



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Ksantano susidarymo iš *Xanthomonas campestris*
bakterijų tyrimai**

Baigiamasis magistro projektas

Dovilė Gudavičiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

**Ksantano susidarymo iš *Xanthomonas campestris*
bakterijų tyrimai**

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Dovilė Gudavičiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

M.d. dr. Ingrida Tumosienė

Recenzentė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Dovilė Gudavičiūtė

Ksantano susidarymo iš *Xanthomonas campestris* bakterijų tyrimai

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Dovilės Gudavičiūtės, baigiamasis projektas tema „Ksantano susidarymo iš *Xanthomonas campestris* bakterijų 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.

Dovilė Gudavičiūtė

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Gudavičiūtė, Dovilė. Ksantano susidarymo iš *Xanthomonas campestris* bakterijų tyrimai. Magistro baigiamasis projektas, vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: *Xanthomonas campestris*, ksantano gamyba, savybės, augimo terpės.

Kaunas, 2020. 72 p.

Santrauka

Ksantanas yra vienas iš labiausiai pramonėje naudojamų ekopolisacharidų, kuris plačiai taikomas maisto, farmacijos, kosmetikos, tekstilės, žemės ūkio pramonės produktų gamyboje. Pagrindinės savybės, nulemiančios ksantano panaudojimą pramonėje yra: didelė klampa, pseudoplastinės savybės, atsparumas fermentų, druskų poveikiui, stabilumas plačiame pH ir temperatūros diapazone, sinergizmas su kitais biopolimerais. Metinis ksantano poreikis išauga net 5,7 %. Ksantano gamybos technologijos optimizavimas ekologiniu ir ekonominiu požiūriu šiuo metu yra labai svarbi ir aktuali tyrimų sritis.

Iki šiol atliktų mokslinių tyrimų metu labai daug sužinota apie ksantano biosintezę, molekulinę struktūrą bei savybes. Bet vis dar yra klausimų ir iššūkių, kurie galėtų pagerinti ksantano gamybos efektyvumą. Vienas iš tokių augimo ir fermentacijos terpių sudėties bei ksantano gryninimo proceso optimizavimas. Vis dar gerai neištirtas kitų *Xanthomonas* rūšių panaudojimas ksantano gamybai, jų modifikavimas. Taip pat aktuali tyrimų sritis susijusi su pramonės atliekų, bei atsinaujinančių išteklių panaudojimu ksantanui gaminti.

Baigiamojo projekto tyrimų metu nustatyta, jog didžiausia ksantano išeiga pasižymėjo terpės, kuriose anglies šaltiniu naudota gliukozė ar fruktozė. Išsiaiškinta jog anglies šaltinio koncentracija terpėje neturėtų viršyti 2–4 %. Didesnės anglies koncentracijos slopina bakterijų dauginimąsi. Tyrimų metu gauta didesnė ksantano išeiga azoto šaltiniu naudojant diamonio fosfatą ((NH₄)₂HPO₄). Galime teigti, jog biopolimero ksantano gamybai tinkamesnis neorganinės kilmės azotas. Pastebėta, kad naudojant per didelį pridėtinių medžiagų kiekį bakterijų augimo terpėje gaunama mažesnė ksantano išeiga. Per didelis terpės medžiagų kiekis gali sukurti nepalankias sąlygas biopolimero sintezei. Nustatyta, jog anglies ir azoto šaltinių santykis mitybinėje terpėje svarbesnis nei atskiros šių medžiagų koncentracijos. Šis santykis fermentacijos terpėje turėtų būti mažesnis nei bakterijų augimo terpėje.

Gudavičiūtė, Dovilė. Studies of Xanthan Production by *Xanthomonas Campestris* Bacteria. Master's Final Degree project, supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė. Chemical technology faculty, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: *Xanthomonas campestris*, xanthan production, properties, growth media.

Kaunas, 2020. 72 pages.

Summary

Xanthan gum is one of the most popular copolysaccharides that is used in food, pharmacy, cosmetics, textile, agriculture industries. The main xanthan gum characteristics that made it so popular are: high viscosity, pseudoplastic features, resistance to the effect of enzymes and salts, high stability in a wide range of pH and temperature, synergism with other biopolymers. Annual need of xanthan each year grows 5,7 %. Therefore xanthan gum production optimization is so important and actual nowadays in ecological and economical means.

Many investigations are done regarding to the xanthan production. These researches have revealed important information about xanthan biosynthesis, molecular structure and characteristics. But there are still some questions and challenges that must be overcome. Few of them are fermentation medium composition and recovery process optimization. Moreover there are still not enough information about the use of other *Xanthomonas* strains for xanthan gum production and their modification. Furthermore important research area is with the usage of renewable resources and production waste as a carbon source for xanthan gum production.

During the final project research, identified that using as a carbon source glucose and fructose have been produced the highest xanthan gum yield. Determined that carbon source shouldn't be higher than 2–4 %. As when the higher carbon source is used it inhibits bacterial cell growth. Established that using diammonium phosphate ((NH₄)₂HPO₄) as a nitrogen source received the highest yield of xanthan gum. It can be affirmed that neorganic type nitrogen is better for xanthan gum production than organic. Using too much of additional materials xanthan gum production yield might be reduced. The overloaded medium might create unfavorable conditions for xanthan production. Determined that carbon and nitrogen source ratio in the medium is more important than their concentrations. This ratio should be bigger in the bacteria growth media.

Turinys

Įvadas	8
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų apibūdinimas	10
1.2. Ksantano fizikinės bei cheminės savybės.....	11
1.3. Ksantano antioksidacinis aktyvumas.....	13
1.4. Ksantano biosintezė.....	14
1.5. Biotechnologiniai ksantano gamybos metodai	14
1.6. Pramoninė ksantano gamyba.....	15
1.7. Veiksniai, turintys įtakos ksantano išskyrimui	17
1.7.1. Fermentacijos proceso trukmės įtaka	18
1.7.2. pH įtaka	18
1.7.3. <i>Xanthomonas</i> rūšies įtaka	18
1.7.4. Bakterijų augimo terpė	18
1.7.5. Temperatūros įtaka	19
1.7.6. Maišymo ir oro padavimo greičių įtaka.....	19
1.7.7. Gamybos metodo įtaka	19
1.8. Ksantano išskyrimas	20
1.9. Ksantano panaudojimas.....	21
1.10. Ekonominis ksantano gamybos vertinimas	23
1.11. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas	24
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	25
2.1. Tyrimų metu naudota bakterijų kultūra	25
2.2. Tyrimų metu naudotos medžiagos.....	25
2.3. Tyrimų metu naudota įranga, laboratoriniai indai ir priemonės.....	26
2.3.1. Laboratoriniai indai ir priemonės	26
2.3.2. Įranga	26
2.4. <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų persėjimas į <i>Petri</i> lėkštelės paviršiniu būdu.....	27
2.5. Terpių gamyba.....	27
2.5.1. YM terpės gamyba	27
2.5.2. YM-T terpės gamyba.....	28
2.5.3. Produkcijos terpės gamyba.....	28
2.6. <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų kultūros perkėlimas į YM terpę	29
2.7. Bakterijų kultūros auginimas, perkėlimas į YM-T terpę.....	29
2.8. YM-T terpės perkėlimas į produkcijos, fermentacijos terpę	30

2.9. Ksantano išskyrimas iš produkcijos terpės	30
2.10. Principinė terpių gamybos schema	31
2.10.1. YM terpės gamybos schema.....	31
2.10.2. YM-T terpės gamybos schema	31
2.10.3. Produkcijos terpės gamybos schema	31
2.11. Principinė ksantano išskyrimo schema.....	32
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	33
3.1. Rezultatų apibendrinimas	55
4. Rekomendacijų dalis	61
Išvados	63
Literatūros sąrašas	64
Priedai.....	69

Įvadas

Ksantanas – natūralus ekopolisacharidas – biopolimeras, kuris plačiai naudojamas įvairiose pramonės šakose kaip biopolimeras [1]. Jis išgaunamas fermentacijos būdu naudojant *Xanthomonas campestris* bakterijas. Ksantano išgryninimas yra brangus ir sudėtingas procesas, todėl labai svarbu parinkti tinkamiausias fermentacijos sąlygas. Vienas iš svarbiausių ksantano gamybos pasirinkimų, galinčių keisti ksantano išėigą, yra bakterijų augimo terpių sudėtis (anglies, azoto šaltiniai ir kiti priedai) bei jų koncentracijos.

Ksantanas dėl savo plataus panaudojimo, vertingų ir išskirtinių savybių tapo vienas iš labiausiai naudojamų biopolimerų pramonėje. Ksantaną gamina, augalams patogeninį poveikį turinčios gramneigiamos aerobinės *Xanthomonas campestris* bakterijos. Ksantanas pasižymi išskirtinėmis savybėmis – jis išlieka nepakitęs esant plačiam pH ir temperatūros intervalui, tirpus tiek šiltame, tiek šaltame vandenyje, pasižymi dideliu klampumu, naudojant net ir mažas jo koncentracijas [2]. Jis naudojamas, tirštikliu, gelizuojančiu agentu maisto pramonėje, stabilizuojančiu agentu ledų gamyboje. Ne maisto pramonėje, ksantanas gali būti taikomas: agrochemikalų suspensijų gamyboje, asmeninės higienos priemonių ir kosmetikos, tekstilės gamyboje, audinių inžinerijoje ir farmacijoje, degalų pramonėje. Jis taip pat gali būti naudojamas trintį mažinančiu agentu [3].

Šiais laikais dauguma tyrimų atliekama siekiant panaudoti kuo ekologiškesnes medžiagas bei pramonės atliekas ksantano terpėms gaminti [4]. Tokiu būdu skatinamas antrinių žaliavų naudojimas aukštos vertės medžiagoms gaminti. Taip pat vis didesnis dėmesys skiriamas pigesnių žaliavų panaudojimui terpių gamyboje, siekiant sumažinti ksantano fermentacijos išlaidas [5]. Pagrindinis gamybinių įmonių tikslas yra užtikrinti tvarų ir efektyvų procesą. Išlaidos tiesiogiai susijusios su proceso efektyvumu. Ksantano išėigos optimizavimo tyrimai atliekami jau daugelį metų. Tačiau vis dar nenustatyta optimali *Xanthomonas campestris* bakterijų augimo ir produkcijos – fermentacijos terpių sudėtis. Optimizuojant ksantano išėigą, labai svarbu atsižvelgti ir į susidariusio ksantano savybes: klampumą, antioksidacinį aktyvumą, tirpumą, organoleptines savybes. Baigiamojo projekto metu palyginti 2 metodai, kurie atspindi terpių sudėties optimizavimo poveikį ksantano susidarymui, savybėms ir kaštams.

Baigiamojo **darbo tikslas** – išanalizuoti ksantano susidarymo priklausomybę nuo *Xanthomonas campestris* bakterijų produkcijos – fermentacijos bei augimo terpių sudėties.

Darbo uždaviniai:

1. optimizuoti *Xanthomonas campestris* bakterijų augimą;
2. nustatyti augimo terpių sudėties (anglies ir azoto šaltinių) įtaką ksantanui susidaryti;
3. įvertinti tinkamiausią organinį tirpiklį ksantanui išskirti iš *Xanthomonas campestris* bakterijų;
4. pateikti siūlomą ksantano gamybos iš *Xanthomonas campestris* bakterijų aparatūrinę schemą.

Anglis ir azotas turi tiesioginį poveikį bakterijų dauginimuisi ir biopolimerų sintezei [6]. Anot atliktų mokslinių tyrimų, teigiamu poveikiu ksantano išėigai pasižymi tokie junginiai kaip citratas ir glutamatas [7]. Siekiant įsitikinti jau atliktų tyrimų teisingumu, svarbu išsiaiškinti papildomų medžiagų, tokių kaip citratas, glutamatas, įtaką ksantano susidarymui. Labai svarbu įsigilinti į bakterijų biomasės koncentracijos ir ksantano išėigos priklausomybę. Tokiu būdu įvertinti, ar terpės sudėtis ne tik skatina bakterijų dauginimąsi, bet ir sudaro tinkamas sąlygas biopolimero – ksantano susidarymui. Tyrimų rezultatams įvertinti ir palyginti yra naudinga taikyti alternatyvias ksantano

išskyrimo metodikas. Baigiamojo darbo tyrimų metu ksantanui išskirti naudoti keli skirtingi organiniai tirpikliai: metanolis, acetonas, izopropanolis, bioetanolis. Svarbu ne tik gauti didžiausią ksantano išeigą, bet ir geriausiomis savybėmis pasižymintį ksantaną. Viena iš svarbiausių ksantano savybių – antioksidacinis aktyvumas [8].

Dėl įvairių ksantano panaudojimo galimybių, kyla vis didesnis poreikis ksantano gamybai naudoti alternatyvius atsinaujinančius šaltinius ar pramonės atliekas. Atliekama vis daugiau mokslinių tyrimų susijusių su ksantano fermentacijos sąlygų optimizavimu, gamybos modernizavimu, efektyvumo didinimu ir kaštų mažinimu.

1. Literatūros apžvalga

1.1. *Xanthomonas campestris* bakterijų apibūdinimas

Xanthomonas campestris yra *Pseudomonaceae* bakterijų šeimos gentis, turinti net 29 skirtingas rūšis ir 6 porūšius. Šios bakterijos priskiriamos chemoorganotrofams, gramneigiamoms aerobinėms bakterijoms, turinčioms griežtą deguonies pasisavinimo metabolizmą, kurio galutinis elektronų akceptorius – deguonis [9]. *Xanthomonas campestris* pasižymi patogeniškumu bei sukelia juodąjį pūvinį daugumai augalų, vaisių, daržovių: pomidorams, paprikoms, cukranendrėms, bananams, javams [10]. Kadangi šių bakterijų optimali augimo temperatūra 25–30 °C, jos priskiriamos mezofilinėms bakterijoms [11]. Temperatūrinis diapazonas siekia 4–37 °C. Tačiau esant žemesnei nei 10 °C terpės temperatūrai, bakterijos tampa neaktyvios [12]. Mokslinių tyrimų metu nustatyta, kad tinkamiausias šių bakterijų augimo terpės pH yra neutralus (6,5–7,5), žemesnėje nei pH 4,5 stabdomas ląstelių augimas. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimą stabdo 6 % NaCl, 30 % gliukozė, 0,01 % švino acetatas, tioninas, 0,1 % trifenil-tetrazolio chloridas [13]. Šios bakterijos lengvai skaido baltymus, kai kurios rūšys geba hidrolizuoti celiuliozę, pektiną, krakmolą ir polisorbata. Pagrindinės riebalų rūgštys randamos *Xanthomonas campestris* bakterijų ląstelėse yra 9-metildekano rūgštis, 3-hidroksi-9-metildekano rūgštis, 3-hidroksi-11-metildodekano rūgštis [14]. Ši riebalų rūgščių sudėtis išskiria *Xanthomonas* nuo kitų bakterijų.

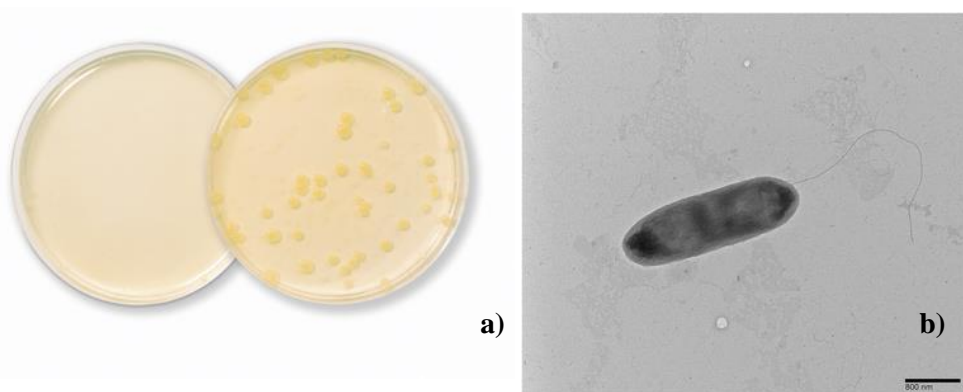
Bakterijų kamieną nulemia bakterijų genomo struktūra. Skirtingi *Xanthomonas campestris* bakterijų kamienai turi genomo panašumų: žiedines chromosomas, mobilius genetinius elementus bei baltymus koduojančias sekas [15]. *Xanthomonas campestris* bakterijos – tai lazdelės formos bakterijos charakteringos tuo, jog turi dvigubą ląstelių sienelę ir gelsvą pigmentą – ksantomonadiną [16]. Šios bakterijos turi filamentinę struktūrą ir 1,7–3 μm ilgio polinį žiuželį, padedantį bakterijoms perduoti baltymus augalams bei padidinti jų judrumą vandenyje. *Xanthomonas campestris* bakterijoms būdingas: 0,4–1,0 μm plotis ir 1,2–3,0 μm ilgis (žr. 1.1. pav.). Šios bakterijos turi kapsulę, kurioje yra polisacharidas – ksantanas, kuris mažai prisitvirtinęs prie ląstelių sienelių.

Xanthomonas campestris geba oksiduoti gliukozę. Gliukozės metabolizmui dažniausiai naudojamas „Enter – Doudoroff“ kelias, taip pat būdingi trikarboksirūgščių ir glioksilato ciklai [17]. Dėl šių savybių gryna *Xanthomonas campestris* bakterijų kultūra gali išskirti ekopolisacharidą – ksantaną. Šios bakterijos negamina kitų biopolimerų. Dėl to gali didelį kiekį substrato paversti ekopolisacharidu – ksantanu [18]. Ksantano gamyba vykdoma reaguojant į veiksnius sukeliančius biotinį ir abiotinį stresą [19]. Šį stresą sukelia ekstremalūs terpės pokyčiai (pH, temperatūra, terpės sudėtis). Ksantanas yra naudingas *Xanthomonas campestris* bakterijų ląstelėms. Dėl lipnumo, anijoninės struktūros, vandens surišimo, ksantanas padeda bakterijų ląstelėms prisitvirtinti prie augalo paviršiaus, apsisaugoti nuo vandens trūkumo ir hidrofobinių molekulių poveikio, kaupti maisto medžiagas ir imobilizuoti toksinius junginius [20]. Taip pat padeda bakterijoms užsimaskuoti ir išvengti augalo atsako į neigiamą bakterijų poveikį.

Pagal mokslininkų atliktus tyrimus, šių bakterijų kolonijoms būdingos savybės: išgaubta forma, gleivėtumas, gelsvas atspalvis [21]. *Xanthomonas campestris* bakterijų kolonijos vaizdas *Petri* lėkštelėje pateiktas 1.1. paveiksle. Skirtingų rūšių *Xanthomonas* bakterijų augimo greitis skiriasi. Kai kurios rūšys auga labai greitai, suformuodamos matomas kolonijas per 24–36 valandas. Kitos rūšys suformuoja kolonijas tik per 2–3 dienas [22]. Mokslinių tyrimų metu nustatyta, jog *Xanthomonas campestris* bakterijos gali būti dauginamos standartinėse laboratorinių tyrimų metu naudojamose

terpėse (mitybinėje agarų terpėje, GYCA terpėje, GPPYA terpėje, YM agarė), susidarant kelioms skirtingoms šių bakterijų atmainoms. Šių tyrimų metu nustatytos trys atmainos: „L“ (angl. „large“ – didelė, stambi) bakterijų kolonijų atmaina, „Sm“ (angl. „small“ – smulki, maža) bakterijų kolonijų atmaina, „Vs“ (angl. „very small“ – labai maža) bakterijų kolonijų atmaina [24]. „L“ bakterijų kolonijos 4–5 mm diametro, klampios konsistencijos, šviesiai gelsvos spalvos. Šios atmainos *Xanthomonas campestris* bakterijos pasižymi didžiausia ksantano išėiga bei didele piruvato koncentracija. „Sm“ bakterijų kolonijos 2 mm diametro, klampios konsistencijos, tamsiai geltonos spalvos. Šio kamieno bakterijų ksantano išėiga bei piruvato koncentracija ląstelėse mažesnė, lyginant su „L“ atmaina. „Vs“ bakterijų kolonijos 1 mm diametro, neklampios konsistencijos, blankiai gelsvos spalvos. Šios atmainos *Xanthomonas campestris* bakterijos negamina ksantano [9]. Ksantanui gaminti naudojamos „L“ atmainos *Xanthomonas campestris* bakterijos.

Labai svarbus tinkamas šių bakterijų saugojimas prieš perkeltant bakterijas į augimo (YM-T) terpę. Netinkamai saugant šias bakterijas galima degeneracija. Taikomi skirtingi ilgalaikio ir trumpalaikio bakterijų saugojimo būdai [23]. Ilgalaikio saugojimo metodas mažai taikomas. Ši saugojimo technika pagrįsta bakterijų liofilizacija ir šaldymu 10 % glicerolio terpėje. Trumpalaikio saugojimo metu galimas nedidelis bakterijų dauginimasis. Ląstelės auginamos kompleksinėje kietos ar skystos formos terpėje (YM) 18–20 valandų, 25°C temperatūroje [24]. Po to jos saugomos 4°C temperatūroje. Bakterijų kultūra kas 14 dienų turi būti perkelta į naujai paruoštą terpę, siekiant išvengti ląstelių degradacijos. Prieš naudojant ląsteles ksantano gamybai turi būti patikrinamas jų gyvybingumas. Patikrinimo metu YM agaras inkubuojamas 3 dienas 25°C temperatūroje [24]. Gyvybingos bakterijų kolonijos – ryškiai geltonos spalvos, apvalios formos, 4–5 mm skersmens.



1.1 pav. a) *Xanthomonas campestris* bakterijų kolonijų vaizdas Petri lėkštelėje **b)** *Xanthomonas campestris* bakterija

1.2. Ksantano fizikinės bei cheminės savybės

Dauguma bakterijų gamina polisacharidinius junginius, tokius kaip: lipopolisacharidus, kapsulinius polisacharidus, ekopolisacharidus (EPS) [25]. EPS tai aukštos molekulinės masės angliavandenių polimerai, kurie gaminami ir išskiriami bakterijų ląstelių. Jie padengia daugumos ląstelių paviršius turėdami reikšmingos įtakos biologiniams mechanizms, tokiems kaip imuninė sistema, adhezija, infekavimas, signalų perdavimui [26]. Nepaisant milžiniško bakterijų išskiriamo ekopolisacharidų kiekio, tik nedidelė dalis jų panaudojami pramonėje (dekstranas, ksantanas ir kt.) [27].

