	1,02
Cukranendrių cukrus	1,27	3,74	1,13	1,02
Manitolis	2,14	2,17	0,75	0,60
Glicerolis	1,29	1,78	0,43	0,30

Iš 3.12 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad esant bet kokiam substratui, didžiausia ksantano išeiga gauta naudojant tirpiklį acetoną ir kone dvigubai mažesnė naudojant izopropanolį. Mažiausia išeiga visų 9 bandymų metu gauta naudojant metanolį.

Didžiausia išeiga, t. y. 11,06 g/l, gauta naudojant maltozę kaip anglies šaltinį. Literatūrinuose šaltiniuose pateikiama labai panaši polisacharido išeiga, t. y. 12,321 g/l [3]. Mažiausia ksantano išeiga gauta atliekant bandymą su gliceroliu, todėl galima teigti, kad šis alternatyvusis anglies šaltinis nėra tinkamas pasirinkimas polisacharido gamybai. Tuo tarpu, naudojant kokosų palmių žiedų cukrų, šio tyrimo kontekste, gauta neblogo išeiga, t. y. 7,10 g/l.

3.4 Išdžiovintos biomasės kiekio įvertinimas

Pasterizacijos metu suirusios ląstelės atskirtos ir išdžiovintos. Gautas sausos biomasės kiekis atvaizduotas 3.18 paveiksle.