Ksantanas – mikrobiologinis ekopolisacharidas gaminamas iš *Xanthomonas campestris* bakterijų, gerai tirpus vandenyje, turintis gerą biologinį suderinamumą, aukštą molekulinę masę, šakotą polimerinę struktūrą. Dėl didelės klamos net esant mažoms ksantano koncentracijoms, šlyties skiedimo savybių, pseudoplastinio elgesio ir terminio stabilumo, ksantanas stabilesnis už kitus polisacharidus ir polimerus. Didelis hidroksi ir karboksi grupių skaičius optimizuoja ksantano fizikochemines ir biologines savybes [28]. Ksantanas taip pat laikomas anijoniniu polielektrolitu dėl sąveikos su katijonais (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), kurie skirtingomis proporcijomis sujungti su rūgšties radikalu [29].

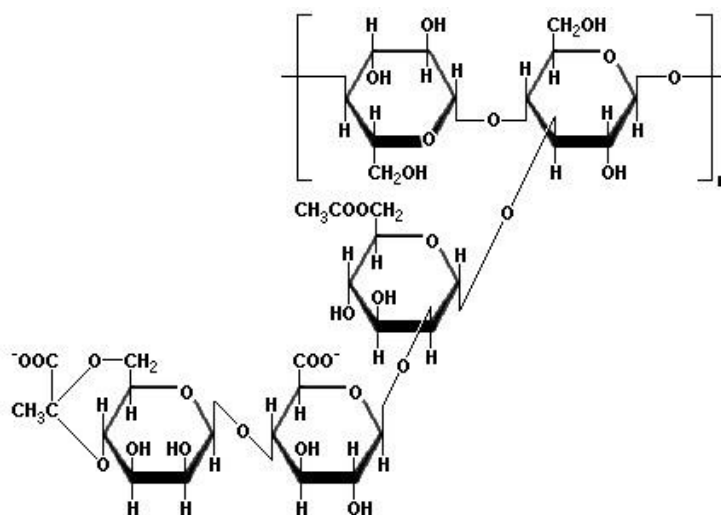
Ksantanas – heteropolisacharidas, kurio pirminę struktūrą sudaro pasikartojantys pentasacharidų vienetai. Vieną pentasacharido vienetą sudaro: 2 gliukozės veinetai, 2 manozės vienetai ir 1 gliukurono rūgšties vienetas [9]. (žr. 1.2. pav.) Pagrindinę grandinę sudaro β -D-gliukozės vienetai sujungti pirmoje ir ketvirtoje padėtyse. Ksantano pagrindinės grandinės cheminė struktūra identiška celiuliozės struktūrai. Trisacharidų šoninės grandinės sudarytos iš: α -D-gliukurono rūgšties vieneto, kurią supa du D-manozės vienetai sujungti su gliukozės pagrindine grandine per deguonies atomą. Apytiksliai pusė galinių D-manozės vienetų turi piruvo rūgšties liekaną sujungtą 4 ir 6 padėtyse. D-manozės vienetai sujungti su pagrindine grandine turi 6 padėtyje prijungtą acetilinę grupę. Acetilo ir piruvo rūgščių buvimas, nulemia anijoninį polisacharido tipą [30].

Ksantano trisacharidų grandinės tvirtai sujungtos su polimero pagrindine grandine suformuoja antrinę polimero struktūrą. Šios struktūros antiparaleliai surikiuotos į dvigubą spiralę, sujungtos intramolekulinių ryšių bei vandenilinių jungčių [31]. Dėl tokios tvirtos polimero struktūros ksantanas gali egzistuoti viengubos, dvigubos ar net trigubos spiralės pavidalu [32]. Dėl temperatūros ir joninės jėgos pokyčių gali persitvarkyti dvigubos spiralės konformacija [33]. Esant žemai terpės temperatūrai bei didelei joninei jėgai, ksantano struktūra viengubos ar dvigubos spiralės, kurios ilgis apie 350 Å. Esant aukštai terpės temperatūrai bei mažai joninei jėgai, ksantano struktūra tampa lanksčia spirale, kurios ilgis 50 Å [34]. Spiralės konformacijoms įtakos taip pat gali turėti ksantano molekulinė struktūra – acetilo ir piruvato grupių buvimas, kurios stabilizuoja ar destabilizuoja struktūrą. Acetilo grupės stabilizuoja ksantano struktūrą, nes jos išsidėsčiusios arčiau spiralinės struktūros centro. Piruvato molekulės išsidėsčiusios spiralinės struktūros išorėje. Dėl to šoninės grandinės dar labiau atitolsta nuo pagrindinės grandinės, sumažėja elektrostatinės jėgos, destabilizuojama ksantano molekulės struktūra [35]. Tad ksantano struktūra yra stabilesnė, kuo joje mažiau piruvato grupių. Šių funkcinių grupių kiekį ksantano molekulėje nulemia: *Xanthomonas* padermė, terpės sudėtis, fermentacijos sąlygos, molekulės struktūros modifikacijos [36]. Acetilo ir piruvato funkcinių grupių buvimas taip pat turi įtakos ksantano tirpalo savybėms: klampai, atsparumui terpės temperatūros pokyčiams, tirpikliams, druskoms. Druskos stabilizuoja ksantano struktūrą, prisideda prie ksantano funkcionalumo. Tačiau druskų poveikis ksantano tirpalams priklauso nuo druskos koncentracijos bei jonų kilmės [37]. Šio spiralės sąveikauja su kitomis polimero molekulėmis suformuodamos kompleksus. Ksantano molekulinė masė svyruoja nuo 2×10^6 iki 20×10^6 daltonų [9]. Ši molekulinė masės pasiskirstymą lemia spiralių sąveika bei kelių pavienių grandinių kompleksų susidarymas. Taip pat molekulinei masei turi įtakos fermentacijos sąlygos ksantano gamybos metu.

Ksantanas dėl polielektrolitinės prigimties labai tirpus tiek šaltame, tiek šiltame vandenyje bet netirpus daugumoje organinių tirpiklių. Ksantano terpės klampa priklauso nuo temperatūros, pH, biopolimero koncentracijos ir druskų kiekio [38]. Tirpalai, gauti ksantaną tirpinant vidutinėje temperatūroje, yra labai klampūs. Tirpinimo temperatūra turi įtakos molekulių konformacijai bei cheminiams ryšiams. Mokslinių tyrimu metu nustatyta, jog priklausomai nuo tirpinimo temperatūros

ksantano molekulės įgyja dvi konformacijas – spiralinę ir ritės formas [39]. Šios konformacijos ir nulemia terpės klampumą. Pastebėta, jog ksantanas gali sąveikauti su augalų galaktomanais – guaro derva, saldžiavausio pupmedžio derva. Sąveikos metu šios medžiagos sukelia sinergetinį poveikį terpės klampai padidinti [40].

Ksantanas nėra toksiškas, neslopina ląstelių augimo, nesukelia odos ar akių sudirginimo. Jis visame pasaulyje valdančiųjų institucijų patvirtintas, kaip maisto produktų gamybai tinkanti medžiaga, neturinti specifinių ribojimų. Šiai medžiagai suteiktas žymuo E-415. Maisto pramonė – viena pagrindinių ksantano sunaudojimo gamybos sričių.



1.2 pav. Ksantano cheminės struktūros fragmentas

1.3. Ksantano antioksidacinis aktyvumas

Dėl išskirtinių savybių: tirpumo, didelio klampumo, biologinio suderinamumo, stabilumo, ksantanas plačiai pritaikomas maisto, farmacijos, kosmetikos, tekstilės pramonėse [41]. Pastaruoju metu, populiarėjant produktams turintiems antioksidacinį poveikį, imta vis labiau domėtis ksantano antioksidaciniu aktyvumu bei jo panaudojimu antioksidacinį poveikį turinčių produktų gamyboje. Antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčios medžiagos geba atiduoti elektroną reaktyviam radikalui, taip jį neutralizuodamos ir sumažindamos ląstelių pažeidimą. OH radikalas laikomas dažniausiai ląstelių pažeidimą sukeliančiu radikalais. Būtent šis radikalas laikomas pavojingiausiu, dėl jo nesudėtingo reagavimo su kitomis molekulėmis, tokiomis kaip aminorūgštys, baltymai, DNR [8].

Ekopolisacharidų biologinis aktyvumas tiesiogiai susijęs su jų chemine struktūra (monosacharidų sudėtimi, jų struktūra). Ksantano struktūroje antioksidaciniam aktyvumui įtakos turi piruvato rūgšties kiekis [41]. Siekiant padidinti ksantano antioksidacinį aktyvumą, turi pasikeisti ksantano struktūra, tam gali būti pasitelkiamos cheminės modifikacijos. Nustatyta, jog hidroksilo radikalų inaktyvavimui taip pat didelę įtaką turi ksantano monosacharidų kiekis [41]. Poligliukurono rūgšties natrio druskos kiekis, piruvato rūgštis bei acetilinto ksantano kiekis taip pat turi teigiamą poveikį antioksidaciniam aktyvumui. Siekiant gauti ksantaną pasižyminčią didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu būtina išsiaiškinti kokios ksantano struktūros modifikacijos gali keisti šį požymį ir tai priatikyti pramoninėje gamyboje.

1.4. Ksantano biosintezė

Ksantano biosintezė yra kompleksiškas, sudėtingas, daugiapakopis procesas į kurį įeina *Xanthomonas campestris* bakterijų genų, atsakingų už ksantano gamybą, bei fermentų aktyvavimas [42]. Šiam procesui reikalingas didelis energijos kiekis. Proceso metu iš kultivavimo terpės pasisavinamas substratas, jis suskaidomas į nukleotidinius junginius, kurie vėliau naudojami ksantano molekulės monomerinių subvienetų susidarymui, polimerizacijai į polisacharidų grandines ir pašalinimui iš bakterijų ląstelių [43]. Ksantano biosintezė charakterizuojama kaip Wzx (pernaša)/Wzy (polimerazė) priklausantis mechanizmas [44]. Šio proceso metu heteropolisacharidų asimiliacija iš atskirų pasikartojančių subvienetų vykdoma ant lipidų pirmtako vidinėje membranos pusėje. Keletas glikoziltransferazių yra atsakingos už reakcijos katalizavimą. Integraliniai baltymai perkelia besiformuojantį polisacharidą per citoplazminę membraną. Kai polisacharidas pasiekia periplazminę erdvę polimerazė pradeda polimerizaciją [45].

Ksantano biosintezė susideda iš penkių etapų: (I) substrato įsisavinimo, (II) substrato panaudojimo nukleotidinių darinių sintezei, (III) monosacharidų subvienetų asimiliacijos, (IV) polisacharidų grandinių elongacijos, (V) ksantano išskyrimo į ląstelės išorę. Pirmo etapo metu angliavandenių šaltinis įsisavinamas iš terpės naudojant specifinius integralinius baltymus [46]. Nemodifikuota gliukozė gali į ląstelę patekti keliais būdais: difuzijos, aktyviosios pernašos arba gliukonato pavidalu. Antro etapo metu vykdomi du pagrindiniai procesai: fosforilinimas naudojant gliukokinazę bei periplazminė oksidacija. Glikolizės metu pentozės fosfato ir „Enter Daudoroff“ ciklai atsakingi už gliukozės metabolizavimą į piruvatą prieš patenkant į trikarboksirūgščių ciklą [42]. Gliukozės-6-fosfatodehidrogenazė būtina gliukozės skaidymui *Xanthomonas campestris* bakterijų ląstelėse ir atsakinga už nukleotidų pirmtakų susidarymą būtinų pasikartojančių ksantano pentasacharidų subvienetų susidarymui [19]. Trečiojo etapo metu vyksta monosacharidų subvienetų asimiliacija. Pentasacharidų subvienetai sudaromi iš: gliukozės, manozės ir gliukurono rūgšties santykiu 2:2:1. Šių subvienetų susidarymui būtinas GT fermentas. Pentasacharidų subvienetuose piruvato ir acetilo grupės prijungiamos prie manozės radikalo su piruviltransferazės, acetyltransferazės pagalba. Tolimesnio proceso metu pentasacharidų subvienetai perkeliama iš vidinės membranos pusės į periplazminę erdvę [19]. Ketvirto etapo metu periplazminėje erdvėje esantys pentasacharidų subvienetai sujungti su poliprenoliais polimerizacijos dėka gali dalyvauti polimerizacijoje. Penkto etapo metu ekopolisacharidai pašalinami į ląstelės išorę. Šio etapo metu taip pat labai svarbi GT fermentų veikla, kuri užbaigia polimerizaciją bei sužadina ksantano pašalinimą iš ląstelės [45]. Ksantano savybės, išėiga, cheminė struktūra gali būti pagerinta taikant *Xanthomonas campestris* bakterijų rūšies genetinį modifikavimą, gamybos sąlygų pokyčius, parenkant tinkamesnius substratų šaltinius. Pilnas ksantano biosintezės mechanizmas pavaizduotas 2 priede.

1.5. Biotechnologiniai ksantano gamybos metodai

Ksantano gamyba naudojant *Xanthomonas campestris* bakterijas apima du etapus. Pirmo etapo metu bakterijos yra kultivuojamos kompleksinėje terpėje, praturtintoje azotu. Antro etapo metu naudojama pirmo etapo metu gauta biomasė ksantanui gaminti kitoje terpėje [41]. Išsamiau ksantano sintezės struktūrą ištyrė Palaniraj ir Jayraman [47]. Jie suskirstė ksantano sintezę į tris etapus: paprastojo cukraus įsisavinimas ir pavertimas į nukleotidinius darinius, pentasacharido subvienetų sujungimas į vieną struktūrą, pasikartojančių pentasacharidų polimerizacija, ksantano išskyrimas [47].

Mokslininkų atlikti tyrimai parodė, jog didelę įtaką ksantanui gaminti turi pirmo etapo metu gauta mikroorganizmų biomasė [3]. Kuo didesnis biomasės kiekis gaunamas, tuo daugiau išskiriama ksantano. Atlikti tyrimai patvirtina terpių sudėties optimizavimo svarbą.

Didelę įtaką ksantanui gaminti turi anglies ir azoto šaltiniai: sacharozė, gliukozė, maltozė, celobiozė, mėsos peptonas, sojų peptonas ir amonio nitratas. Skirtingomis medžiagomis gaunama skirtinga ksantano išeiga bei savybės. Ksantanui gaminti taip pat labai svarbu tinkamai įvertinti anglies ir azoto terpėje santykį. Laisvas azotas riboja biomasės augimą, o anglis turi įtakos ksantanui susidaryti. Anglies šaltinis turi įtakos ne tik biopolimero susidarymui bet ir ląstelių augimui. Palyginamųjų tyrimų metu nustatyta, kad naudojant sacharozę anglies šaltiniu, gaunama didesnė ksantano išeiga ir ksantano klampumas, lyginant su gliukoze [41]. Ištyrus sukcinato, piruvato ir α -ketoglutarato poveikį ksantano gamybai nustatyta, kad šių organinių rūgščių perteklinės koncentracijos slopina ksantano formavimąsi [41]. Todėl šių medžiagų naudojimas terpių gamyboje turėtų būti labai ribojamas. Tie patys autoriai nustatė, kad citratas skatina ksantano gamybą. O pridėjus į bakterijų augimo terpę natrio glutamato, gaunamas ksantanas pasižymintis stabilesnėmis savybėmis. Mokslinių tyrimų metu nustatyta, jog druska stabilizuoja ksantano struktūrą ir savybes. Tad svarbu ne tik parinkti tinkamiausius anglies ir azoto šaltinius, nustatyti jų santykį terpėje, bet ir papildyti terpes pridėtinėmis medžiagomis: citratu, glutamatu, druskomis.

1.6. Pramoninė ksantano gamyba

Pramonėje ksantanas gaminamas *Xanthomonas campestris* rūšies bakterijų, NRRL B-1459 kamieno [43]. Tiriamas ir kitų *Xanthomonas* rūšių pramoninis panaudojimas ksantano gamybai. Visos ksantano rūšys pateikiamos 1 priede. Viso pasaulyje pagaminamo ksantano net 65 % panaudojama maisto pramonėje, 15 % – alyvos gamyboje, 20 % kitose srityse. Ksantano panaudojimo galimybės vis didėja, kasmetinis ksantano poreikis išauga net 5–10 % [48]. Pirmiausiai šį biopolimerą pradėjo gaminti Kinija ir Austrija. Šiais laikais didžiausi ksantano gamintojai: „Merck“, „Pfizer“, „Jungbuzlauer“ ir kt.

Pramoninė ksantano gamyba apima šiuos etapus: *Xanthomonas campestris* kultūros saugojimo, bakterijų gyvybingumo tikrinimo, terpės su pirmine bakterijų kultūra gamybos, fermentacijos, ksantano išskyrimo, ksantano gryninimo [9]. Visų etapų metu labai svarbu parinkti optimalias sąlygas (terpių sudėtį, įrangą, kultivavimo parametrus) ksantano gamybai. Nuo šių sąlygų priklauso ne tik ksantano išeiga bet ir kokybė.

Xanthomonas campestris kultūros saugojimo, bakterijų gyvybingumo tikrinimo etapo metu įsitikinama bakterijų kultūros kokybe – grynumu, gyvybingumu. Tai labai svarbus etapas siekiant įvertinti ar bakterijų kultūra buvo saugoma tinkamai. Nedidelis kiekis bakterijų kultūros perkeliamas ant agarų terpės *Petri* lėkštelėje. Lėkštelė inkubuojama 3 dienas 25°C temperatūroje [24]. Kaip ankstesniame skyriuje minėta, gyvybingoms bakterijų kolonijoms būdinga – ryškiai geltona spalva, apvali forma, 4–5 mm skersmuo.

Įsitikinus, jog bakterijų kultūra yra tinkama gamybai nedidelis kiekis bakterijų kultūros perkeliama į augimo terpę (YM-T). Gaunama pradinė terpė, kuri bus naudojama bakterijų auginimui bei ksantano gamybai didelio tūrio bioreaktoriuje [9]. Kadangi paruošiamas tik nedidelis kiekis augimo terpės, galima nustatyti susidariusių bakterijų koncentraciją. Pagal bakterijų koncentraciją pirminėje –

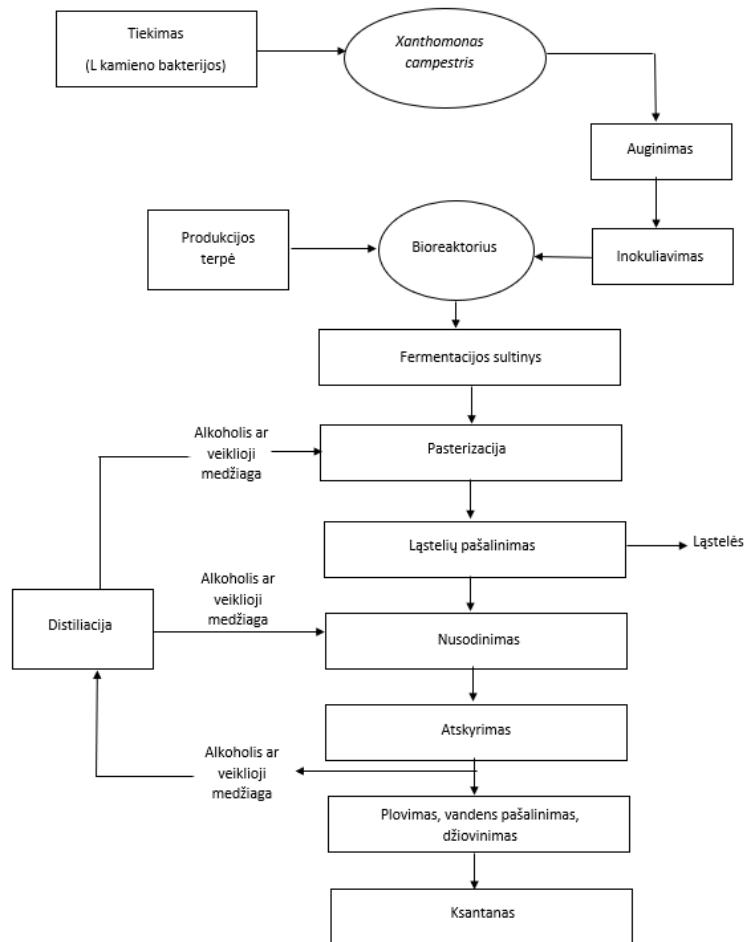
bakterijų augimo (YM-T) terpėje galima vėliau modeliuoti kultivavimo sąlygas ksantanui gaminti bioreaktoriuje.

Xanthomonas campestris bakterijoms augti bei ksantanui susidaryti tolimesniuose etapuose įtakos gali turėti: bioreaktoriaus tipas, fermentacijos tipas (pertraukiama, nepertraukiama), terpės sudėtis, kultivavimo sąlygos (temperatūra, deguonies kiekis terpėje, maisto medžiagų kiekis, pH). Todėl pirmiausia svarbu nustatyti ir parinkti tinkamas fermentacijos sąlygas. Fermentacijos procesas vykdomas steriliame, mechaniškai maišomame bioreaktoriuje [49]. Dėl klajingos ksantano sudėties, nėra patartina ksantano gamybai naudoti pertraukiamos fermentacijos sistemos, nes ji trukdo įsisavinti deguonį [3]. Tad pramoninei ksantano gamybai patartina rinktis pusiau nepertraukiamą fermentaciją bei gerą maišymą. *Xanthomonas campestris* aerobinės bakterijos. Ksantano komponentų sintezei bei redukuotų piridino nukleotidų oksidacijai labai svarbus tinkamas deguonies tiekimas. Taip pat svarbu palaikyti neutralią terpės pH. Neutralioje terpėje nėra slopinamas *Xanthomonas campestris* bakterijų augimas. Pramoninės ksantano gamybos metu palaikoma 28–32°C temperatūra bei pH 6,5–7,5. Optimali temperatūra bei pH gali skirtis, skirtingoms *Xanthomonas* rūšims. Oro padavimo greitis turėtų būti nemažesnis nei 0,3 (L/s), maišymo intensyvumas 1 (kW/m³) [43].

Parinkus tinkamas fermentacijos sąlygas pirminė bakterijų kultūra su YM-T terpe perkeliama į bioreaktorių su produkcijos terpe. Dėl spartaus mikroorganizmų augimo pirmoje fermentacijos dalyje, gali būti stebimas didelis deguonies koncentracijos sumažėjimas [43]. Todėl turi būti užtikrinamas nepertraukiamas deguonies tiekimas. Taikant pertraukiamo tipo fermentaciją, ksantano gamybos produktyvumas 0,4–0,7 g/L/h, susidaranti ksantano koncentracija 3–5 % [43]. Tuo tarpu dėl maisto medžiagų stygiaus, reikalingas terpės atgaivinimas – ląstelių pašalinimas. Ląstelės pašalinamos centrifuguojant, filtruojant ir flokuluojant [9]. Ksantano koncentracija bei gamybos proceso produktyvumas priklauso nuo deguonies prieinamumo fermentacijos terpėje. Didžiausia ksantano gamybos problema yra didėjanti fermentacijos terpės klampa, kuri sumažina maisto medžiagų ir deguonies prieinamumą [43].

Ksantano išskyrimo etape naudojami terminio, cheminio, fermentinio apdorojimo metodai. Pramonėje ksantanui išskirti dažnai naudojami organiniai tirpikliai tokie kaip: izopropanolis, etanolis, metanolis, acetonas. Naudojant organinius tirpiklius padidinamas ksantano nusodinimas tačiau sumažinamas ksantano tirpumas [42]. Taip pat įprasta naudoti tam tikras druskas ar poveikį pH [50]. Taikant skirtingus metodus kinta ksantano išeiga bei savybės.

Ksantano gryninimo etape ksantanas, atskirtas nuo ląstelių kultūros, toliau koncentruojamas ir kristalizuojamas kaip gryna (10% drėgnumo) medžiaga. Taikant kitas ksantano išskyrimo metodikas yra reikalingas vandens pašalinimas, džiovinimas. Ksantano gamybos schema pateikta 1.3. pav.



1.3 pav. Pramoninės ksantano gamybos schema [9]

Pramoniniu būdu gautas ksantanas beskonis, kreminės spalvos sausų miltelių pavidalo. Ksantano miltelių sudėtį sudaro: 8 – 15 % drėgmė, 7 – 12 % pelenai, 0,3 – 1 % azotas, 1,9 – 6,0 % acetatas, 1,0 – 5,7 % piruvatas, 3,6 – 14,3 g/L monovalentinės druskos, 0,085 – 0,17 g/L divalentės druskos, 1 g/L ksantanas [42]. Nepaisant sudėtingos ksantano struktūros, specifinių kontroliuojamų procesų metu yra įmanoma ksantaną modifikuoti. Ksantano modifikacijos gali būti atliekamos fermentacijos, perdirbimo, gryninimo etapuose. Struktūros ir funkcijų modifikacijos gali būti atliekamos pasitelkiant mechaninį, fermentinį, cheminį poveikį. Pagrindiniai ksantano molekulių pokyčiai susiję su acetilo ir piruvato grupių skaičiumi ksantano molekulėje. Ksantano degradacijos produktai (oligosacharidai) taip pat plačiai pritaikomi pramonėje ir laikomi pridėtinę vertę turinčiais produktais [36]. Šie junginiai tapo plačiai pritaikomi dėl mažos molekulinės masės bei dalelių dydžio. Biopolimerų struktūros analizei pasitelkiama Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija (IR) bei protonų branduolio magnetinis rezonansas (BMR) [51].

1.7. Veiksniai, turintys įtakos ksantano išskyrimui

Ksantano išeigai ir savybėms įtakos turi: bioreaktoriaus tipas ir veikimo principas (periodinis arba nenutrūkstamas), terpės sudėtis, kultūros augimo sąlygos (temperatūra, pH, ištirpusio deguonies koncentracija, maišymas), ksantano išgryninimas, džiovinimas [52]. Be visų įvardintų veiksnių ksantano savybėms įtakos gali turėti *Xanthomonas* bakterijų rūšis. Ji nulemia gebėjimą įsisavinti substratą, ksantano išeigą ir cheminę sudėtį [19]. Dauguma *Xanthomonas campestris* rūšių gali daugintis chemiškai apibrėžtoje terpėje į kurios sudėtį įeina mineralinės medžiagos, amonis, azotas, anglies šaltinis, aminorūgštys. Visi šie veiksniai gali turėti įtakos ksantano kokybei ir pritaikomumui.

Ksantano biosintezės metu vyksta du etapai, kurių metu pasireiškia antrinių metabolitų fermentacijos kinetika. Pirmo etapo metu bakterijų ląstelės greitai dauginasi bet beveik negamina ksantano (pirminio metabolizmo fazė). Antro etapo metu ląstelių dauginimasis drąstiškai sumažėja, pagaminami dideli kiekiai ksantano (antrinio metabolizmo fazė) [53]. Kuriant optimalias ksantano gamybos sąlygas, būtina atsižvelgti į šias metabolizmo fazes. Optimizuojant bakterijų ląstelių dauginimosi greitį, ksantano gamybą, dviejų fazių proceso vykdymo metu būtina parinkti specifines proceso sąlygas

1.7.1. Fermentacijos proceso trukmės įtaka

Fermentacijos proceso trukmė tiesiogiai susijusi su bakterijų ląstelių dauginimosi kinetika bei biokonversijai prieinamo substrato kiekiu mitybinėje terpėje [42]. Procesas baigiamas, kai bakterijų ląstelės pasiekia mirties fazę arba nebepakanka substrato ekopolisacharido gamybai. Eksperimentiniai duomenys parodė, jog fermentacijos laikas turi įtakos ksantano molekulinei masei, dėl piruvato ir acetilo grupių ksantano struktūroje.

1.7.2. pH įtaka

Vienas iš svarbių parametrų turintis įtakos bakterijų augimui bei ekopolisacharidų taip pat ir ksantano susidarymui yra pH. Tinkamiausia *Xanthomonas campestris* augimo terpė, kurios pH yra neutralus. Mokslinių tyrimų metu nustatyta, kad ksantano gamybai tinkamas pH 6–8, bet pH vertei nukritus iki 5 ksantano gamyba labai sumažėja [54]. Gaminant ksantaną terpės pH gali kisti. Tai nulemia rūgštinių ksantano grupių padidėjimas terpėje. Todėl labai svarbu pasirinkti biorekatorių su pH reguliavimo sistema. Ksantano išėiga gali būti padidinta gamybos metu sukėlus smarkų pH pokytį – stresą. Ekopolisacharidas bus gaminamas, kaip atsakas į sukeltą stresą, siekiant apsaugoti bakterijų ląsteles [42].

1.7.3. *Xanthomonas* rūšies įtaka

Iš visų *Xanthomonas* rūšių *Xanthomonas campestris* yra labiausiai ištirta ir pritaikyta bakterijų rūšis ksantano gamybai. Pramonėje ksantanas gaminamas *Xanthomonas campestris* rūšies bakterijų, NRRL B-1459 kamieno [43]. Vis dar tiriamas ir kitų *Xanthomonas* rūšių panaudojimas ksantano gamybai. Skirtingos *Xanthomonas* bakterijų rūšys išskiria skirtingą kiekį, kitokiomis savybėmis ir struktūra pasižymintį ksantaną.

1.7.4. Bakterijų augimo terpė

Ksantano biosintezės vykdymui būtina, kad mitybinės terpės sudėtyje būtų anglies, azoto šaltiniai ir mikroelementai (fosfatas, kalis, magnis, geležis, kalcis). Bakterijų kultivavimo terpės gamyba sudaro 20–30 % visų ksantano gamybos išlaidų. Optimizuojant terpės sudėtį bei į terpę įeinančių medžiagų koncentraciją, galima smarkiai sumažinti ksantano gamybos išlaidas bei kokybę [13]. Anglies šaltinio tipas dėl specifinių fermentų sintezės, katabolinių reakcijų aktyvacijos gali turėti įtakos ksantano išėigai bei savybėms. Didelis ksantano kiekis išskiriamas anglies šaltiniu naudojant gliukozę, sacharozę, maltozę, tirpų krakmolą [42]. Dažniausiai naudojami anglies šaltiniai gliukozė ir sacharozė. Naujausių tyrimų metu bandomas ir kitų anglies šaltinių: cukrinių runkelių melasos, obuolių sulčių gamybos atliekų, cukranendrių melasos, sūrio išrūgų ir datulių palmių sulčių panaudojimas [13]. Labai svarbu tinkama anglies šaltinio koncentracija, nes tai turi įtakos ksantano išėigai. Paprastai ši koncentracija būna 2–4 % arba 30–40 g/kg [55]. Didesnė anglies šaltinio koncentracija turi slopinantį poveikį ląstelių augimui. Trukdoma įsisavinti didelį kiekį substrato bei stabdomos katabolinės reakcijos.

Dar viena labai svarbi maistinė medžiaga bakterijų ląstelių augimui, ksantano gamybai bei cheminei struktūrai yra azotas. Azotas mitybinėje terpėje gali būti naudojamas organinių ar neorganinių junginių (amonio druskos, natrio nitrato, karbamido, mielių ekstrakto, peptono, kazeino hidrolazės, glutamato, aminorūgščių) pavidalu [47]. Didelė azoto šaltinio koncentracija skatina spartų bakterijų ląstelių dauginimąsi. Pramoninėje ksantano gamyboje azoto koncentracija siekia 0,05–0,1 % [55]. Nėra vienodai nuspręsta dėl azoto šaltinio kilmės. Manoma, kad *Xanthomonas campestris* augimui labiausiai tinka neorganinės kilmės azotas – $(\text{NH})_2\text{HPO}_4$, kiti mano, jog tinkamesnis organinės kilmės pavyzdžiui glutamatas. Anglies ir azoto šaltinių santykis mitybinėje terpėje svarbesnis nei atskiros šių medžiagų koncentracijos. Šis santykis turi įtakos mikroorganizmų dauginimuisi bei ksantano gamybai. Mokslinių tyrimų metu nustatyta, jog anglies ir azoto santykis fermentacijos (ksantano gamybos) terpėje turėtų būti mažesnis nei bakterijų augimo (dauginimosi) terpėje [6].

Fosfatas taip pat labai svarbus mitybinės terpės komponentas. Fosfatas mitybinėje terpėje atlieka buferio vaidmenį, reguliuoja bakterijų dauginimąsi bei ksantano išėigą [56]. Maža fosfato koncentracija mitybinėje terpėje gali turėti poveikį ksantano sudėčiai, sukeldama piruvato radikalų sumažėjimą. Didelė fosfato koncentracija gali stabdyti ksantano susidarymą. *Xanthomonas campestris* bakterijų dauginimuisi bei ksantano gamybai taip pat svarbūs junginiai turintys magnio. Magnis veikia kaip kofermentas, turi įtakos substrato įsisavinimui bei įeina į bakterijų ląstelių plazminės membranos sudėtį [56].

1.7.5. Temperatūros įtaka

Ksantano gamyboje temperatūra turi tiesioginį poveikį ksantano išėigai. Daugumos ekopolisacharidų taip pat ir ksantano gamybos optimali temperatūra yra 28–30 °C [42]. Žemesnėje nei 24 °C temperatūros mitybinėje terpėje bakterijų dauginimasis beveik visiškai sustoja. Tuo tarpu mitybinei terpei pasiekus 35 °C *Xanthomonas campestris* bakterijų augimas visiškai sustoja. Auginant bakterijas mitybinėje terpėje, kurios temperatūra 25 °C kinta ksantano struktūra, didėja acetilo grupių kiekis, didėja molekulinė masė ir klampumas [54]. Kadangi 25 °C žemesnė nei optimali ksantano gamybos temperatūra, siekiant optimizuoti fermentacijos proceso sąlygas, būtų naudinga naudoti dviejų etapų inkubaciją.

1.7.6. Maišymo ir oro padavimo greičių įtaka

Bakterijų ekopolisacharidai gaminami esant tinkamoms aerobinėms sąlygoms. Ksantano gamybai bei išėigai gerinti reikia didelio kiekio deguonies. Ksantano gamybos greitis tiesiogiai proporcingas deguonies tiekimo į terpę greičiui [58]. Didėjant ksantano kiekiui terpėje, didėja terpės klampumas. Terpės klampos padidėjimas sumažina aeracijos greitį, terpės homogeniškumą bei maisto medžiagų pasiskirstymą terpėje. Šiai problemai spręsti gali būti naudojamas pastovus mechaninis maišymas. Labai svarbu parinkti tinkamą mechaninio maišymo greitį. Deguonies trūkumas stebimas esant žemam maišymo greičiui (100–300 rpm), bet esant per dideliu maišymo greičiui (> 500 rpm) galima pakenkti ksantano savybėms [54].

1.7.7. Gamybos metodo įtaka

Ksantanas gali būti gaminamas tiek pertraukiamos, tiek nepertraukiamos fermentacijos metodais. Pertraukiama (angl. Batch) fermentacija greita, didelis anglies šaktinio pavertimo ksantanu efektyvumas 70–80 % [49]. Tačiau šio metodo trūkumas yra didėjanti terpės klampa. Dėl kurios sumažėja deguonies ir maisto medžiagų kiekio prieinamumas. Taip pat pertraukiamos fermentacijos metu gali kisti terpės savybės, susidarant nepalankioms bakterijų augimo ar ksantano gamybos

sąlygoms: maisto medžiagų trūkumas, ekstremalių pH verčių susidarymas, toksinių produktų susikaupimas [49]. Nepertraukiamos fermentacijos metu į reaktorių pastoviai tiekiami mitybinė terpė. Tai padeda išvengti maisto medžiagų išsieikvojimo. Nepertraukiamos fermentacijos metu anglies šakninio pavertimo ksantanu efektyvumas siekia 60–70 % [19]. Naudojant šią fermentacijos būdą kyla didesnė rizika terpės užsiteršimui, bakterijų mutacijoms.

1.8. Ksantano išskyrimas

Ekopolisacharido išskyrimo procesas labai svarbus, lemiantis gamybos išlaidas bei produkto savybes. Gryninimo procesas neturėtų pakenkti ekopolisacharido savybėms. Šio proceso metu atliekami šie veiksmai: bakterijų ląstelių inaktyvavimas ir pašalinimas, biopolimero nusodinimas, plovimas, džiovinimas, smulkinimas ir pakavimas [9]. Gryninimo etapo tikslai yra sukcentruoti sufermentuotą biopolimerą, palengvinti transportavimą bei saugojimą, sumažinti ar pašalinti užsiteršimo riziką (nepageidaujamas druskas, fermentus, bakterijų ląsteles, kietąsias daleles), pagerinti biopolimero savybes: spalvą, kvapą, stabilumą [49].

Bakterijų ląstelių lizavimui, inaktyvavimui ir pašalinimui iš fermentacijos terpės taikomi keli metodai: cheminis, terminis ir mechaninis. Cheminiam apdorojimui dažniausiai naudojami hipochloritas arba šarminiai junginiai, kurie sukelia piruvato grupių atskyrimą nuo ksantano cheminės struktūros [9]. Terminis apdorojimas (pasterizacija, sterilizacija) dažnai taikomas bakterijų ląstelių, fermentų inaktyvavimo būdas. Taikant šį apdorojimo būdą pagerinamas ksantano tirpumas, sumažinama fermentacijos terpės klampa, palengvinamas ląstelių pašalinimas. Tačiau norint taikyti šį ląstelių inaktyvavimo metodą labai svarbu parinkti tinkamas apdorojimo sąlygas, kad nebūtų sukelta ekopolisacharido degradacija [9]. Mechaninis apdorojimas taikomas gryno ksantano gamybai (be bakterijų ląstelių likučių). Mechaninio apdorojimo būdai: filtravimas, centrifugavimas. Taip pat gali būti taikomas fermentinis bakterijų lizavimas. Tačiau panaudoti fermentai turi būti pašalinti iš terpės, taip padidindamos gamybos išlaidos [47].

Inaktyvavus ir pašalinus bakterijų ląsteles ksantanas turi būti išgaunamas iš fermentacijos terpės. Vienas dažniausiai taikomų metodų yra biopolimero nusodinimas naudojant organinius tirpiklius: etanolį, acetoną, izopropanolį [9]. Šie tirpikliai taip pat prisideda prie terpėje esančių priemaišų (ląstelių likučių, druskų) pašalinimo [47]. Naudojamo tirpiklio kiekis biopolimero nusodinimui priklauso nuo tirpiklio cheminės sudėties. Mokslinių tyrimų metu nustatyta, jog pilnas ksantano nusodinimas įmanomas naudojant dvigubai ar net trigubai didesnę kiekį organinio tirpiklio (acetono, izopropanolio, etanolio), lyginant su fermentacijos terpės kiekiu [59]. Naudojant alkoholio ir druskos kombinaciją ksantanui nusodinti galima padidinti nusodinamo ksantano kiekį bei sumažinti reagentų kiekius. Toks poveikis pagrįstas krūvių pasikeitimu tarp druskos katijonų ir biopolimero anijoninių grupių [47]. Ksantanui išgryninti gali būti naudojama ultrafiltracija (UF). Šio metodo esmė fermentacijos terpės perleidimas pro žinomo porėtumo membranas. Naudojant šį metodą nepakenkiama ksantano savybėms, molekulinei masei. Ultrafiltracija laikoma energiją tausojančiu, ekologiškai saugiu, nedidelių išlaidų reikalaujančiu metodu.

Nusodintas biopolimeras turi būti atskirtas nuo fermentacijos terpės, perplautas ir išdžiovintas. Tokiu būdu gaunamas tinkamo grynumo biopolimeras, kuris gali būti naudojamas pramonėje. Renkantis gryninimo metodą svarbu atsižvelgti ir į biopolimero panaudojimo sritį. Pavyzdžiui ksantanas, kuris naudojamas maisto produktų gamyboje, turi savo sudėtyje neturėti bakterijų ląstelių ar organinių tirpiklių likučių [9]. Nusodintas ksantanas gali būti perplaunamas KCl tirpalu. Plovimas kartojamas kol pasiekiamas norimos kokybės biopolimeras. Ksantano džiovinimui naudojamos pertraukiamo ir

nepertraukiamo tipo džiovyklės. Džiovinimas vykdomas žemos temperatūros vakuume [42]. Tinkamų džiovinimo sąlygų parinkimas svarbus, siekiant išvengti biopolimero degradacijos, spalvos, tankio, tirpumo, dispersiškumo, pokyčių. Išdžiovintas biopolimeras smulkinamas iki norimos frakcijos dydžio. Frakcijos dydis turi įtakos ksantano dispersiškumui bei tirpumui [60]. Galutinis produktas turi būti supakuotas į vandeniui nepralaidžią pakuotę.

1.9. Ksantano panaudojimas

Ksantanas šiuo metu yra vienas iš plačiausiai pripažintų ir panaudojamų pramoninių bakterijų ekopolisacharidų. Jis gaminamas pramoniniu mastu ir panaudojamas maisto, naftos, tekstilės, žemės ūkio ir farmacijos produktų gamyboje. Dėl ksantano fizikocheminių savybių jis gali būti panaudojamas cheminių junginių inkapsuliavimui, plėvelių gamybai, gali būti naudojamas tirštikliu, klampą didinančiu agentu, stabilizatoriumi, emulsikliu [61]. Ksantanas turi savybę sąveikauti su kitais biopolimerais ir tarpląstelinės medžiagos komponentais. Tai dar viena savybė praplečianti ksantano panaudojimą. Šios sąveikos turi įtakos tirpalų savybėms: klamos padidėjimui, standžių gelių susidarymui, elektrocheminėms savybėms [62]. Ksantanas yra biologiškai skaidus, netoksiškas, biologiškai suderinamas ir ekologiškai saugus biopolimeras [63].

Pagrindinės savybės nulemiančios platų ksantano panaudojimą pramonėje yra: didelė klampa, net esant mažoms ksantano koncentracijoms, pseudoplastinės savybės, atsparumas fermentiniam, druskų poveikiui, stabilumas plačiame pH ir temperatūros diapazone, sinergizmas su kitais biopolimerais [63]. Pagrindinė ksantano panaudojimo pramonės sritis yra maisto pramonė. Ksantanas panaudojamas padažų, kepinų, pieno, desertų, gėrimų, šaldytų produktų gamyboje. Įprasta ksantano koncentracija maisto produktų gamyboje yra 0,05–0,7 % [64]. Norint paryškinti produkto savybes dažnai ksantanas naudojamas kartu su guaro ar saldžiavaisio pupmedžio derva (galaktomananais). Šiuos biopolimerus naudojant kartu, jie veikia sinergetiškai, padidindami produkto klampą bei kitas savybes. Naudojant ksantaną maisto pramonėje jis yra veikiamas įvairių veiksnių: pH, joninės jėgos, kitų terpės komponentų. Druska gali sumažinti ksantano klampą. Terpė kurią sudaro 20 – 30 % druskos tirpalas, neturės neigiamo poveikio ksantano savybėms. Tuo tarpu, kai terpės $\text{Ph} < 4$, ksantano klampa mažėja. Ksantano karboksi grupės virsta iš jonizuotos į nejonizuotą formą ($\text{COOH}^- + \text{H}^+ = \text{COOH}$), sumažėja elektrostatinė sąveika tarp ksantano šoninių grandinių [37]. Rūgšti terpė neturi įtakos ksantano savybėms. Todėl ksantanas yra tinkamas rūgščių produktų gamyboje. Siekiant pagerinti pieno produktų savybes, ksantanas naudojamas kartu su hidrokoloidais (karageninu, karboksimetilceliulioze ir galaktomananais). Šios sąveikos dėka padidėja pieno produktų klampa, ilgalaikis stabilumas, pagerinamas šilumos perdavimas perdirbimo metu, pagerinamos skoninės savybės, stabdoma sinerezė, stabilizuojama emulsija [65]. Kepinių gamyboje ksantanas naudojamas pagerinti vandens surišimą, tekstūrą, terpės kiekį. Tam tikrų produktų gamyboje (nekaloringų kepinų, kepinų be gluteno) ksantanas gali pakeisti kitus ingredientus, nepakeisdamas produkto skonio [66]. Gaiviųjų gėrimų gamyboje ksantanas naudojamas kaip tirštiklis. Dar viena svarbi ksantano savybė yra gebėjimas nuslopinti sutraukiantį fenolinių junginių, esančių maisto produktuose, poveikį. Dėl šios savybės turime didelį antioksidantų kiekį turinčius produktus, be susijusių skonio problemų [67].