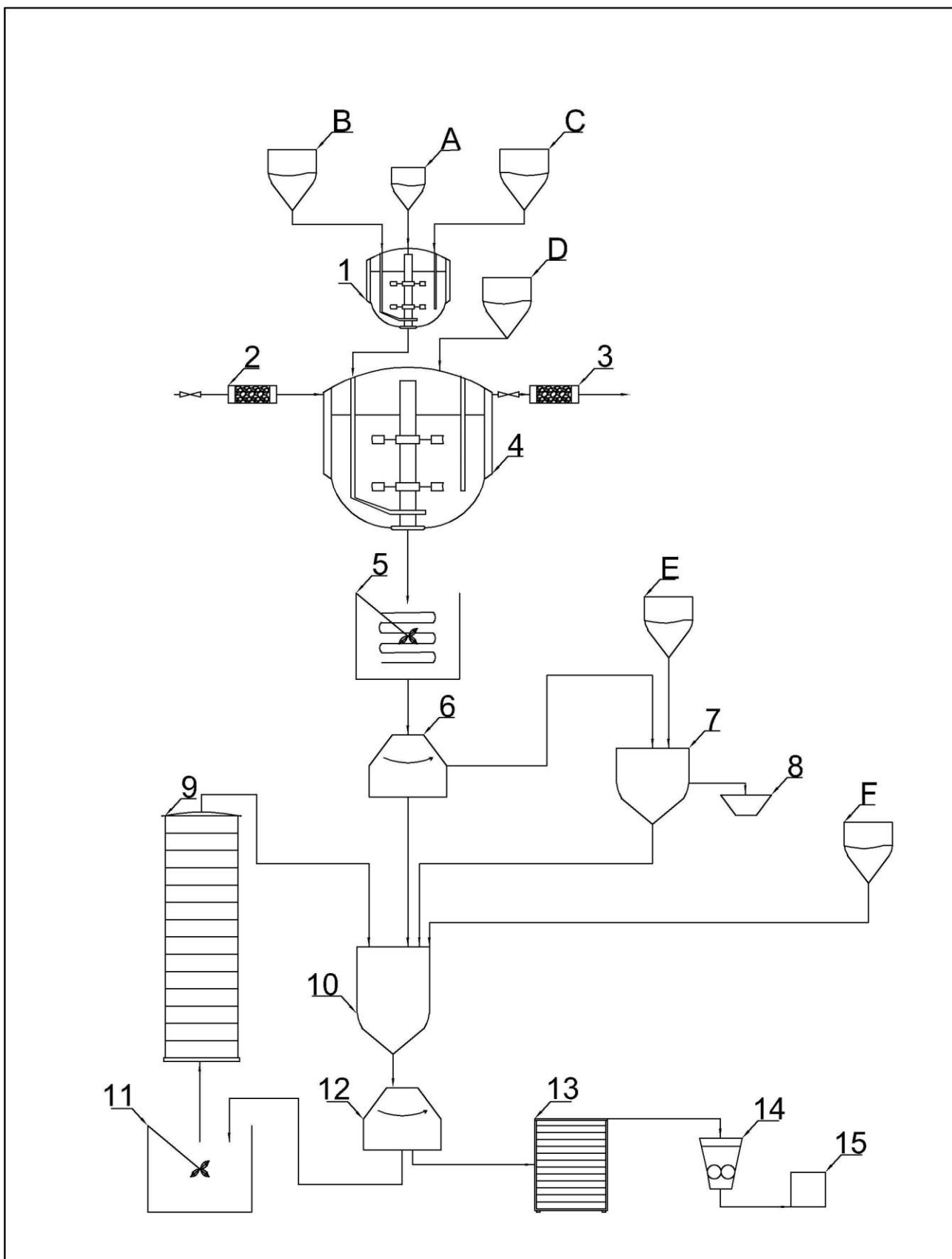


3.18 pav. Išdžiovintos biomasės kiekio priklausomybė nuo substrato

Vertinant grafike pateiktus duomenis, galima teigti, kad daugiausia sausos biomasės susidarė atliekant bandymą su sacharozė ir cukranendrių cukrumi. Jau po fermentacijos buvo galima matyti, kad didžiausia biomasės koncentracija būtent šiuose bandiniuose.

4. REKOMENDACIJŲ DALIS

Remiantis atlikto tyrimo rezultatais ir siekiant optimizuoti ksantano gamybą iš *X. campestris* siūloma naudoti substratą maltozę ir vadovautis 4.1 paveiksle pateikta aparatūrine ksantano gavimo schema.



4.1 pav. Ksantano gavimo aparatūrinė schema

Schemoje pateiktų įrenginių ir naudojamų terpių bei tirpalų žymėjimas nurodytas 4.1 ir 4.2 lentelėse.

4.1 lentelė. Ksantano gamyboje naudojami įrenginiai ir jų žymėjimas aparatūrinėje schemoje

Žymėjimas	Įrenginys
1	Inokulianto fermentatorius
2	Įeinančio oro filtras
3	Išeinančio oro filtras
4	Fermentatorius
5	Pasterizatorius
6	Centrifuga
7	Biomasės praplovimo rezervuaras
8	Biomasės surinkimo rezervuaras
9	Distiliavimo kolona
10	Nusodinimo rezervuaras
11	Tirpiklio surinkimo rezervuaras
12	Centrifuga
13	Liofilizatorius
14	Malūnas
15	Pakavimo įrengimas

4.2 lentelė. Ksantano gamyboje naudojamų terpių ir junginių pavadinimai ir jų žymėjimas schemoje

Žymėjimas	Terpės/ junginio pavadinimas
A	Bakterijos <i>X. campestris</i>
B	YM terpė
C	YM – T terpė
D	Produkcijos terpė
E	Vanduo
F	Natrio chloridas (NaCl)

Į inokulianto fermentatorių **1**, kuriame palaikoma 28 °C temperatūra ir nuolat vykdomas maišymas, tiekiamos *Xanthomonas campestris* bakterijos **A** ir sterili skystoji YM terpė **B**. Po 12 val į tą patį fermentatorių **1** tiekiamas sterili YM – T terpė **C**, po ko vėl inkubuojama 6 val. Po šios inkubacijos inokuliantas išcentrinio siurblio pagalba tiekiamas į fermentatorių **4**, į kurį tuo pačiu būdu transportuojama ir sterili produkcijos terpė **D**. Fermentacija trunka 72 val ir jos metu rekomenduojama palaikyti 28 °C temperatūrą bei 400 rpm maišymo greitį. Kadangi naudojamos bakterijos yra aerobinės, į fermentatorių **1** tiekiamas oro filtru **2** išvalytas oras, iš fermentatoriaus išeinanti oras taip pat išvalomas filtru **3**. Po fermentacijos išcentrinio siurblio pagalba fermentacijos terpė transportuojama į pasterizatorių **5**, kur rekomenduojama 15 min palaikyti 95 °C temperatūrą. Po pasterizacijos fermentacijos terpė transportuojama į centrifugą **6**, kur esant 9000 rpm greičiui nusodinamos suirusios bakterijų ląstelės. Pastarosios nukreipiamos į ląstelių praplovimo rezervuarą **7**, kur taip pat tiekiamas vanduo **E**. Atskirta biomasė praplaunama vandeniu, ir tiekiamas į biomasės surinkimo talpą **8**. Po centrifugavimo atskirta skystoji fazė išcentrinio siurblio pagalba transportuojama į nusodinimo rezervuarą **10**, kur palaikoma 25 °C temperatūra. Į tą pačią talpą transportuojamas skystis, likęs po biomasės praplovimo, taip pat tiekiamas natrio chloridas **F** (0,5 g/l koncentracija) ir tirpiklis iš distiliavimo kolonos **9**. Šiuo atveju, rekomenduojama naudoti acetoną. Nusodinus ksantaną mišinys transportuojamas į centrifugą **12**, iš kur atskirta skystoji fazė, t. y. tirpiklio atliekos surenkamos tirpiklio surinkimo rezervuare **11**, iš kurio transportuojama į