Be plataus panaudojimo maisto pramonėje, ksantanas taip pat naudojamas asmeninės higienos priemonių gamyboje (dantų pastos, šampūno, kremų, losijonų). Šiuose produktuose ksantanas naudojamas tinkamai konsistencijai gauti, netirpiems ingredientams suspenduoti, skatinti stabilų, sodrų putojimą [49]. Žemės ūkyje ksantanas panaudojamas fungicidinių, herbicidinių, insekticidinių

produktų gamyboje. Ksantanas pagerina šių produktų suspensijos aktyvumą, pasklidimą, lipnumą ant augalo paviršiaus. Naftos pramonėje ksantanas naudojamas frakcionavimo, valymo, perdirbimo, gamybos metu [47]. Ksantanas plačiai taikomas vaistų, kitų sveikatos priemonių gamyboje. Jis naudojamas tirštikliu, emulsikliu, stabilizatoriumi produktų skirtų išoriniam ir vidiniam naudojimui. Taip pat naudojamas aktyviųjų junginių kontroliavimui, surišimui tabletėse [68]. Šios panaudojimo galimybės yra įmanomos dėl to, kad ksantanas yra biologiškai skaidus, biologiškai suderinamas su žmogaus organizmu ir formuojantis tinklus (vienas ar kartu su kitais biopolimerais) aktyviųjų junginių pernašai [69]. Neseniai atliktų tyrimų metu, nustatyta, kad ksantanas turi didelį potencialą audinių inžinerijos reikmėms. Audinių inžinerijos procesų metu gali būti atliekama pažeistų audinių regeneracija arba organų rekonstrukcija. Natūralūs polimerai (tokie kaip ksantanas) yra lengvai prienami, apdorojami, puikiai suderinami su organizmu, imituojantys biologines audinių savybes [60]. 1.1. lentelėje pateikiamos pagrindinės ksantano panaudojimo sritys ir funkcijos skirtingose pramonės šakose.

1.1 lentelė. Ksantano panaudojimo sritys

Panaudojimo sritis	Funkcija
Vaistų pramonėje	
Suspensijų, emulsijų gamyboje	Suspensijai ar emulsijai suteikia stabilumo, pagerina konsistenciją
Tablečių gamyboje	Sulėtina aktyviųjų medžiagų atpalaidavimą
Audinių inžinerijoje	Dėl biologinio suderinamumo, netoksiškumo, bioskaidumo tinka naudoti audinių inžinerijoje
Asmeninės higienos pramonėje	
Dantų pastos gamyboje	Suteikia suspensijai reikiamą klampą, palengvina pastos išspaudimą, sulaiko netirpius junginius
Losjonų, kremų, želė gamyboje	Suteikia emulsijai reikiamą klampą, stabilizuoja
Šampūnų gamyboje	Suteikia suspensijai reikiamą klampą, sulaiko netirpius junginius
Maisto produktų pramonėje	
Padažų gamyboje	Suteikia padažui reikiamą klampą, leidžia lengvai išspausti, reguliuoja lipnumą
Mėsos produktų gamyboje	Padedą sulaikyti vandenį, stabdo sinerezę
Kepinių gamyboje	Padedą sulaikyti vandenį, pagerina produktų tekstūrą, skonines savybes
Pieno produktų gamyboje	Stabilizuoja emulsijas, stabdo sinerezę
Gėrimų gamyboje	Reguliuoja tirštumą, skonines savybes, suspenduoja netirpius junginius, reguliuoja putojimą
Miltelių pavidalo kvapiųjų medžiagų gamyboje	Įkapsuliuoja veikliuosius junginius
Sūrių, šaldytų produktų gamyboje	Stabdo sinerezę
Maisto papildų gamyboje	Reguliuoja produktų klampumą, suspenduoja netirpius junginius, reguliuoja aktyviųjų medžiagų įsisavinimą
Kitose pramonės srityse	
Žemės ūkio chemikalų gamyboje	Suspenduoja aktyvius junginius, reguliuoja produktų tėkmę, lipnumą
Naftos produktų gamyboje	Reguliuoja produktų klampumą

Valiklių gamyboje	Suteikia pH stabilumą, prailgina kontaktinį laiką
Lakų, klijų gamyboje	Suspenduoja netirpius junginius, reguliuoja lipnumą, klampumą
Dažų gamyboje	Reguliuoja suspensijos klampumą, takumą ir lipnumą
Tekstilės ir kilimų dažymui	Reguliuoja dažų pasiskirstymą audinio paviršiuje
Popieriaus gamyboje	Reguliuoja lipnumą, klampumą
Gyvūnų maisto gamyboje	Veikia kaip rišančioji medžiaga
Apsauginių plėvelių gamyboje	Padedą suformuoti plėvelės struktūrą
Sinergetinis ksantano ir galaktomananų panaudojimas	
Ledų, sūrio, desertų, pieno kokteilių, pudingo gamyboje	Formuoja gelinę struktūrą, stabilizuoja
Ledų, sriubos, pieno kokteilių gamyboje	Kontroliuoja klampumą

1.10. Ekonominis ksantano gamybos vertinimas

Kasmet pagaminama apie 80 000 tonų ksantano, o kasmetinis ksantano poreikis paauga 5,7 %. Metinės ksantano pardavimų pajamos siekia net 400 milijonų JAV dolerių [3]. Tačiau vertinant ksantano gamybą ekonominiu atžvilgiu reikia atkreipti dėmesį į visus į šį procesą įeinančius etapus ir kintamuosius.

Ksantano gamybos kainą sudaro medžiagos naudojamos terpių gamybai, įranga ir jos eksploatavimas. Labiausiai ksantano gamybos kainą nulemia medžiagos naudojamos mitybinių terpių gamybai. Dažniausiai naudojami anglies šaltiniai yra gliukozė, sacharozė ir maltozė. Šie anglies šaltiniai yra sąlyginai brangūs. Šiuo metu atliekamų mokslinių tyrimų tikslas panaudoti atsinaujinančius išteklius siekiant gauti vertingus produktus. Naujausių tyrimų metu bandomas anglies šaltinių: cukrinių runkelių melasos, obuolių sulčių gamybos atliekų, cukranendrių melasos, sūrio išrūgų ir datulių palmių sulčių panaudojimas [13]. Taip pat anglies šaltiniu bandoma panaudoti pramonės atliekas. Tačiau tai vis dar išlieka iššūkiu ateities tyrimams. Į terpės sudėtį taip pat įeina azoto šaltinis ir mikroelementai. Didelės šių elementų koncentracijos gali turėti neigiamos įtakos ksantano susidarymui. Tad tiek gamybiniu, tiek ekonominiu požiūriu labai svarbu tinkamai parinkti augimo ir fermentacijos terpių sudėtį.

Didelę dalį ksantano gamybos išlaidų sudaro fermentacijos sąlygos ir trukmė bei ksantano gryninimo būdas. Fermentacijos proceso trukmė tiesiogiai susijusi su bakterijų ląstelių dauginimosi kinetika bei biokonversijai prieinamo substrato kiekiu mitybinėje terpėje [42]. Tad kuo ilgiau vykdomas fermentacijos procesas tuo didesnis substrato kiekis yra reikalingas, tuo didesnės proceso išlaidos. Parinkus optimaliausias fermentacijos sąlygas, tinkamą įrangą bei fermentacijos būdą (nepertraukiamą, pusiau pertraukiamą, pertraukiamą fermentaciją) galima sumažinti ksantano išlaidas. Dar vienas labai svarbus ir brangus ksantano gamybos etapas yra ksantano gryninimas. Į gryninimo etapą įeina daug procesų: bakterijų ląstelių inaktyvavimas, pašalinimas, biopolimero nusodinimas, plovimas, džiovinimas, frakcijos smulkinimas, pakavimas [9]. Siekiant optimizuoti šį procesą reikia bandyti parinkti optimalų gryninimo metodą, panaikinant bakterijų ląstelių likučius iš fermentacijos terpės bei sumažinant organinių tirpiklių panaudojimą [42]. Ksantano gryninimui gali būti naudojama ultrafiltracija (UF). Šio metodo esmė fermentacijos terpės perleidimas pro žinomo porėtumo membranas. Ultrafiltracija laikoma energiją tausojančiu, ekologiškai saugiu, nedidelių

išlaidų reikalaujančiu metodu. Tai viena iš ekonominiu požiūriu naudingesnių ksantano gryninimo alternatyvų.

Parinkus optimalias fermentacijos, gryninimo, terpės sudėties sąlygas galima gauti daug mažesnes ksantano gamybos išlaidas. Ateities tyrimų metu turėtų būti vis labiau analizuojamas atsinaujinančių šaltinių, pramonės atliekų panaudojimas vertingų produktų susidarymui. Dar viena alternatyva galinti turėti įtakos ksantano išlaidoms *Xanthomonas* bakterijų rūšies modifikavimas, nes bakterijų rūšies savybės taip pat labai svarbios ksantano susidarymui, savybėms bei gamybos išlaidoms [42].

1.11. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas

Biopolimerą ksantaną gamina *Pseudomonaceae* bakterijų šeimos genčiai priskiriamos *Xanthomonas campestris* bakterijos. Šios bakterijos negamina kitų biopolimerų. Dėl to gali didelį kiekį substrato paversti ekopolisacharidu – ksantanu. Nepaisant labai didelio bakterijų išskiriamo ekopolisacharidų kiekio, tik nedidelė dalis yra panaudojama pramoninėje gamyboje. Ksantanas dėl savo išskirtinių fizikocheminių savybių – didelės klampos, atsparumo fermentų, druskų poveikiui, stabilumo plačiame pH ir temperatūros diapazone, biologinio suderinamumo, plačiai pritaikomas įvairiose pramonės srityse. Mokslinių tyrimų metu nustatyta, jog ksantanas pasižymi antioksidaciniu aktyvumu. Dėl šių išskirtinių savybių ksantano kasmetinis poreikis išauga 5,7 %. Ksantanas dažniausiai naudojamas tirštikliu, klampą didinančiu agentu, stabilizatoriumi, emulsikliu. Šis ekopolisacharidas pritaikomas įvairiose pramonės srityse: farmacijoje, žemės ūkyje, naftos produktų, maisto, cheminių medžiagų gamyboje.

Ksantano biosintezė yra kompleksiškas, sudėtingas ir daugiapakopis procesas. Ksantano išėigai ir savybėms įtakos turi: bioreaktoriaus tipas, veikimo principas, bakterijų augimo ir fermentacijos terpių sudėtis, kultūros augimo sąlygos (temperatūra, pH, ištirpusio deguonies koncentracija, maišymas), ksantano išgryninimas, džiovinimas. Parinkus optimalias ksantano gamybos sąlygas galima gauti didžiausią ksantano išėigą. Bakterijų augimo ir fermentacijos terpių gamyba sudaro net 20 – 30 % ksantano gamybos išlaidų. Tad ekonominiu ir ekologiniu požiūriu ksantano terpių gamybos optimizavimas viena svarbiausių užduočių. Naujausių mokslinių tyrimų metu ksantano gamybai pritaikomos pramonės atliekos bei atsinaujinančios medžiagos. Tai labai aktuali tyrimu sritis, siekiant ksantano gamybą padaryti ekologiškesne ir ekonomiškesne.

Baigiamojo darbo tikslas išanalizuoti ksantano susidarymo priklausomybę nuo *Xanthomonas campestris* bakterijų produkcijos – fermentacijos bei augimo terpių sudėties. Remiantis literatūros analize, bakterijų kultivavimui parintos optimalios sąlygos (terpių pH, temperatūra). Analizuota bakterijų biomasės ir ksantano išėigos koreliacija. Naudojant skirtingus anglies ir azoto šaltinius optimizuota ksantano gamyba. Biopolimero nusodinimui taikyti skirtingi organiniai tirpikliai. Remiantis tyrimų duomenimis sudaryta ksantano gamybos aparatūrinė schema pritaikoma pramoninėje ksantano gamyboje.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Tiriamąjį darbo tikslas - optimizuoti ksantano išėigai įtaką turinčių terpių sudėtį. *Xanthomonas campestris* bakterijos visų pirma, perkeltos į YM terpę, po to į YM-T bakterijų dauginimo terpę, vėliau į produkcijos - fermentacijos terpę, iš kurios išskiriamas ksantanas. Visų tyrimų metu ksantanas išskirtas organiniais tirpikliais: metanoliu, acetonu, izopropanoliu.

Baigiamojo darbo tyrimų metu buvo taikytos dvi metodikos, susijusios su terpių gamyba, jų sudėtimi [70], [3]. Pagrindinis šių metodikų skirtumas YM-T terpių sudėtis, bei YM-T suspensijos tūris, kuris yra perkeliamas į produkcijos terpę. Siekiant palaikyti kontrolines sąlygas ir stebėti, kokią įtaką ksantanui išskirti turi skirtinga YM-T terpių sudėtis YM ir produkcijos terpių sudėtis nebuvo keista.

Siekdami įvertinti YM-T terpės sudėties įtaką ksantano išskirimui buvo keisti anglies, azoto šaltiniai, pridėta pagalbinių medžiagų. Taip pat buvo keisti į YM-T terpę įeinančių medžiagų kiekybinė sudėtis.

2.1. Tyrimų metu naudota bakterijų kultūra

- *Xanthomonas campestris*

2.2. Tyrimų metu naudotos medžiagos

- Distiliuotas vanduo
- Bevandenė D-Gliukozė ($C_6H_{12}O_6$)
- Bakteriologinis peptonas
- Mielų ekstraktas
- Salyklo ekstraktas
- Diamonio fosfatas ($(NH_4)_2HPO_4$)
- Kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4)
- Natrio chloridas (NaCl)
- Magnio sulfatas heptahidratas ($MgSO_4 \times 7H_2O$)
- Sacharozė ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
- Bevandenė citrinų rūgštis ($C_6H_8O_7$)
- Amonio nitratas (NH_4NO_3)
- Magnio chlorido heksahidratas ($MgCl_2 \times 6 H_2O$)
- Bevandenis natrio sulfatas (Na_2SO_4)
- Boro rūgštis ($C_6H_7BO_2$)
- Cinko oksidas (ZnO)
- Geležies (III) chlorido heksahidratas ($FeCl_3 \times 6H_2O$)
- Kobalto (II) karbonatas ($CoCO_3$)
- Natrio Citratas
- Natrio Gliukonatas
- Maltozė ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
- Stevija ($C_{38}H_{60}O_{18}$)
- Cukranendrių cukrus ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
- Fruktozė ($C_6H_{12}O_6$)
- Kokosų cukrus

- Laktozės monohidratas ($C_{12}H_{22}O_{11} \times H_2O$)
- D-ksilozė ($C_5H_{10}O_5$)
- Metanolis (CH_3OH), 100%
- Acetonas (C_3H_6O), 100%
- Izopropanolis (C_3H_8O), 100%
- Bioetanolis (C_2H_5OH), 96%
- Natrio hidroksidas (0,1/1M NaOH)
- Sieros rūgštis (0,1/ 1M H_2SO_4)

2.3. Tyrimų metu naudota įranga, laboratoriniai indai ir priemonės

2.3.1. Laboratoriniai indai ir priemonės

- Erlenmejerio kolbos
- Matavimo cilindrai
- Svėrimo lėkštelės
- Laboratorinės mentelės
- Ependorf pipetmanai
- Vienkartiniai pipetmanų antgaliai
- Spiritinė lemputė
- Inokuliacinės kilpelės
- Centrifuginiai mėgintuvėliai
- Spektrofotometrinės kiuvetės
- Mėgintuvėlių stovai
- Maišymo magnetai
- Magnetinė lazdelė
- Foliija
- Parafilmas
- Asmeninės apsaugos priemonės (laboratorinis chalatas, vienkartinės pirštinės, apsauginiai laboratoriniai akiniai)

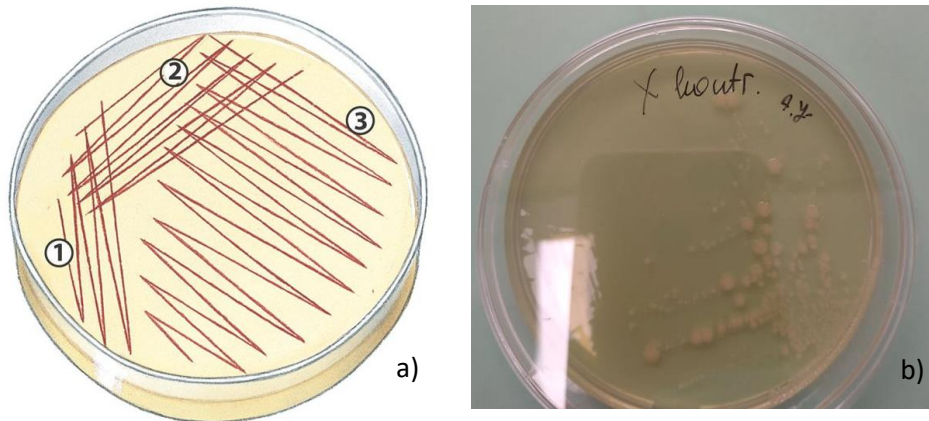
2.3.2. Įranga

- Vandens gryninimo sistema Elix (gamintojas Biotech, Lietuva)
- Analitinės svarstyklės ATX84 (gamintojas Shimadzu, Japonija)
- pH matuoklis (gamintojas Winlab, Vokietija)
- Mėgintuvėlių maišyklė Bio Vortex V1 (gamintojas Biosan, Latvija)
- Inkubatorius ES-20 (gamintojas Biosan, Latvija)
- Autoklavas A-4050 (gamintojas Certo Clav, Austrija)
- Laminaras BV-100 (gamintojas Telstar, Japonija)
- Traukos spinta
- Magnetinė maišyklė su kaitinimu MSH basic (gamintojas Yellow line)
- Džiovinimo krosnelė IN 55 (gamintojas Memmert, Vokietija)
- Centrifuga Universal 320R (Gamintojas Hettich, Vokietija)
- Spektrofotometras UV-1280 (gamintojas Shimadzu, Japonija)

- Vandens vonelė (gamintojas Memmert, Vokietija)

2.4. *Xanthomonas campestris* bakterijų persėjimas į *Petri* lėkšteles paviršiniu būdu

Xanthomonas campestris rūšies bakterijos persėtos į *Petri* lėkšteles su standžia mitybine agaru terpe. Sėjimas vykdytas laikantis sterilių darbo sąlygų: dirbta laminare, nudezinfekavus laminaro darbui skirtą paviršių, degant spiritinei lemputei. Suspensija su *Xanthomonas campestris* bakterijų kultūra, kurios koncentracija 1×10^8 (bakterijų/ml), paviršiniu būdu perkelta ant agaru mitybinės terpės. Dezinfekuota kilpele suspensija paskirstyta visame *Petri* lėkštelės paviršiuje laikantis sektorių metodo (2.1. pav.). Ant *Petri* lėkštelės užrašoma persėtų bakterijų rūšis, suspensijos praskiedimo laipsnis, data. Siekiant neužkrėsti persėtos bakterijų kultūros, *Petri* lėkštelė apvyniojama parafilmu. *Petri* lėkštelės inkubuotos tinkamos temperatūros 28 °C termostate 24 valandas.



2.1 pav. a) Bakterijų kultūros paskleidimo *Petri* lėkštelėje sektorių metodas b) Užaugusios *Xanthomonas campestris* kolonijos

Po inkubacijos vizualiai įvertintos *Petri* lėkštelėje užaugusios kolonijos. *Xanthomonas campestris* bakterijų kolonijos nedidelės, taisyklingos apvalios formos, gelsvos spalvos. Apžiūrėta, ar lėkštelė nebuvo užkrėsta mielėmis (mažos, ryškiai geltonos spalvos kolonijos), pelėsiais (didelės pūkuotos kolonijos), kitų bakterijų kultūromis (nebūdingos spalvos, dydžio kolonijos). Įvertinus bakterijų kultūros persėjimo kokybę, lėkštelė naudota tolimesniems tyrimams.

2.5. Terpių gamyba

2.5.1. YM terpės gamyba

1. Apskaičiuoti, 100 ml YM terpės gamybai, reikalingi medžiagų kiekiai.
2. Į dvi Erlenmejerio kolbas padalintas reikiamas distiliuoto vandens kiekis (50 ml į vieną kolbą, 50 ml į kitą kolbą).
3. Pasvertas YM terpės gamybai reikiamas gliukozės kiekis ir supiltas į vieną iš kolbų.
4. Pasvertos visos kitos YM terpės gamybai reikiamos medžiagos ir supiltos į kitą kolbą.
5. Naudojant 0,1/ 1M NaOH ir 0,1/ 1M H₂SO₄ tirpalus, nustatytas terpių pH 7.
6. Terpės autoklavuojamos 24 h, 80 °C temperatūroje.
7. Siekiant gauti paruoštą YM terpę, autoklavuoti tirpalai supilami į vieną kolbą.

YM terpės sudėtis (100 ml) pagal naudotą metodiką (P .Chellapandi, Laboratory manual in industrial biotechnology, 2007):

- Gliukozė – 1 g
- Bakteriologinis peptonas – 0,5 g
- Mielių ekstraktas – 0,3 g
- Salyklo ekstraktas – 0,3 g

2.5.2. YM-T terpės gamyba

1. Apskaičiuoti, 50 ml/ 75 ml YM-T terpės gamybai, reikalingi medžiagų kiekiai.
2. Į dvi Erlenmejerio kolbas padalintas reikiamas distiliuoto vandens kiekis (25 ml į vieną kolbą, 25 ml į kitą kolbą/ 25 ml į vieną kolbą, 50 ml į kitą kolbą).
3. Pasvertas YM-T terpės gamybai reikiamas gliukozės/ sacharozės kiekis ir supiltas į vieną iš kolbų.
4. Pasvertos visos kitos YM-T terpės gamybai reikiamos medžiagos ir supiltos į kitą kolbą.
5. Naudojant 0,1/ 1M NaOH ir 0,1/ 1M H₂SO₄ tirpalus, nustatytas terpių pH 7.
6. Terpės autoklavuojamos 24 h, 80 °C temperatūroje.
7. Siekiant gauti paruoštą YM-T terpę, autoklavuoti tirpalai supilami į vieną kolbą.

Augimo - YM-T terpės sudėtis (50 ml) pagal naudotą metodiką [70]:

- Gliukozė – 0,6 g
- Bakteriologinis peptonas – 0,125 g
- Mielių ekstraktas – 0,075 g
- (NH₄)₂HPO₄ – 0,075 g
- KH₂PO₄ – 0,125 g
- MgSO₄ – 0,0025 g
- Salyklo ekstraktas – 0,075 g

Augimo - YM-T terpės sudėtis (75 ml) pagal straipsnį [3]:

- Sacharozė – 1,875 g
- Mielių ekstraktas - 0,525 g
- (NH₄)₂HPO₄ – 0,1875 g
- K₂HPO₄ – 0,1125 g
- MgSO₄ – 0,0075 g

2.5.3. Produkcijos terpės gamyba

1. Apskaičiuoti, 200 ml produkcijos terpės gamybai, reikalingi medžiagų kiekiai.
2. Į dvi Erlenmejerio kolbas padalintas reikiamas distiliuoto vandens kiekis (150 ml į vieną kolbą, 50 ml į kitą kolbą).
3. Pasvertas produkcijos terpės gamybai reikiamas sacharozės kiekis ir supiltas į vieną iš kolbų.
4. Pasvertos visos kitos produkcijos terpės gamybai reikiamos medžiagos ir supiltos į kitą kolbą.
5. Naudojant 0,1/ 1M NaOH ir 0,1/ 1M H₂SO₄ tirpalus, nustatytas terpių pH 7.
6. Terpės autoklavuojamos 24 h, 80 °C temperatūroje.
7. Siekiant gauti paruoštą produkcijos terpę, autoklavuoti tirpalai supilami į vieną kolbą.

Fermentacijos – Produkcijos terpės sudėtis (200 ml) pagal naudotą metodiką [70]:

- Sacharozė - 8 g
- Citrinų rūgštis – 0,42 g
- NH_4NO_3 – 0,228 g
- KH_2PO_4 – 0,572 g
- MgCl_2 – 0,100 g
- Na_2SO_4 – 0,016 g
- H_3BO_3 – 0,0012 g
- ZnO – 0,0012 g
- FeCl_3 – 0,004 g
- CoCO_3 – 0,004 g

2.6. *Xanthomonas campestris* bakterijų kultūros perkėlimas į YM terpę

1. 7ml YM terpės nupilta į mėgintuvėlį kaip 0 mėginys.
2. YM terpė išpilstyta į 20 mėgintuvėlių po 7 ml.
3. Iš Petri lėkštelės su *Xanthomonas campestris* bakterijų kultūromis į kiekvieną mėgintuvėlį perkelta po 1 bakterijų koloniją
4. Kolonijos paimtos kilpele įmerkiant kilpelę į mėgintuvėlį su terpe ir paliekant 4 - 5 minutėms.
5. Mėgintuvėliai inkubuoti 28 °C temperatūroje, 24h.
6. Mėgintuvėliai sumaišyti purtykle.
7. Spektrofotometru išmatuota mėgintuvėlių šviesos sugertis (matuota 540 nm bangos ilgyje). Rezultatai pateikti 1 lentelėje.

2.1 lentelė. 1-20 mėgintuvėlių su YM terpe šviesos sugertis po 24 h inkubacijos

Mėgintuvėlio nr.	Absorbcija	Mėgintuvėlio nr.	Absorbcija
1.	1,182	11.	1,286
2.	1,112	12.	1,203
3.	1,326	13.	1,149
4.	1,211	14.	1,264
5.	1,291	15.	1,210
6.	1,207	16.	1,174
7.	1,155	17.	1,338
8.	1,284	18.	1,184
9.	1,151	19.	1,222
10.	1,144	20.	1,155

2.7. Bakterijų kultūros auginimas, perkėlimas į YM-T terpę

1. 7 ml YM-T terpės nupilta į mėgintuvėlį kaip 0 mėginys.
2. 7 ml YM terpės perkelta į YM-T terpę.
3. Spektrofotometru išmatuota YM-T terpės šviesos absorbcija, iškart po sumaišymo su YM terpe.
4. YM-T terpė inkubuota 24 h, 28 °C temperatūroje.

- Po inkubacijos išmatuota YM-T terpės šviesos absorbcija.
- Pagal 1 formulę apskaičiuota YM-T terpės biomasės koncentracija.

2.1. formulė Biomasės koncentracijos apskaičiavimas (g/l)

$$c_{\beta} = 0,2845 \times OD_{540}$$

2.8. YM-T terpės perkėlimas į produkcijos, fermentacijos terpę

Pagal metodiką [70]:

- Apskaičiuotas YM-T terpės kiekis (15%), kuris turi būti perkeltas į produkcijos terpę.
(50 ml × 0,15 = 7,5 ml)
- 7 ml produkcijos terpės nupilta į mėgintuvėlį kaip 0 mėginį.
- 7,5 ml YM-T terpės perkelta į produkcijos terpę.
- Pamatuota produkcijos terpės šviesos absorbcija iškart po sumaišymo su YM-T terpe.
- Produkcijos terpė inkubuota 72 h, 28 °C temperatūroje, šviesos sugertis matuota kas 24h.

Pagal straipsnį [3]:

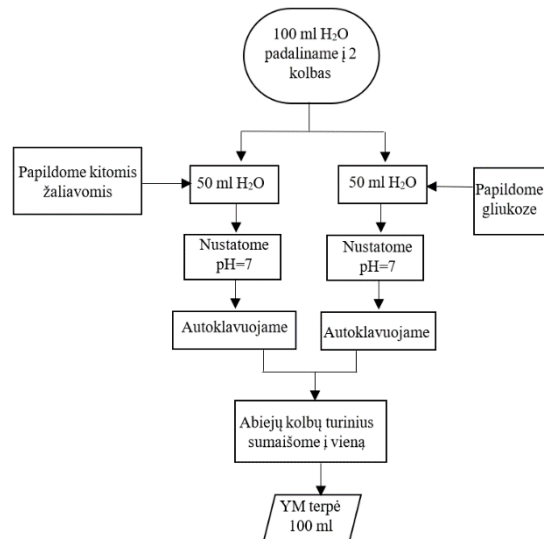
- Apskaičiuotas YM-T terpės kiekis , kuris turi būti perkeltas į produkcijos terpę.
$$\left(\begin{array}{l} 25 \text{ ml} - 300 \text{ ml} \\ x - 200 \text{ ml} \end{array} \right) x = 16,6 \text{ ml} \approx 17 \text{ ml}$$
- 7 ml produkcijos terpės nupilta į mėgintuvėlį kaip 0 mėginį.
- 17 ml YM-T terpės perkelta į produkcijos terpę.
- Pamatuota produkcijos terpės šviesos absorbcija iškart po sumaišymo su YM-T terpe.
- Produkcijos terpė inkubuota 72 h, 28 °C temperatūroje, šviesos sugertis matuota kas 24h.

2.9. Ksantano išskyrimas iš produkcijos terpės

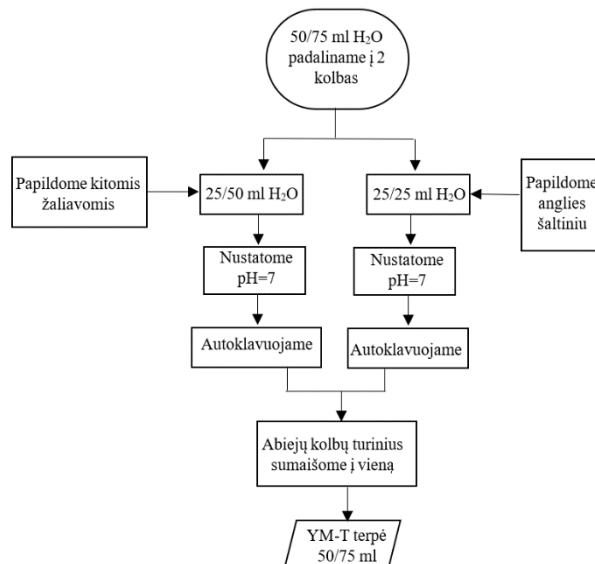
- Produkcijos terpė kaitinta 90 °C vandens vonelėje 15 minučių.
- Po to terpė atvėsinta ir supilta į 4 centrifugavimui skirtus mėgintuvėlius. Prieš tai, šie mėgintuvėliai, pasverti kartu su dangteliais.
- Terpės centrifuguotos 10 minučių, 9000 rpm.
- Po centrifugavimo nupiltas supernatantas ir magnetine maišykle maišytas 10 minučių. Mėgintuvėliai su nuosėdomis (bakterijų biomase) sudėti džiovinti į kaitinimo krosnelę, 60 °C temperatūroje 24 valandas.
- Į išmaišytą tirpalą įdėta 0,1g NaCl.
- Į 4 žinomos masės mėgintuvėlius įpilta po 10 ml paruoštos terpės.
- Į 1-4 mėgintuvėlius įpilta po 30 ml organinių tirpiklių (1 mėgintuvėlis – metanolis, 2 mėgintuvėlis – acetonas, 3 mėgintuvėlis – izopropanolis, 4 mėgintuvėlis – bioetanolis).
- Mėgintuvėliai inkubuoti 24h, 28 °C temperatūroje.
- Po inkubacijos mėgintuvėliai centrifuguoti 10 minučių, 9000 rpm.
- Supernatantai nupilti į panaudotų tirpiklių atliekų indus.
- Mėgintuvėliai su nuosėdomis (ksantanu) sudėti į kaitinimo krosnelę, 60 °C temperatūroje 24 valandas.
- Pasverti mėgintuvėliai su išdžiovintomis nuosėdomis.

2.10. Principinė terpių gamybos schema

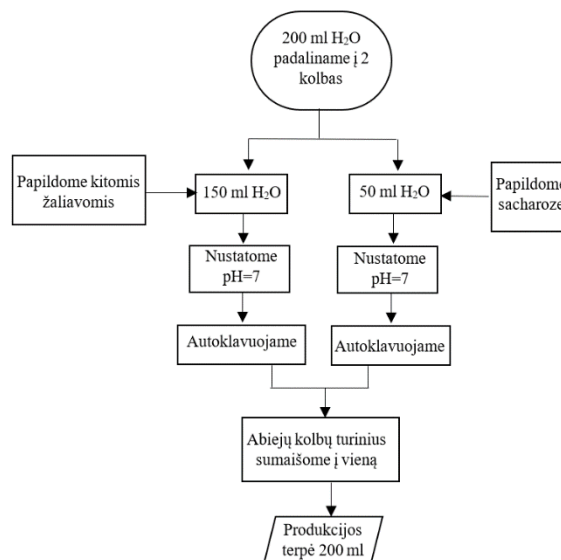
2.10.1. YM terpės gamybos schema



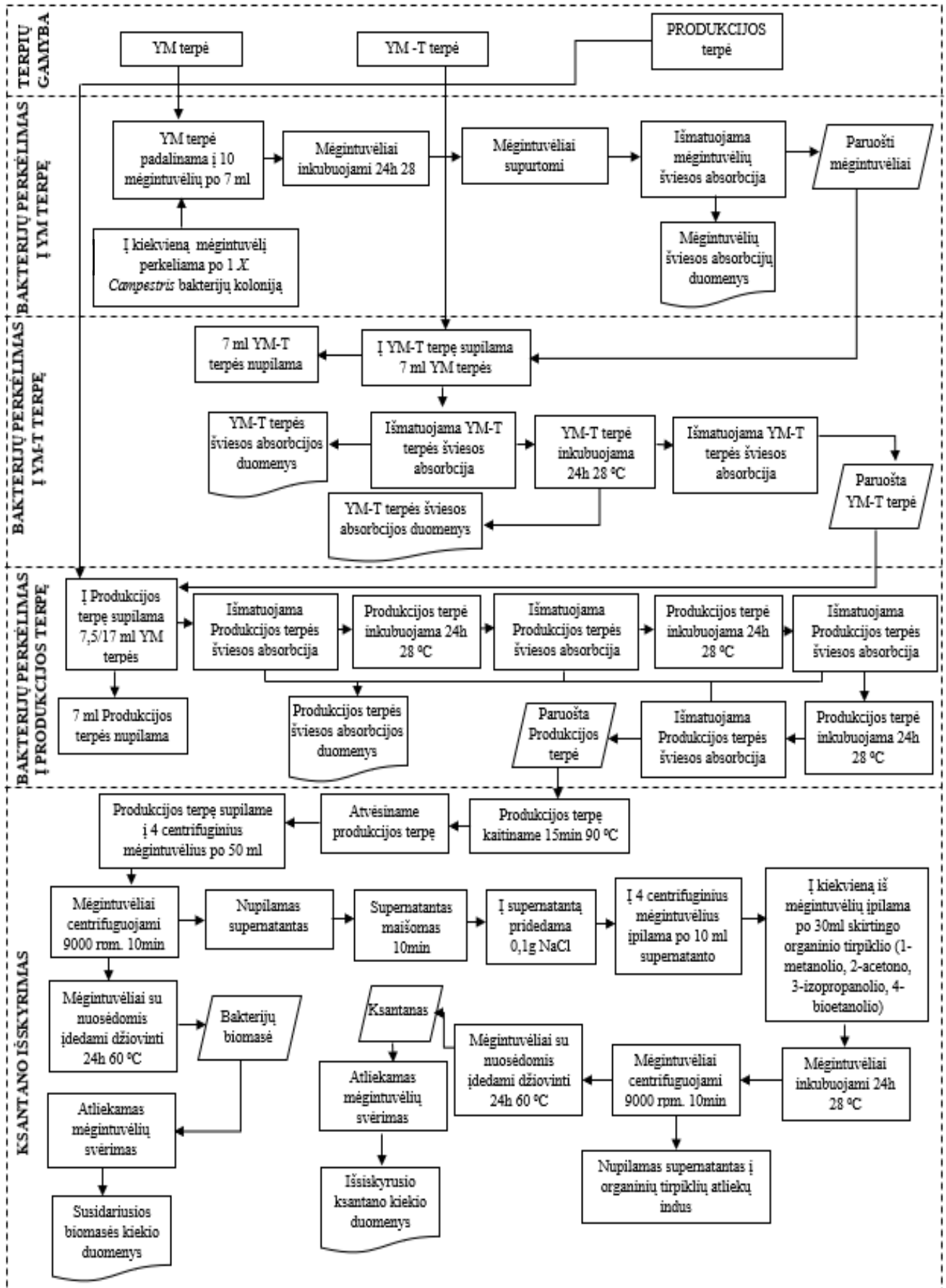
2.10.2. YM-T terpės gamybos schema



2.10.3. Produkcijos terpės gamybos schema



2.11. Principinė ksantano išskyrimo schema



3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

1 eksperimento tyrimų rezultatai

1 bandymas atliktas laikantis P .Chellapandi knygoje nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [70].

3.1 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,235		
24 h	1,758	1,763	1,746
Produkcijos terpė			
0 h	0,121		
24 h	1,100	1,102	1,099
48 h	1,289	1,327	1,351
72 h	1,715	1,719	1,709

Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{1,758 + 1,763 + 1,746}{3} = 0,500 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.2 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

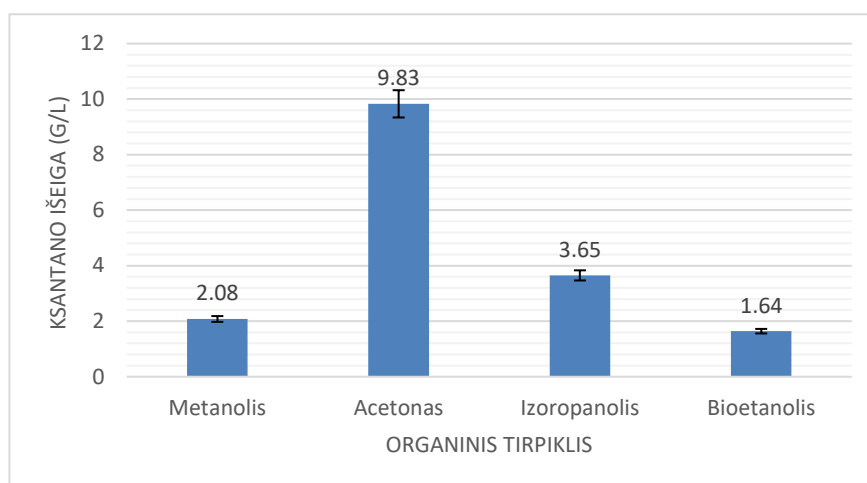
Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,4807	13,5686	0,0879
2	13,3728	13,4917	0,1189
3	13,4782	13,5531	0,0749
4	12,0666	12,1386	0,072
Ksantanas			
1 (Metanolis)	13,4151	13,4359	0,0208
2 (Acetonas)	13,3631	13,4614	0,0983
3 (Izoropanolis)	13,4266	13,4631	0,0365
4 (Bioetanolis)	13,222	13,2386	0,0164

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L):

0,0208 g (ksantano) - 10 ml (produkcijos terpės)

x g (ksantano) – 1000 ml (produkcijos terpės)

x = 2,08 (g/L)



3.1 pav. Xsantano išeiga (g/L), naudojant skirtingus organinius tirpiklius

2-3 eksperimentų tyrimų rezultatai, pakeitus mielių ekstrakto kiekį YM-T terpėje

2-3 bandymai atlikti laikantis straipsnyje C.R.R.Carignato, K.S.M.Olivera nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [3].

Paruoštos dvi YM-T terpės padidinus mielių ekstrakto kiekį – YM-T₁ ir YM-T₂.

YM-T₁ terpės sudėtis (75 ml):

- Sacharozė – 1,875 g
- Mielių ekstraktas - 0,375 g
- (NH₄)₂HPO₄ – 0,1875 g
- K₂HPO₄ – 0,1125 g
- MgSO₄ – 0,0075 g

YM-T₂ terpės sudėtis (75 ml):

- Sacharozė – 1,875 g
- Mielių ekstraktas - 0,525 g
- (NH₄)₂HPO₄ – 0,1875 g
- K₂HPO₄ – 0,1125 g
- MgSO₄ – 0,0075 g

Rezultatai gauti naudojant YM-T₁ terpę:

3.3 lentelė. YM-T₁ terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės₁ šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T ₁ terpė			
0 h	0,173		
24 h	2,430	2,367	2,374
Produkcijos terpė ₁			
0 h	0,633		
24 h	1,265	1,260	1,260
48 h	1,803	1,808	1,800
72 h	1,985	1,979	1,982

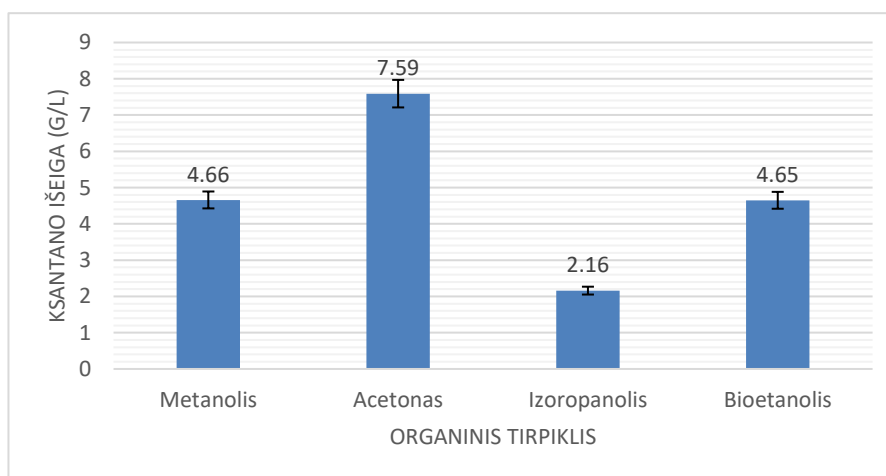
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T₁ terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{2,430 + 2,367 + 2,374}{3} = 0,680 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.4 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė ₁		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,1337	13,2834	0,1497
2	13,5995	13,6983	0,0988
3	12,5581	12,7424	0,1843
4	13,3407	13,4164	0,0757
	Ksantanas		
1 (Metanolis)	13,1808	13,2274	0,0466
2 (Acetonas)	13,6033	13,6792	0,0759
3 (Izoropanolis)	13,4437	13,4653	0,0216
4 (Bioetanolis)	13,2400	13,2865	0,0465

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.2 pav. Ksantano išeiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

Rezultatai gauti naudojant YM-T₂ terpę:

3.5 lentelė. YM-T₂ terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės₂ šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T ₂ terpė			
0 h	0,256		
24 h	2,443	2,132	2,391
Produkcijos terpė ₂			
0 h	0,621		
24 h	1,343	1,332	1,382
48 h	1,619	1,569	1,628
72 h	1,860	1,842	1,846

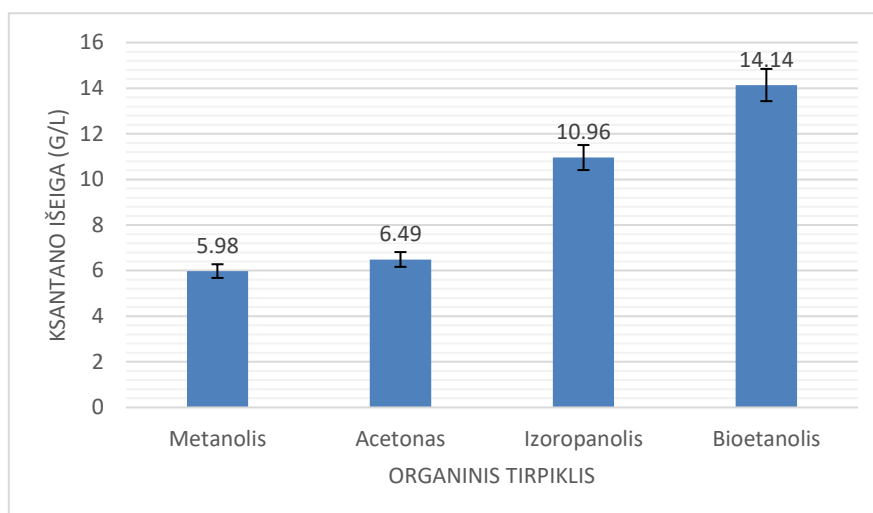
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T₂ terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{2,443 + 2,132 + 2,391}{3} = 0,661 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.6 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė ₂		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,2422	13,3543	0,1121
2	12,6681	12,7840	0,1159
3	13,3851	13,4481	0,0630
4	13,6011	13,7664	0,1653
Ksantanas			
1 (Metanolis)	13,3632	13,4230	0,0598
2 (Acetonas)	13,2821	13,3470	0,0649
3 (Izoropanolis)	13,4547	13,5643	0,1096
4 (Bioetanolis)	13,5151	13,6565	0,1414

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.3 pav. Xsantano išeiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

4 eksperimento tyrimų rezultatai, be azoto šaltinį ((NH₄)₂HPO₄) iš YM-T terpės

4 bandymas atliktas laikantis straipsnyje C.R.R.Carignato, K.S.M.Olivera nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [3].