distiliavimo koloną **9**. Ksantano gamybos proceso metu distiliuotas tirpiklis gali būti naudojamas pakartotinai. Po centrifugavimo atskirtos nuosėdos, t. y. ksantanas, tiekiamas į liofilizatorių **13**, ten išdžiovinamas šalčio pagalba. Išdžiovintas ksantanas transportuojamas į malūną **14**, ten susmulkinamas į miltelius, kurie tiekiami į pakavimo įrengimą **15** ir supakuojami į norimo dydžio pakuotes.

IŠVADOS

1. Atlikti ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* optimizavimo tyrimai mitybinėje terpėje panaudojant skirtingus anglies šaltinius. Didžiausia ksantano išeiga, tai yra 11,06 g/l, gauta naudojant substratą maltozę ir gautą polisacharidą nusodinant tirpikliu acetonu.
2. Atlikti ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* optimizavimo tyrimai mitybinėje terpėje panaudojant alternatyvius anglies šaltinius. Glicerolis nėra tinkamas pasirinkimas ksantano gamybai, o panaudojant kokosų palmių žiedų cukrų galima pasiekti 7,10 g/l išeigą.
3. Atlikti skirtingų tirpiklių poveikio ksantano nusodinimui bei galutinei produkto išeigai palyginimo tyrimai. Nepriklausomai nuo substrato, acetonas yra tinkamiausias tirpiklis ksantano išskyrimui. Mažiausia ksantano išeiga gauta naudojant metanolį.
4. Nurodytas optimalus ksantano gavimo iš *Xanthomonas campestris* būdas panaudojant substratą maltozę ir tirpiklį acetoną. Pateikta aparatūrinė optimali ksantano gavimo schema.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. GLAZER, A. N. and Hiroshi NIKAIDO. *Microbial Biotechnology – Fundamentals of Applied Microbiology*. Cambridge University Press, 2007. 272-281. ISBN 9781139465632.
2. BRANDAO, L. V. et al. Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: xanthan production and characterization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2013, 30(4), ISSN 0104-6632.
3. ROSALAM, S, ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestri* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006, 39(2), 197-207. ISSN 0141-0229.
4. BECKER A. et al. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/ genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998, 50(2), 145-152. ISSN 1432-0614.
5. DA SILVA CARVALHO, M. A. et al. Xanthan gum: properties, production conditions, quality and economic perspective. *Journal of food and nutrition research*. 2015, 54(3), 185-194. ISSN 1336-8672.
6. HUBLIK, G. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Xanthan. Elsevier, 2016, 10. 221-229. ISBN 978-0-12-803581-8.
7. SWORN, G. *Handbook of Hydrocolloids*. Woodhead Publishing Ltd, 2009, 2nd ed. 186-203. ISBN 978-1-1127-4398-0820-7.
8. GHAZAL, S. M. A. et al. Genetically Modified Strains of *Xanthomonas campestris* Higher Xanthan Producer and Capable to Utilize Whey. *Current Research in Bacteriology*. 2011, 4(2), 44-62.
9. CARIGNATTO, C. R. R. et al. New Culture Medium to Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Indian Journal of Microbiology*. 2011, 51(3), 283-288. ISSN 0973-7715.
10. GARCIA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*. 2000, 18(7), 549-579. ISSN 0734-9750.
11. ROSALAM, S., R. ENGLAND. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestri* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006, 39(2), 197-207. ISSN 0141-0229.
12. KOMISIJOS REGLAMENTAS (ES) Nr. 1129/2011 kuriuo iš dalies keičiamas Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (EB) Nr. 1333/2008 II priedas sudarant Sąjungos maisto priedų sąrašą. 2011 m. lapkričio 11 d.
13. KATZBAUER, Barbara. Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*. 1998, 59(1-3), 81-84. ISSN 1662-8985.
14. MIKAC, U. et al. Dynamics of water and xanthan chains in hydrogels studied by NMR relaxometry and their influence on drug release. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019, 563, 373-383.
15. HAN, G. et al. Low molecular weight xanthan gum for treating osteoarthritis. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 164, 386-395. ISSN 0144-8617.