YM-T terpės sudėtis (75 ml):

- Sacharozė – 1,875 g
- Mielių ekstraktas - 0,525 g
- (NH₄)₂HPO₄ – 0 g
- K₂HPO₄ – 0,1125 g
- MgSO₄ – 0,0075 g

3.7 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,146		
24 h	2,222	2,221	2,212
Produkcijos terpė			
0 h	0,515		
24 h	1,135	1,154	1,200
48 h	-	-	-
72 h	1,732	1,733	1,741

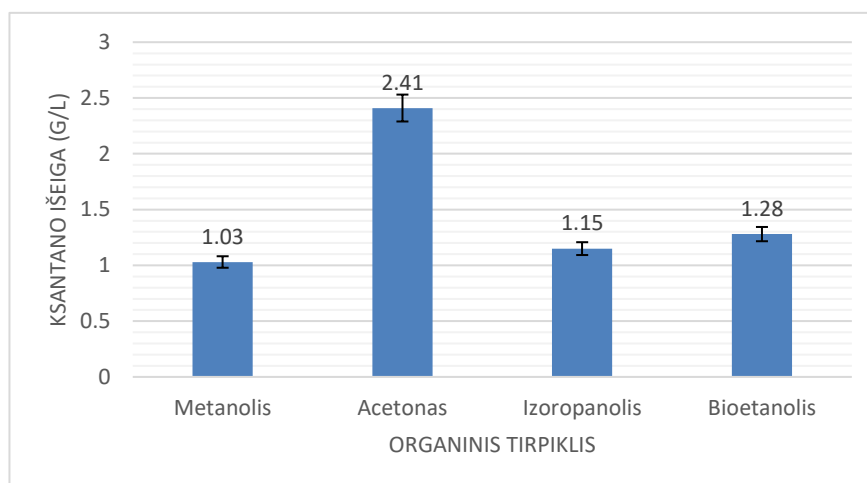
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{2,222 + 2,221 + 2,212}{3} = 0,631 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.8 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	12,0563	12,0761	0,0198
2	11,8605	11,9090	0,0485
3	12,7121	12,7466	0,0345
4	11,9555	12,0309	0,0754
	Ksantanas		
1 (Metanolis)	13,4515	13,4618	0,0103
2 (Acetonas)	13,1831	13,2072	0,0241
3 (Izoropanolis)	13,5263	13,5378	0,0115
4 (Bioetanolis)	13,4749	13,4877	0,0128

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.4 pav. Ksantano išeiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

5 eksperimento tyrimų rezultatai, papildžius YM-T terpę citratu

5 bandymas atliktas laikantis straipsnyje C.R.R.Carignato, K.S.M.Olivera nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [3].

YM-T terpės sudėtis (75 ml):

- Sacharozė – 1,875 g
- Mielių ekstraktas - 0,525 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,1875 g
- K_2HPO_4 – 0,1125 g
- MgSO_4 – 0,0075 g
- Citratas – 0,075 g

3.9 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,115		
24 h	1,918	1,945	1,924
Produkcijos terpė			
0 h	0,344		
24 h	1,549	1,547	1,549
48 h	1,779	1,780	1,776
72 h	2,114	2,118	2,107

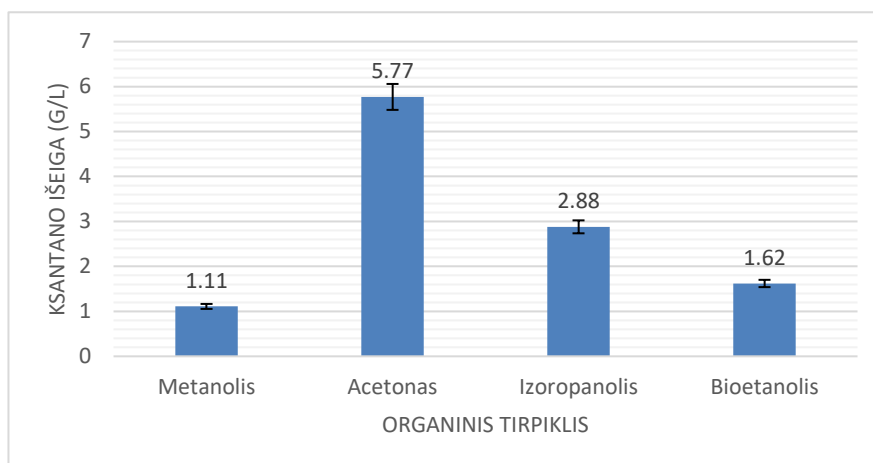
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{1,918 + 1,945 + 1,924}{3} = 0,549 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.10 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,4575	13,5408	0,0833
2	13,4511	13,5225	0,0714
3	13,5305	13,6078	0,7730
4	13,6184	13,7117	0,0933
Ksantanas			
1 (Metanolis)	13,2105	13,2216	0,0111
2 (Acetonas)	13,2795	13,3372	0,0577
3 (Izopropanolis)	13,6150	13,6438	0,0288
4 (Bioetanolis)	13,4250	13,4412	0,0162

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.5 pav. Ksantano išeiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

6 eksperimento tyrimų rezultatai, papildžius YM-T terpę glutamatu

6 bandymas atliktas laikantis straipsnyje C.R.R.Carignato, K.S.M.Olivera nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [3].

YM-T terpės sudėtis (75 ml):

- Sacharozė – 1,875 g
- Mielių ekstraktas - 0,525 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,1875 g
- K_2HPO_4 – 0,1125 g
- MgSO_4 – 0,0075 g
- Glutamatas – 0,1125 g

3.11 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,054		
24 h	1,907	1,887	1,895
Produkcijos terpė			
0 h	0,319		
24 h	1,454	1,464	1,458
48 h	1,567	1,569	1,575
72 h	2,103	2,101	2,101

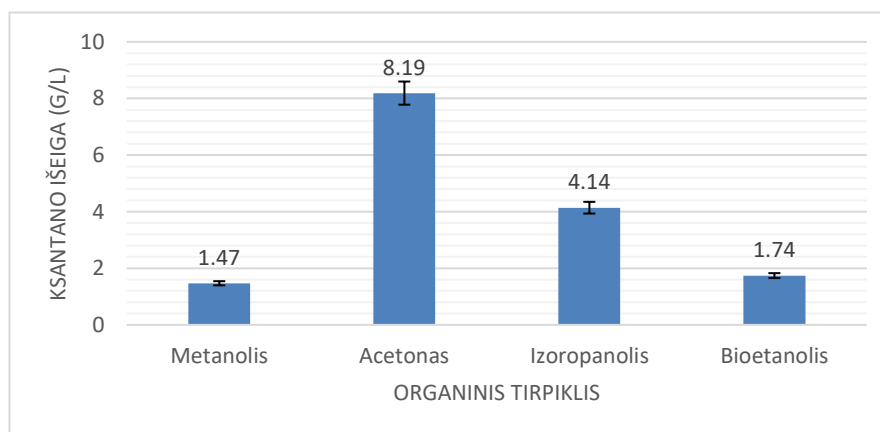
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{1,907 + 1,887 + 1,895}{3} = 0,540 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.12 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,5761	13,6442	0,0681
2	13,6416	13,7123	0,0707
3	13,5348	13,6003	0,0655
4	13,5946	13,6518	0,0572
	Ksantanas		
1 (Metanolis)	13,4526	13,4673	0,0147
2 (Acetonas)	13,3525	13,4344	0,0819
3 (Izoropanolis)	13,7250	13,7664	0,0414
4 (Bioetanolis)	13,3089	13,3263	0,0174

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.6 pav. Ksantano išėiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

7 eksperimento tyrimų rezultatai, papildžius YM-T terpę citratu ir glutamatu

7 bandymas atliktas laikantis straipsnyje C.R.R.Carignato, K.S.M.Olivera nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [3].

YM-T terpės sudėtis (75 ml):

- Sacharozė – 1,875 g
- Mielių ekstraktas - 0,525 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,1875 g
- K_2HPO_4 – 0,1125 g
- MgSO_4 – 0,0075 g

- Citratas – 0,075 g
- Glutamatas – 0,1125 g

3.13 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,109		
24 h	1,585	1,589	1,581
Produkcijos terpė			
0 h	0,165		
24 h	0,467	0,466	0,470
48 h	0,791	0,799	0,811
72 h	1,535	1,508	1,533

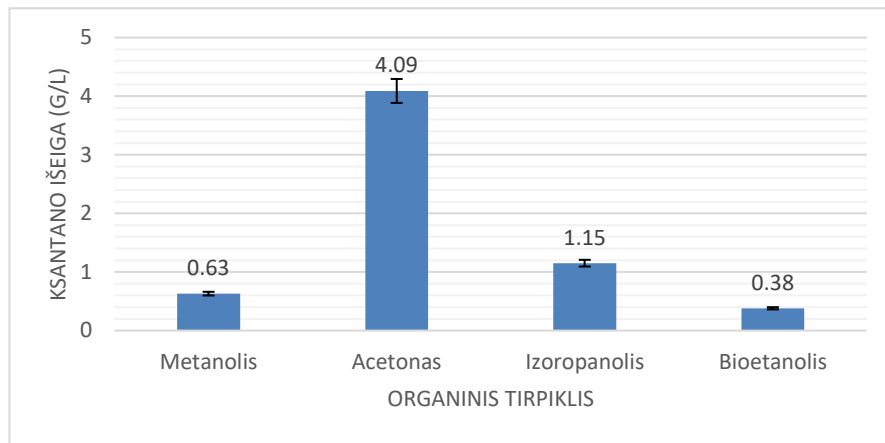
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{1,585 + 1,589 + 1,581}{3} = 0,451 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.14 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	11,9368	11,9905	0,0537
2	11,9755	12,0295	0,0540
3	11,9743	12,0363	0,0620
4	12,0035	12,0724	0,0689
Ksantanas			
1 (Metanolis)	11,9000	11,9063	0,0063
2 (Acetonas)	11,9622	12,0031	0,0409
3 (Izopropanolis)	11,8351	11,8466	0,0115
4 (Bioetanolis)	11,8943	11,8981	0,0038

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.7 pav. Xsantano išėiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

8 eksperimento tyrimų rezultatai, pakeitus YM-T terpės anglies šaltinį maltoze

8 bandymas atliktas laikantis P .Chellapandi knygoje nurodytos xsantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [70].

YM-T terpės sudėtis (50 ml):

- Maltozė – 0,6 g
- Bakteriologinis peptonas – 0,125 g
- Mielių ekstraktas - 0,075 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,075 g
- KH_2PO_4 – 0,125 g
- MgSO_4 – 0,0025 g
- Salyklo ekstraktas – 0,075 g

3.15 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,154		
24 h	1,894	1,912	1,892
Produkcijos terpė			
0 h	0,199		
24 h	1,213	1,207	1,212
48 h	1,697	1,696	1,697
72 h	1,896	1,917	1,910

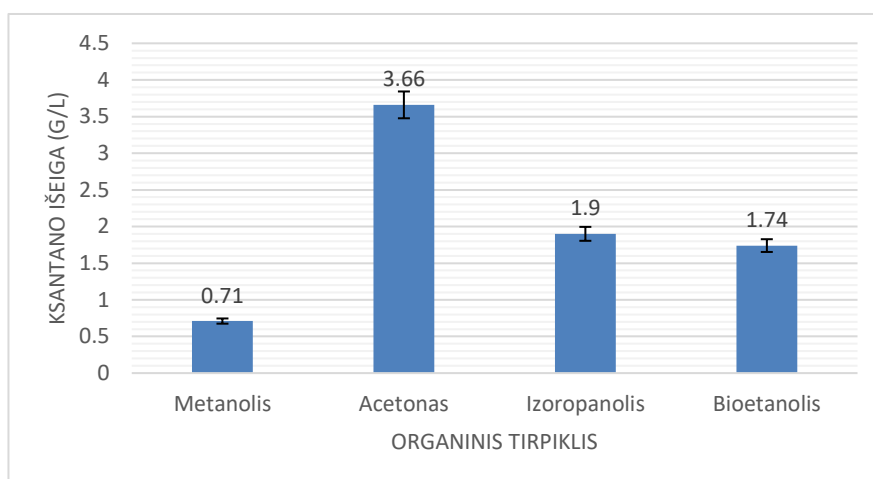
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{1,894 + 1,912 + 1,892}{3} = 0,540 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.16 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,4465	13,4933	0,0468
2	13,4405	13,4889	0,0484
3	13,4443	13,4975	0,0532
4	13,4192	13,4719	0,0527
	Ksantanas		
1 (Metanolis)	13,3577	13,3648	0,0071
2 (Acetonas)	13,3264	13,3630	0,0366
3 (Izoropanolis)	13,1936	13,2126	0,0190
4 (Bioetanolis)	13,7843	13,8017	0,0174

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.8 pav. Ksantano išėiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

9 eksperimento tyrimų rezultatai, pakeitus YM-T terpės anglies šaltinį stevija

9 bandymas atliktas laikantis P .Chellapandi knygoje nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [70].

YM-T terpės sudėtis (50 ml):

- Stevija – 0,6 g
- Bakteriologinis peptonas – 0,125 g
- Mielų ekstraktas - 0,075 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,075 g
- KH_2PO_4 – 0,125 g
- MgSO_4 – 0,0025 g

- Salyklo ekstraktas – 0,075 g

3.17 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,207		
24 h	1,350	1,354	1,337
Produkcijos terpė			
0 h	0,123		
24 h	1,456	1,468	1,459
48 h	-	-	-
72 h	2,148	2,130	2,115

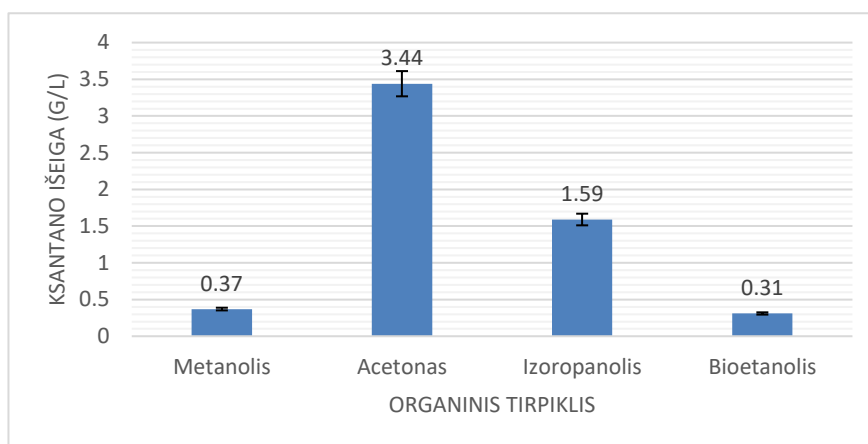
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{1,350 + 1,354 + 1,337}{3} = 0,383 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.18 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,8155	13,9149	0,0994
2	13,8995	13,9940	0,0945
3	13,5126	13,6137	0,1014
4	13,7223	13,8278	0,1055
Ksantanas			
1 (Metanolis)	14,4593	14,4630	0,0037
2 (Acetonas)	14,0746	14,1090	0,0344
3 (Izopropanolis)	14,2953	14,3112	0,0159
4 (Bioetanolis)	14,0526	14,0557	0,0031

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.9 pav. Xsantano išeiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

10 eksperimento tyrimų rezultatai, pakeitus YM-T terpės anglies šaltinį cukranendrių cukrumi

10 bandymas atliktas laikantis P .Chellapandi knygoje nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [70].

YM-T terpės sudėtis (50 ml):

- Cukranendrių cukrus - 0,6 g
- Bakteriologinis peptonas – 0,125 g
- Mielių ekstraktas - 0,075 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,075 g
- KH_2PO_4 – 0,125 g
- MgSO_4 – 0,0025 g
- Salyklo ekstraktas – 0,075 g

3.19 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,180		
24 h	1,592	1,584	1,583
Produkcijos terpė			
0 h	0,162		
24 h	1,916	1,896	1,910
48 h	-	-	-
72 h	2,193	2,184	2,129

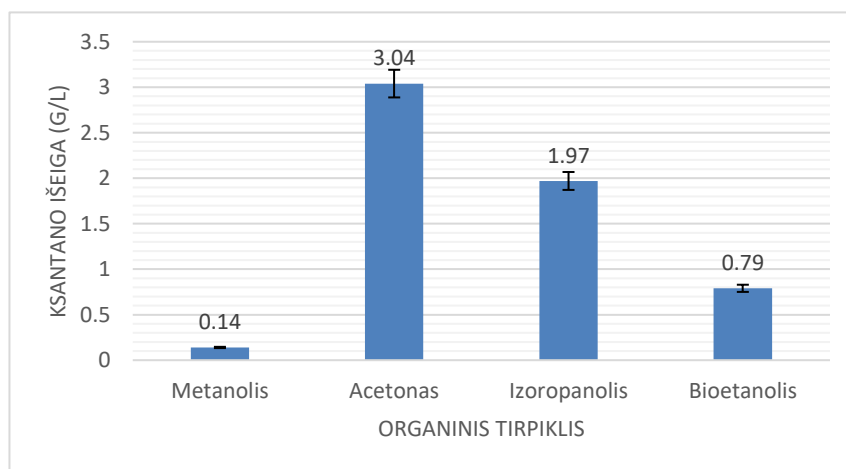
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{1,592 + 1,584 + 1,583}{3} = 0,451 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.20 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,7121	13,8243	0,1122
2	13,4935	13,5959	0,1024
3	13,4503	13,5586	0,1083
4	13,6613	13,7743	0,1130
	Ksantanas		
1 (Metanolis)	13,7173	13,7187	0,0014
2 (Acetonas)	13,9567	13,9871	0,0304
3 (Izoropanolis)	13,8095	13,8292	0,0197
4 (Bioetanolis)	13,6086	13,6165	0,0079

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.10 pav. Ksantano išėiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

11 eksperimento tyrimų rezultatai, pakeitus YM-T terpės anglies šaltinį fruktoze

11 bandymas atliktas laikantis P. Chellapandi knygoje nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [70].

YM-T terpės sudėtis (50 ml):

- Fruktozė – 0,6 g
- Bakteriologinis peptonas – 0,125 g
- Mielų ekstraktas - 0,075 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,075 g

- KH_2PO_4 – 0,125 g
- MgSO_4 – 0,0025 g
- Salyklo ekstraktas – 0,075 g

3.21 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,177		
24 h	1,222	1,220	1,219
Produkcijos terpė			
0 h	0,097		
24 h	1,154	1,156	1,152
48 h	1,178	1,174	1,175
72 h	1,284	1,828	1,283

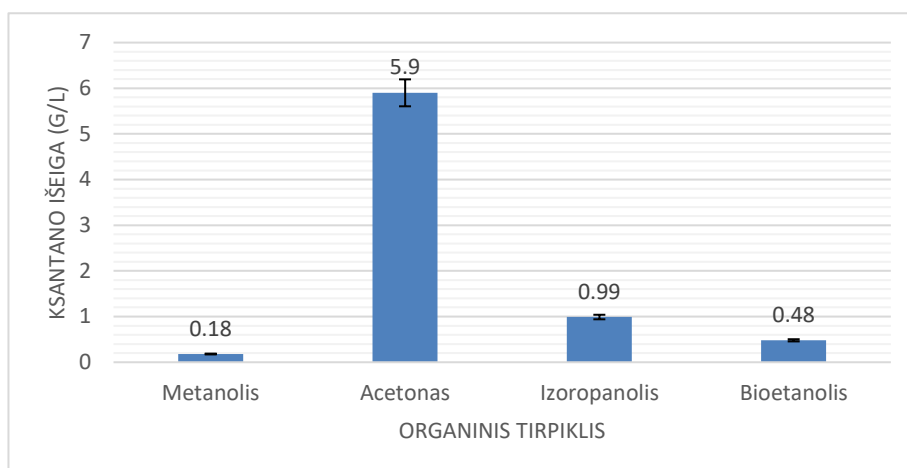
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{1,222 + 1,220 + 1,219}{3} = 0,347 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.22 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,3437	13,3651	0,0214
2	13,4638	13,4851	0,0213
3	13,5656	13,5835	0,0179
4	13,4905	13,5181	0,0276
Ksantanas			
1 (Metanolis)	13,2708	13,2726	0,0018
2 (Acetonas)	13,5699	13,6289	0,0590
3 (Izopropanolis)	13,2235	13,2334	0,0099
4 (Bioetanolis)	13,7184	13,7232	0,0048

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.11 pav. Ksantano išeiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

12 eksperimento tyrimų rezultatai, pakeitus YM-T terpės anglies šaltinį kokosų cukrumi

12 bandymas atliktas laikantis P .Chellapandi knygoje nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [70].

YM-T terpės sudėtis (50 ml):

- Kokosų cukrus – 0,6 g
- Bakteriologinis peptonas – 0,125 g
- Mielių ekstraktas - 0,075 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,075 g
- KH_2PO_4 – 0,125 g
- MgSO_4 – 0,0025 g
- Salyklo ekstraktas – 0,075 g

3.23 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,173		
24 h	1,129	1,132	1,121
Produkcijos terpė			
0 h	0,276		
24 h	1,228	1,235	1,232
48 h	1,469	1,477	1,470
72 h	1,827	1,857	1,834

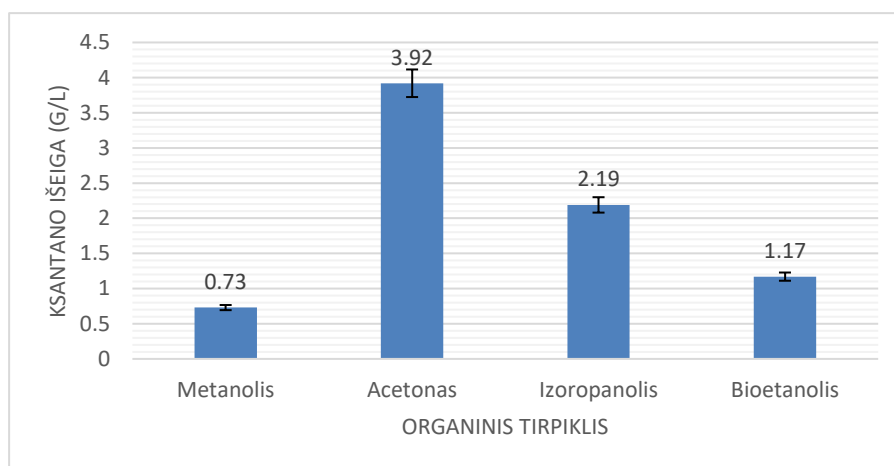
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{1,129 + 1,132 + 1,121}{3} = 0,321 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.24 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,5507	13,6007	0,0500
2	11,8578	11,9145	0,0567
3	13,5863	13,6400	0,0537
4	13,2428	13,2981	0,0553
	Ksantanas		
1 (Metanolis)	13,7431	13,7504	0,0073
2 (Acetonas)	13,4275	13,4667	0,0392
3 (Izoropanolis)	13,6503	13,6722	0,0219
4 (Bioetanolis)	12,6083	12,6200	0,0117

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.12 pav. Ksantano išeiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

13 eksperimento tyrimų rezultatai, pakeitus YM-T terpės anglies šaltinį sacharozė

13 bandymas atliktas laikantis P. Chellapandi knygoje nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [70].

YM-T terpės sudėtis (50 ml):

- Sacharozė – 0,6 g
- Bakteriologinis peptonas – 0,125 g
- Mielių ekstraktas - 0,075 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,075 g
- KH_2PO_4 – 0,125 g
- MgSO_4 – 0,0025 g

- Salyklo ekstraktas – 0,075 g

3.25 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,182		
24 h	2,065	2,068	2,066
Produkcijos terpė			
0 h	0,203		
24 h	1,015	1,012	1,014
48 h	-	-	-
72 h	1,415	1,416	1,400

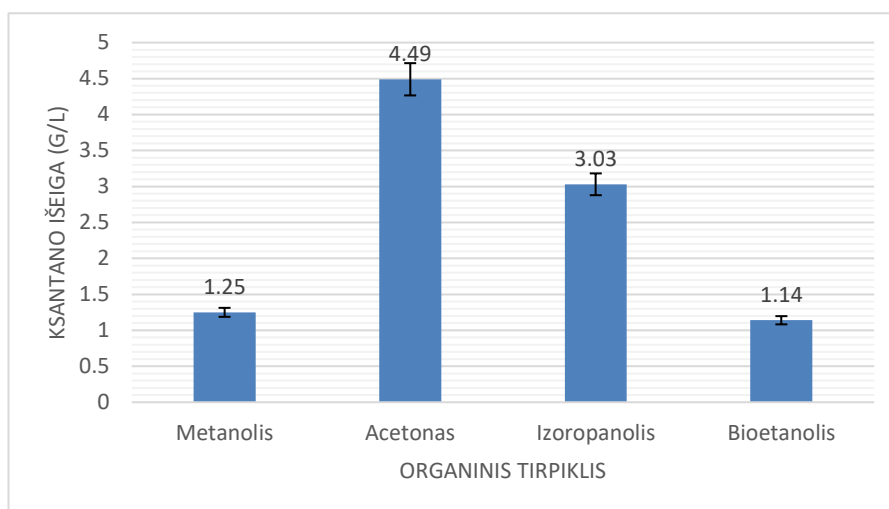
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{2,065 + 2,068 + 2,066}{3} = 0,588 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.26 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,2664	13,3164	0,0500
2	13,8471	13,8955	0,0484
3	13,5258	13,5787	0,0529
4	13,4459	13,4980	0,0521
Ksantanas			
1 (Metanolis)	13,8519	13,8644	0,0125
2 (Acetonas)	13,0180	13,0629	0,0449
3 (Izoropanolis)	13,6102	13,6405	0,0303
4 (Bioetanolis)	13,5867	13,5981	0,0114

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.13 pav. Ksantano išeiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

14 eksperimento tyrimų rezultatai, pakeitus YM-T terpės anglies šaltinį laktoze

14 bandymas atliktas laikantis P. Chellapandi knygoje nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [70].

YM-T terpės sudėtis (50 ml):

- Laktozė – 0,6 g
- Bakteriologinis peptonas – 0,125 g
- Mielių ekstraktas - 0,075 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,075 g
- KH_2PO_4 – 0,125 g
- MgSO_4 – 0,0025 g
- Salyklo ekstraktas – 0,075 g

3.27 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,177		
24 h	1,640	1,636	1,640
Produkcijos terpė			
0 h	0,120		
24 h	1,176	1,179	1,178
48 h	-	-	-
72 h	1,917	1,900	1,910

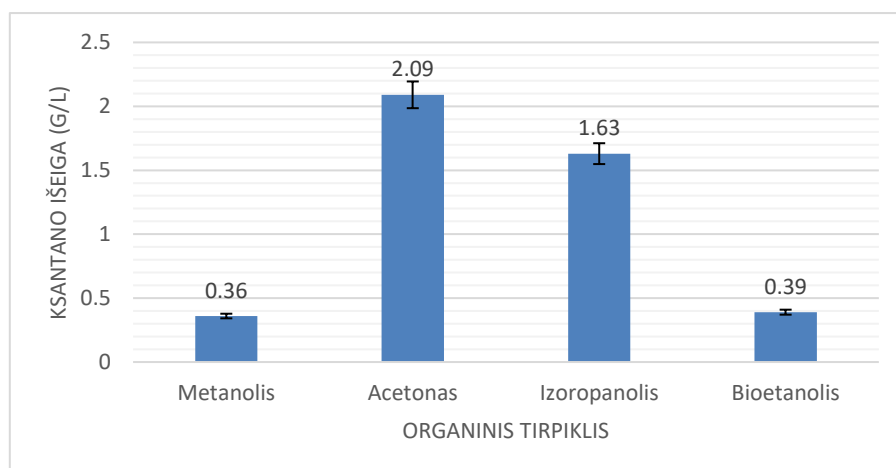
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{1,640 + 1,636 + 1,640}{3} = 0,466 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.28 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,2792	13,3409	0,0617
2	13,7026	13,7659	0,0633
3	13,6369	13,7017	0,0648
4	13,4448	13,5144	0,0696
	Ksantanas		
1 (Metanolis)	13,5482	13,5518	0,0036
2 (Acetonas)	13,5684	13,5893	0,0209
3 (Izoropanolis)	13,6486	13,6649	0,0163
4 (Bioetanolis)	11,9603	11,9642	0,0039

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.14 pav. Ksantano išeiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius

15 eksperimento tyrimų rezultatai, pakeitus YM-T terpės anglies šaltinį ksiloze

15 bandymas atliktas laikantis P .Chellapandi knygoje nurodytos ksantano išskyrimo metodikos, naudota pateikta terpių sudėtis [70].

YM-T terpės sudėtis (50 ml):

- Ksilozė – 0,6 g
- Bakteriologinis peptonas – 0,125 g
- Mielių ekstraktas - 0,075 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,075 g
- KH_2PO_4 – 0,125 g
- MgSO_4 – 0,0025 g

- Salyklo ekstraktas – 0,075 g

3.29 lentelė. YM-T terpės šviesos absorbcija po 0 – 24 h, produkcijos terpės šviesos absorbcija po 0 – 72 h, inkubacijos 28 °C temperatūroje

Inkubacijos laikas	Šviesos sugertis		
YM-T terpė			
0 h	0,148		
24 h	0,978	0,974	0,975
Produkcijos terpė			
0 h	0,078		
24 h	1,096	1,096	1,095
48 h	-	-	-
72 h	1,410	1,405	1,397

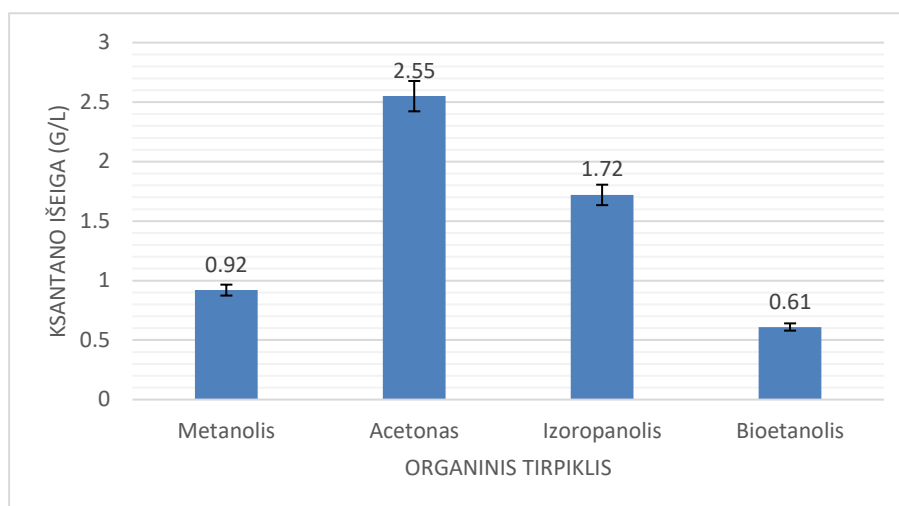
Apskaičiuota biomasės koncentracija YM-T terpėje:

$$c_{\beta} = 0,2845 \times \frac{0,978 + 0,974 + 0,975}{3} = 0,278 \left(\frac{g}{l}\right)$$

3.30 lentelė. Tyrimo metu susidariusi biomasės ir ksantano koncentracija

Mėgintuvėlio numeris	Produkcijos terpė		
	Biomasė		
	Tuščio mėgintuvėlio svoris, g	Mėgintuvėlio su nuosėdomis svoris, g	Koncentracija, (g/10 ml)
1	13,6880	13,7200	0,0320
2	13,2887	13,3087	0,0200
3	14,4745	14,5042	0,0297
4	14,3972	14,3744	0,0228
Ksantanas			
1 (Metanolis)	13,0060	13,0152	0,0092
2 (Acetonas)	13,5000	13,5255	0,0255
3 (Izoropanolis)	13,3706	13,3878	0,0172
4 (Bioetanolis)	13,7083	13,7144	0,0061

Gauta ksantano koncentracija (g/10 ml) iš 10 ml produkcijos terpės. Apskaičiuojama ksantano koncentracija (g/L).



3.15 pav. Ksantano išeiga (g/L) naudojant skirtingus organinius tirpiklius.

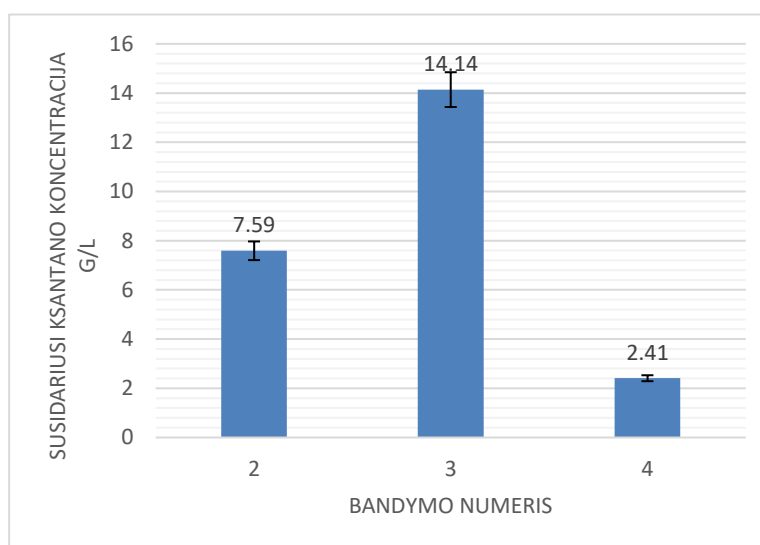
3.1. Rezultatų apibendrinimas

Tiriamąjį darbą metu tirtas YM-T terpės sudėties poveikis ksantano išeigai. Naudotos dvi skirtingos metodikos, stebėta terpės pokyčių įtaka.

Naudojantis straipsnio C.R.R.Carignato, K.S.M. metodika, nustatyta YM-T terpės azoto šaltinio, priedų – citrato ir glutamato, įtaką ksantano išeigai [3]. 2 - 4 bandymų metu palyginta 3 skirtingų YM-T terpės azoto šaltinių ir jų pokyčio įtaka ksantano išskyrimui. 2-4 tyrimų metu susidaręs ksantano kiekis grafiškai pavaizduotas 3.16. paveiksle.

3.31 lentelė. 2-4 tyrimų metu naudoti YM-T terpių azoto šaltiniai

Bandymo nr.	Mielių ekstraktas, %	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, %	Susidariusi ksantano koncentracija, g/L
2	0,3	0,25	7,59
3	0,5	0,25	14,14
4	0,5	0	2,41



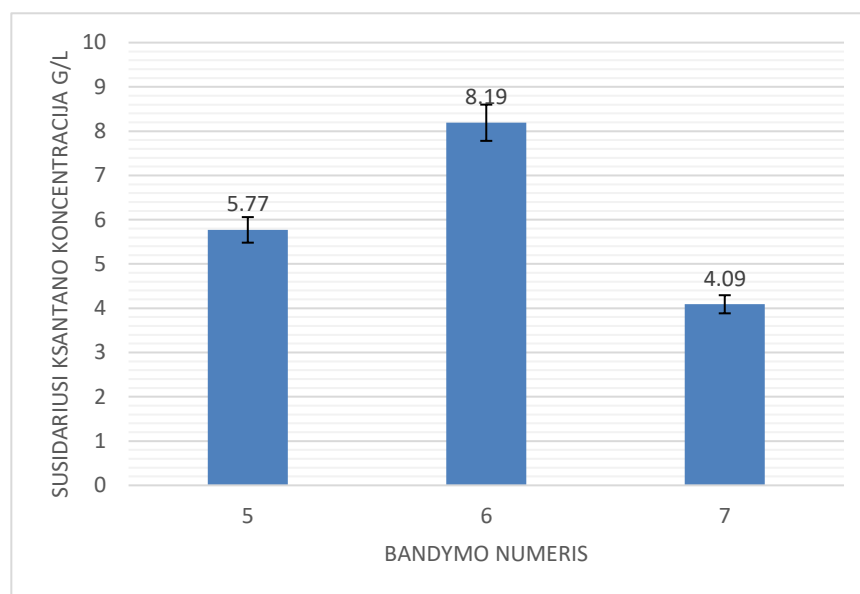
3.16 pav. 2-4 tyrimų metu susidariusi ksantano koncentracija (g/L)

Pagal gautus rezultatus matome, kad didžiausia ksantano išeiga gauta naudojant YM-T terpę, kurios sudėtyje buvo 0,5 % mielių ekstrakto ir 0,25 % $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Galima teigti, jog didesnis azoto kiekis turi teigiamą įtaką ksantano išskirti. Taip pat, pagal rezultatų skirtumą, galima numatyti, jog diamonio fosfatas yra tinkamesnis, labiau bakterijų įsisavinamas azoto šaltinis, nei mielių ekstraktas.

5 – 7 tyrimų metu tirta citrato ir glutamato įtaka YM-T terpės sudėčiai ir ksantano išskirimui. Tiksliai citrato ir glutamato koncentracija skirtingų bandymų metu nurodyta 3.32. lentelėje. Pagal bandymo metu išskirto ksantano kiekį (3.17. pav.) galima teigti, jog citratas ir glutamatas šiek tiek padidino ksantano išeigą. Lyginant šias dvi medžiagas tarpusavyje, geresni rezultatai gauti naudojant glutamatą. Tuo tarpu naudojant šias medžiagas abi toje pačioje YM-T terpėje stebėtas išeigos sumažėjimas.

3.32 lentelė. 5 - 7 tyrimų YM-T terpių papildytų citratu ir glutamatu sudėtis

Bandymo nr.	Mielių ekstraktas, %	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, %	Citratas, %	Glutamatas, %	Susidariusi ksantano koncentracija, g/L
5	0,5	0,25	0,1	0,15	5,77
6	0,5	0,25	-	0,15	8,19
7	0,5	0,25	0,1	0,15	4,09

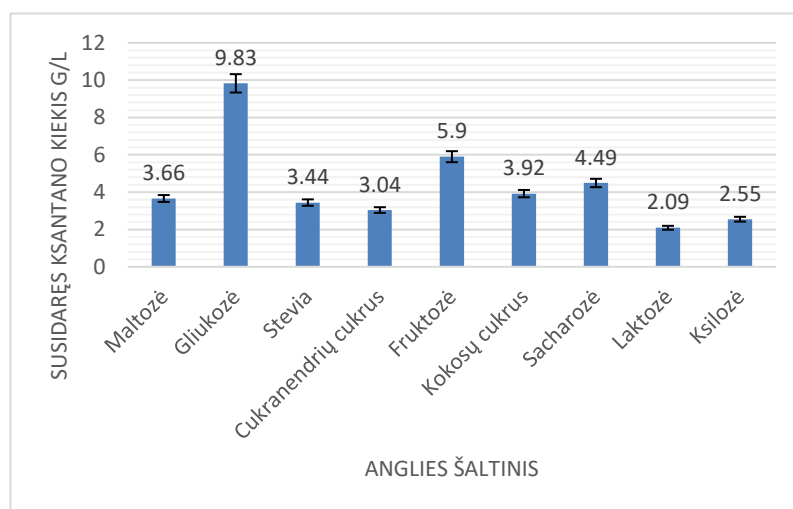


3.17 pav. 5 - 7 tyrimų metu susidariusi ksantano koncentracija g/L

Taikant knygos P .Chellapandi, metodiką, keistas YM-T terpės anglies šaltinis ir stebėta jo įtaka susidariusiam ksantano kiekiui [70]. Anglies šaltinio tyrimų rezultatai pateikti 3.33. lentelėje, grafiškai atvaizduoti 3.18 paveiksle. Didžiausia ksantano išeiga pasižymėjo tyrimas, kurio metu YM-T terpėje, kaip anglies šaltinis naudota gliukozė. Kitų tyrimų metu gauti rezultatai labai panašūs. Taip pat didele ksantano išeiga pasižymėjo terpės, kuriose naudota fruktozė, sacharozė.

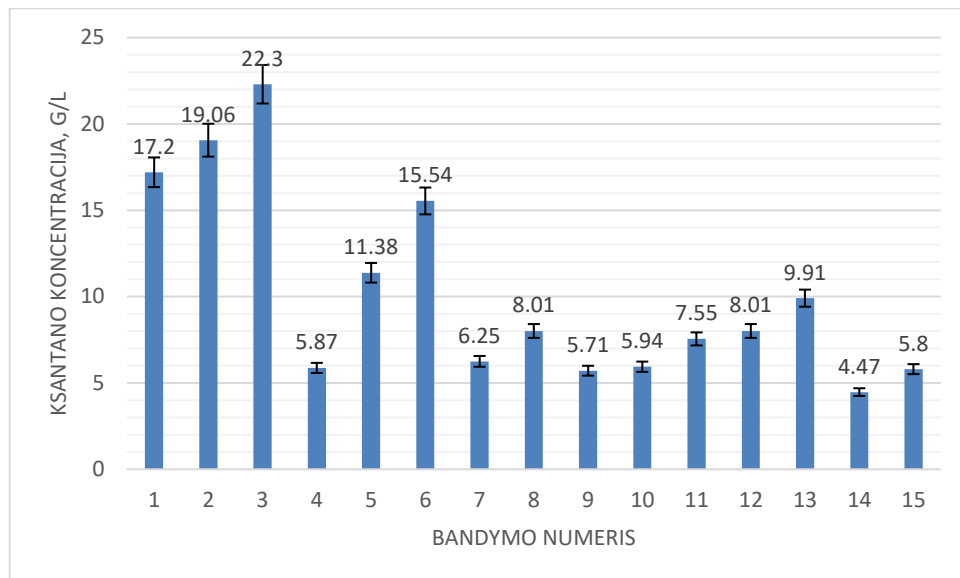
3.33 lentelė. 1, 8-15 tyrimų metu naudotų YM-T terpių anglies šaltiniai ir tyrimų metu susidaręs ksantano kiekis

Anglies šaltinis	Susidariusi ksantano koncentracija g/L
Maltozė	3,66
Gliukozė	9,83
Stevija	3,44
Cukranendrių cukrus	3,04
Fruktozė	5,9
Kokosų cukrus	3,92
Sacharozė	4,49
Laktozė	2,09
Ksilozė	2,55



3.18 pav. 1, 8-15 tyrimų metu naudotų YM-T terpių anglies šaltinių įtaka ksantano susidarymui

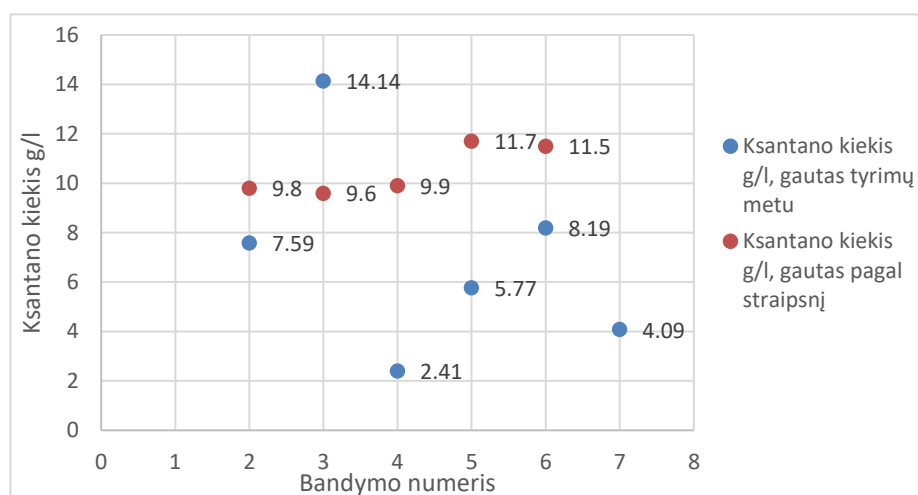
Anot straipsnio autorių C.R.R.Carignato, K.S.M.Olivera, nustatyta nauja YM-T terpės sudėtis, kurios gamyba daug pigesnė, o nuo to ksantano išėiga nepakinta ar net padidėja [3]. Kadangi baigiamojo darbo tyrimų metu naudotos dvi skirtingos metodikos jas galima palyginti. Visų 1-15 bandymų metu gauti rezultatai grafiškai pavaizduoti 3.19. paveiksle.



3.19 pav. 1-15 tyrimų metu susidariusi ksantano koncentracija, g/L

2-7 tyrimų metu taikyta straipsnio metodika, 1, 8-15 tyrimų metu taikyta knygos metodika. Pagal susidariusį ksantano kiekį galima teigti, jog efektyvesnė YM-T terpės sudėtis nurodyta pagal straipsnį. Geriausi rezultatai gauti trečiojo tyrimo metu, naudojant didesnę kiekį azoto šaltinių. Kad būtų galima tvirtai teigti, jog tai geriausia YM-T terpės sudėtis, reiktų didesnio kiekio palyginamųjų tyrimų. Tačiau galima teigti, jog C.R.R.Carignato, K.S.M.Olivera straipsnyje nurodyta YM-T terpės sudėtis pranašesnė už nurodytą P.Chellapandi knygoje. Taip pat galima teigti, jog šios terpės gamyba pigesnė, nes pagal straipsnio metodiką naudota mažiau skirtingų medžiagų.