16. POOJA, D. et al. Xanthan gum stabilized gold nanoparticles: Characterization, biocompatibility, stability and cytotoxicity. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 110, 1-9. ISSN 0144-8617.
17. PETRI, D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015, 132(23). ISSN 0021-8995.
18. WELLESLEY, M. Xanthan Gum Market To See 5.7 % Annual Growth Through 2022. BBC Research. 2017.
19. CHELLAPANDI, P. *Laboratory manual in Industrial Biotechnology*. Pointer Publishers, 2007. 167-170. ISBN 9788171324880.
20. CHAKAROVA, N. et al. Assessment of glucose variability in subjects with prediabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2019, 151, 56-64. ISSN 0168-8227.
21. Peptono tiekėjo „Sigma-Aldrich” internetinis puslapis [interaktyvus]. [Žiūrėta 2019-04-26]. Prieiga per: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/microbiology/protein-sources.html>
22. Mielių ekstrakto tiekėjo „Sigma-Aldrich” internetinis puslapis [interaktyvus]. [Žiūrėta 2019-04-26]. Prieiga per: <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/microbiology/microbiology-products.html?TablePage=8657623>
23. EDNEY, M. J., M. S. IZYDORCZYK. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, 2003, 2nd ed. 3671-3677. ISBN 9780080917917.
24. Agaro tiekėjo „Sigma-Aldrich” internetinis puslapis [interaktyvus]. [Žiūrėta 2019-04-26]. Prieiga per: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/70148?lang=en®ion=LT&gclid=EAIAIaQobChMIpLiq4K7p4QIVEM53Ch0MkQ3CEAAYASAAEgLDqfD_BwE
25. Amonio hidrofosfato tiekėjo „Sigma-Aldrich” internetinis puslapis [interaktyvus]. [Žiūrėta 2019-04-29]. Prieiga per: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/215996?lang=en®ion=LT>
26. Kalio hidrofosfato tiekėjo „Sigma-Aldrich” internetinis puslapis [interaktyvus]. [Žiūrėta 2019-04-29]. Prieiga per: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/p3786?lang=en®ion=LT>
27. Magnio sulfato tiekėjo „Sigma-Aldrich” internetinis puslapis [interaktyvus]. [Žiūrėta 2019-04-26]. Prieiga per: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m2643?lang=en®ion=LT>
28. BONATSOU, S. et al. Effect of osmotic dehydration of olives as pre-fermentation treatment and partial substitution of sodium chloride by monosodium glutamate in the fermentation profile of Kalamata natural black olives. *Food Microbiology*. 2017, 63, 72-83. ISSN 0740-0020.
29. Nežinomas autorius. *Methods in Microbiology*. Academic Press, 1990, 429-430. ISBN 9780080860510.
30. Monokalio fosfato tiekėjo „Sigma-Aldrich” internetinis puslapis [interaktyvus]. [Žiūrėta 2019-05-14]. Prieiga per: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product Information Sheet/1/p5655pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product%20Information%20Sheet/1/p5655pis.pdf)

31. Magnio chloride tiekējo „Sigma-Aldrich” internetinis puslapis [interaktyvus]. [Žiūrēta 2019-05-16]. Prieiga per: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/m8266pis.pdf
32. Natrio sulfato tiekējo „Sigma-Aldrich” internetinis puslapis [interaktyvus]. [Žiūrēta 2019-04-26]. Prieiga per: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/106639?lang=en®ion=LT>
33. Boro rūgšties tiekējo „Sigma-Aldrich” internetinis puslapis [interaktyvus]. [Žiūrēta 2019-05-14]. Prieiga per: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/b6768pis.pdf
34. DIMAPILIS, E. A. S. et al. Zinc oxide nanoparticles for water disinfection. *Sustainable Environment Research*. 2018, 28(2), 47-56. ISSN 2468-2039.
35. BAILEY, J. K. et al. Growth Mechanisms of Iron Oxide Particles of Differing Morphologies from the Forced Hydrolysis of Ferric Chloride Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1993, 157(1), 1-13. ISSN 0021-9797.
36. SCHADE, A. L. Cobalt and bacterial growth, with special reference to *Proteus Vulgaris*. *Journal of Bacteriology*. 1949, 58(6), 811-822. ISSN 0021-9193.
37. JOHNSON, J. M., F. D. CONFORTI. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, 2003, 2nd ed. 2748-2752. ISBN 9780080917917.
38. CHEN, J. C. P., C. C. CHOU. *Cane Sugar Handbook: A Manual for Cane Sugar Manufacturers and Their Chemists*. New York: J. Wiley, 1993, 12th ed. ISBN 9780471866503.
39. GREBNER, D. L. et al. *Introduction to Forestry and Natural Resources*. Academic Press, 2013. 221-241. ISBN 978-0123869012.
40. BAIKOW, V. E. *Manufacture and Refining of Raw Cane Sugar*. Elsevier, 2013, 2nd ed. ISBN 9780444418968.
41. DUNN, I. F. et al. *Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press, 2009, 407-416. ISBN 9780080446172.
42. MOON, Hee-Jung et al. Biotechnological production of erythritol and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 86(4), 1017-1025. ISSN 0175-7598.
43. BASSOLI, A., L. MERLINI. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Sweeteners. Academic Press, 2003, 2nd ed. 5688-5695. ISBN 9780080917917.
44. Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for Use in Food in the United States. Jungtinių Amerikos Valstijų Maisto ir vaistų administracijos puslapis [interaktyvus]. [Žiūrēta 2019-05-29]. Prieiga per: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-information-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states>
45. ARIF, M. et al. The beneficial uses of glycerin as an alternative energy source in poultry diets. *World's Poultry Science Journal*. 2017, 73(1), 136-144. ISSN 0043-9339.
46. APRIYANTONO, A. et al. Rate of browning reaction during preparation of coconut and palm sugar. *International Congress Series*. 2002, 1245, 275-278. ISSN 0531-5131.
47. GUNNERSON, K. J., I. N. CO. *Critical Care Nephrology*. Iatrogenic and Poison-Derived Acid Base Disorders. Elsevier, 2019, 2nd d. 417-423. ISBN 9781416042525.
48. NIEUWENHUYZEN, W. *Polar Lipids*. Production and Utilization of Natural Phospholipids. Elsevier, 2015, 245-276. ISBN 9781630670443.

49. LENNARTSSON, P. R. et al. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource Technology*. 2014, 165, 3-8. ISSN 0960-8524.
50. BRUST, J. C. M. *Clinical Neurotoxicology*. Syndromes, Substances, Environments. Elsevier, 2009, 329-337. ISBN 9780323052603.
51. OZDAL, M., E. B. KURBANOGLU. Valorisation of chicken feathers for xanthan gum production using *Xanthomonas campestris* MO-03. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018, 16(2), 259-263. ISSN 2150-3516.
52. MASTEIKIENĖ, Regina Rita. *Maisto produktų mikrobiologija*. 1 knyga. KTU leidykla „Technologija“, 2010, 211-213. ISBN 9955-09-2432.
53. BUCKE, C. *Carbohydrate Biotechnology Protocols*. Springer Science & Business Media, 1999, 7-18. ISBN 978-0585241036.
54. GUDONIS, Aloyzas. *Pieno gaminių technologija*. Vadovėlis. KTU leidykla „Technologija“, 2012, 278-279. ISBN 978-609-02-0696-6.
55. CRUZ, A. J. G. et al. Use of Green Coconut Shells as an Alternative Substrate for the Production of Xanthan Gum on Different Scales of Fermentation. *Polimeros*. 2012, 23(05), ISSN 0104-1428.