Siekiant įvertinti tyrimų atkartojamumą, baigiamojo darbo metu gautus rezultatus tikslinga palyginti su C.R.R.Carignato, K.S.M.Olivera straipsnyje nurodytais rezultatais [3]. Rezultatų palyginimas pateiktas 3.20. paveiksle.

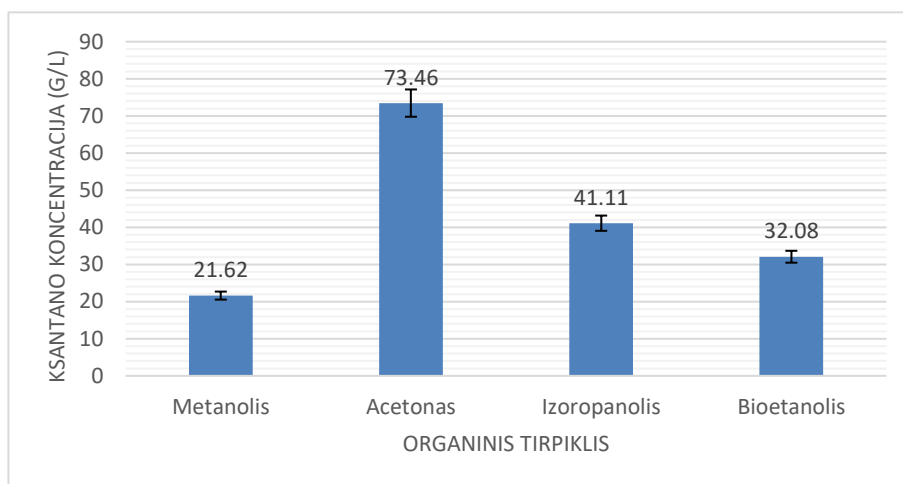


3.20 pav. Tyrimų metu gautų rezultatų palyginimas su straipsnyje nurodytais rezultatais

Pagal 3.20. paveikslą galima stebėti baigiamojo darbo tyrimų, kurių metu taikyta straipsnio metodika, ir straipsnyje pateiktus rezultatus. Tyrimų metu gauti rezultatai nėra identiški straipsnyje nurodytiems rezultatams. Tačiau stebimos panašios rezultatų kitimo tendencijos. Daugumos tyrimų metu gautos mažesnės ksantano išėigos, lyginant su straipsnio rezultatais. Tam įtakos galėjo turėti: terpės pH,

terpių kultivavimo sąlygos, įrangos tikslumo, žmogiškieji veiksniai. Tad siekiant patikimai tegti, jog ši YM-T terpės sudėtis tikrai yra geresnė už kitose metodikose nurodomas, reiktų atlikti daugiau palyginamųjų tyrimų taikant būtent šio straipsnio metodiką.

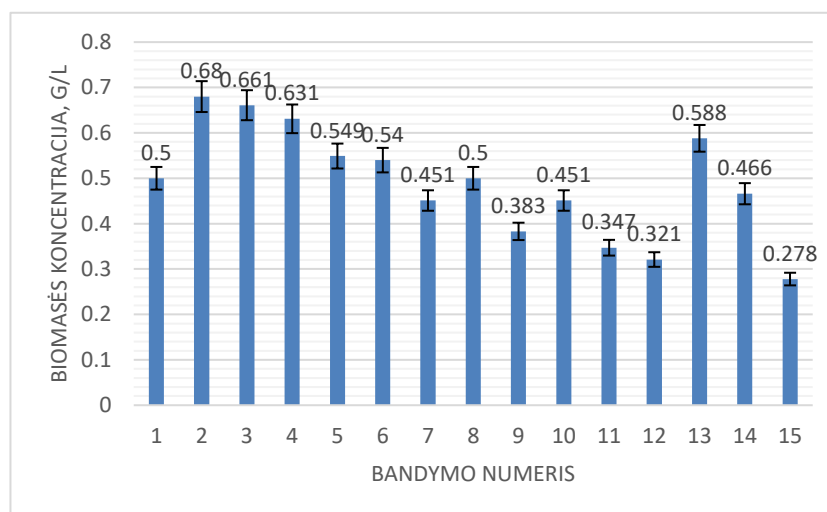
Ksantano išskyrimui naudoti skirtingi organiniai tirpikliai: metanolis, acetonas, izopropanolis, bioetanolis. Tyrimų metu siekta palyginti, kuris organinis tirpiklis tinkamiausias ksantano išskyrimui iš produkcijos terpės. Ksantano kiekis, išskirtas skirtingais organiniais tirpikliais, pateiktas 3.21. paveiksle.



3.21 pav. Bendra ksantano koncentracija susidariusi naudojant skirtingus organinius tirpiklius

Pagal gautus rezultatus galima teigti, jog tinkamiausias ksantano išskyrimui organinis tirpiklis yra acetonas. Taip pat geri rezultatai gauti izopropanoliu. Naudojant bioetanolį ir metanolį gautos mažesnės ksantano išeigos. Didžiausios ksantano išeigos gaunamos naudojant acetoną. Aplinkosauginiu požiūriu, tyrimams galėtų būti naudojamas tik šis organinis tirpiklis.

YM-T terpės sudėtis turi įtakos biomasės susidarymui. Nuo biomasės kiekio priklauso ir bakterijų išskirto biopolimero – ksantano kiekis. Tyrimų metu susidaręs biomasės kiekis pavaizduotas 3.22. paveiksle.



3.22 pav. Biomasės koncentracijos palyginimas YM-T terpėje po 24h inkubacijos

Pagal gautus rezultatus matome, jog susidaręs biomasęs kiekis, tyrimų metu skyręsi nežymiai. Tačiau stebima tendenciją, jog taikant straipsnio C.R.R.Carignato, K.S.M.Olivera metodiką susidaręs biomasęs kiekis šiek tiek didesnis nei kitų tyrimų metu [3]. Tai dar vienas rodiklis rodantis, jog straipsnyje nurodytos metodikos YM-T terpęs sudętis tinkamesnę ksantano gamybai.

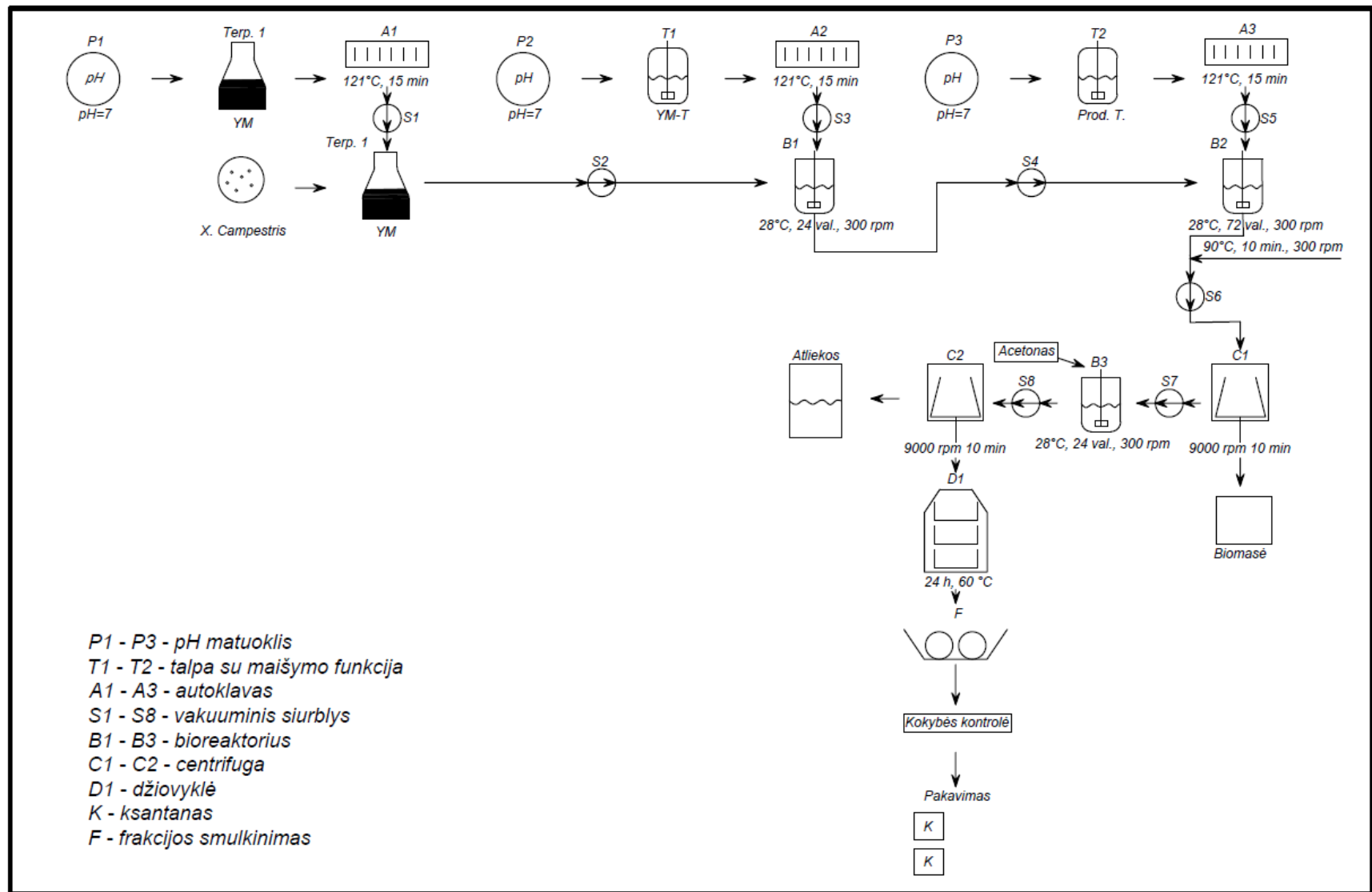
4. Rekomendacijų dalis

Pagal gautus rezultatus sudaryta ksantano gamybos iš *Xanthomonas campestris* bakterijų aparatūrinė schema, pateikta 4.1. paveiksle. Ši schema sudaryta pramoninei ksantano gamybai. Norint pasiekti optimalią ksantano išeią, rekomenduojama laikytis šios schemos bei joje nurodytų gamybos sąlygų.

Rekomenduojama bioreaktoriuose palaikyti pastovią 28–30°C terpių temperatūrą. Terpės pH turėtų būti neutralus 6,5–7,5. Bioreaktoriaus maišymo greitis turėtų būti 300–500 rpm, priklausomai nuo terpės tūrio. Anglies šaltinio koncentracija terpėje neturėtų viršyti 2–4 %, azoto koncentracija 0,05–0,1 %. Optimalus anglies ir azoto santykis terpėje 5:2. Turi būti užtikrintas pastovus deguonies tiekimas.

Paruošiamos bakterijų augimo (YM, YM-T) ir fermentacijos terpės ksantano gamybai. Naudojant natrio hidroksidą ir sieros rūgštį nustatomas neutralus terpės 1 (YM), YM-T, produkcijos terpių pH. Atliekamas šių terpių autoklavavimas 121°C, 15 minučių. Vakuuminių siurblių S1, S3, S5 pagalba YM terpė perkeliama į naują talpą. YM-T ir produkcijos terpės perkeliama į bioreaktorius B1 ir B2. Žinomos koncentracijos *Xanthomonas campestris* bakterijų suspensija perkeliama į YM terpę. YM terpė naudojant vakuuminį siurblį S2 perkeliama į bioreaktorių B1 su autoklavuota YM-T terpe. Bioreaktoriuje B1 24 valandas, 28 °C temperatūroje, esant pastoviam deguonies tiekimui ir maišymo greičiui 300 rpm, vykdomas bakterijų kultivavimas. Naudojant vakuuminį siurblį S4, YM-T terpė perkeliama į bioreaktorių B2 su autoklavuota produkcijos terpe. Vykdoma fermentacija 72 valandas, 28 °C temperatūroje, esant pastoviam deguonies tiekimui ir maišymo greičiui 300 rpm. Po fermentacijos vykdomas bakterijų inaktyvavimas, terpė kaitinama 90°C, 10 minučių, pastoviai maišant 300 rpm greičiu. Naudojant vakuuminį siurblį S6, terpė perkeliama į centrifugą C1. Atliekamas terpės centrifugavimas 9000 rpm 10 minučių. Nuosėdos atskiriamos nuo supernatanto. Nuosėdos tai inaktyvuotų bakterijų biomasė. Supernatantas naudojant vakuuminį siurblį S7, perkeliama į bioreaktorių B3. Į šį bioreaktorių įpilamas tris kartus didesnis nei supernatanto, acetono kiekis. Terpė laikoma 24 valandas, 28 °C temperatūroje, esant pastoviam maišymo greičiui 300 rpm. Naudojant vakuuminį siurblį S8 terpė perkeliama į centrifugą C2. Atliekamas terpės centrifugavimas 9000 rpm 10 minučių. Susidaręs supernatantas – tai organinio tirpiklio atliekos, kurios pašalinamos į specialią organinio tirpiklio atliekų laikymo talpą. Nuosėdos – ksantanas toliau 24 valandas, 28 °C temperatūroje džiovinamos. Išdžiovintos nuosėdos sumalamos iki norimos frakcijos dydžio medžiagos. Atliekama ksantano kokybinė analizė. Įsitikinus ksantano grynumu ir kokybe atliekamas ksantano pakavimas.

Tolimesnių tyrimų metu patartina išbandyti ksantano gamybai panaudoti pramonės atliekas bei atsinaujinančias medžiagas: obuolių sulčių gamybos atliekas, cukranendrių melasą, sūrio išrūgas. Taip pat naudinga ksantano gamybai pabandyti panaudoti kitas *Xanthomonas* rūšies bakterijas. Siekiant gamybą padaryti ekologiškesne patartina išbandyti kitus ksantano atskyrimo būdus, pavyzdžiui ultrafiltraciją.



4.1 pav. Ksantano gamybos iš *Xanthomonas campestris* bakterijų aparatūrinė schema

Išvados

1. Biomasės koncentracija bakterijų augimo terpėje tiesiogiai proporcinga susidariusio ksantano koncentracijai. Tai reiškia, jog kuo tinkamesnė YM-T (augimo terpės) sudėtis *Xanthomonas campestris* dauginimuisi, tuo daugiau bakterijos išskiria ksantano. Tyrimų rezultatai priklausė nuo optimalios YM-T terpės sudėties parinkimo.
2. Tinkamas YM-T terpės anglies šaltinio parinkimas labai svarbus ksantanui pagaminti. Didžiausia ksantano išeiga gaunama mitybinėse terpėse anglies šaltiniu naudojant gliukozę, fruktozę. Tuo tarpu terpės su sacharozę, laktozę, maltozę pasižymi mažesne ksantano išeiga. Ksantano išeigai tiesioginį poveikį turėjo anglies šaltinio kiekis. Didesnis anglies šaltinio kiekis skatino intensyvesnį biomasės augimą ir ksantano susidarymą. Optimali anglies šaltinio koncentracija bakterijų augimo terpėje (YM-T) buvo 2,5 %.
Tyrimų metu nustatyta, jog azoto šaltinis ir jo kiekis taip pat svarbus ksantanui išskirti. Optimali azoto šaltinio koncentracija bakterijų augimo terpėje (YM-T) buvo 0,1 %. Ištirta kad, diamonio fosfatas $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ yra tinkamesnis azoto šaltinis YM-T terpei nei mielių ekstraktas. Didesnė ksantano išeiga gauta koncentruotesniu, geriau įsisavinamu azoto šaltiniu diamonio fosfatu.
3. Iš visų tirtų organinių tirpiklių ksantanui išskirti tinkamiausias buvo acetonas. Šiuo organiniu tirpikliu nusodintas didžiausias ksantano kiekis.
4. Pagal gautus tyrimų rezultatus bei literatūros analizę sudaryta ksantano gamybos iš *Xanthomonas campestris* bakterijų aparatūrinė schema. Rekomenduojama taikyti šią schemą pramoninėje ksantano gamyboje.

Literatūros sąrašas

1. HABIBI H, KHOSRAVI-DARANI K. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2017, 10, 130–140. ISSN: 1878–8181.
2. WYATT N. B. and LIBERATORE M. W. Rheology and Viscosity Scaling of the Polyelectrolyte Xanthan Gum. *Journal of Applied Polymer Science*. 2009, 114, 4076-4084.
3. CARIGNATTO R. C. R., OLIVEIRA M. K. S, GOMES DE LIMA V. M. Et al., New Culture Medium to Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Springer: *Association of Microbiologists of India*. 2011, 51, 283–288, <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0171-9>.
4. TANAKA K., MIYAWAKI K., YAMAGUCHI A., Et al. Cell growth and P (3HB) accumulation from CO₂ of a carbon monoxide-tolerant hydrogen-oxidizing bacterium, *Ideonella* sp. O-1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011, 92, 1161–1169. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3420-2>.
5. MOSHAF S., HAMIDI – ESFAHANI Z., AZIZI M.H. Statistical Optimization of Xanthan Gum Production and Influence of Airflow Rates in Lab scale Fermentor. *Applied Food Biotechnology*. 2014, 1(1), 17-24.
6. GARCIA-OCHOA F., SANTOS V., ALCON A., Chemical structured kinetic model for xanthan production. *Enzyme and microbial technology*. 2004, 35, 284 – 292. ISSN: 0141 – 0229.
7. SOUW P., DEMAİN A.L. Role of citrate in xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Ferment Technol*. 1980, 58, 411–416. ISSN : 0385-6380.
8. XIAOYING X., MING L., JING X., BIN X., TAO S. Preparation and antioxidant activity of xanthan oligosaccharides derivatives with similar substituting degrees. *Food chemistry*. 2014, 164, 7-11. ISSN: 0308 – 8146.
9. GARC A-OCHOA F, SANTOS V., CASAS J., GÓMEZ E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnol Adv*. 2000, 18(7), 549–579. ISSN: 0734–9750.
10. JONATHAN M.J., CELLINE P., LEFEUVRE P., KOEBNIK R. Comparative genomics of a cannabis pathogen reveals insight into the evolution of pathogenicity in *Xanthomonas*. *Frontiers in Plant Science*. 2015, 6, 43. PMID: 26136759.
11. KANG Y., LI P., ZENG X., et. al. Biosynthesis, structure and antioxidant activities of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* with additional furfural. *Carbohydrate polymers*. 2019, 216, 369-375. ISBN 0144-8617.
12. POTNIS N., DOW M., VORHOLTER F.J., HE Y.Q. et al. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2019, 44, 1-32. ISSN 1574-6976.
13. SADDLER G.S., BRADBURY JF. Family I. *Xanthomonadaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2005, 2, 1–63.

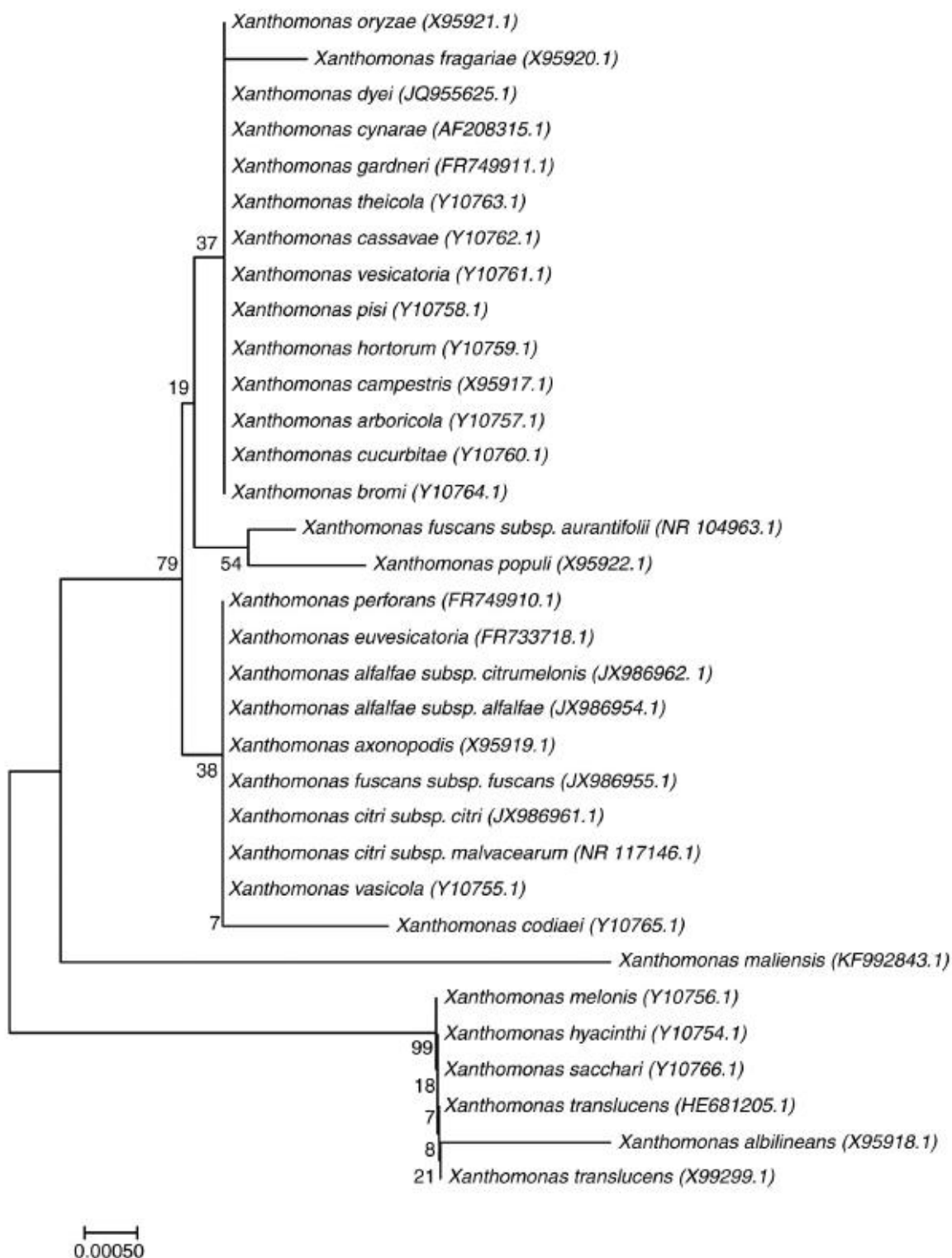
14. BOJANA Ž., VUCUROVIC D.G., DODIC S.N., et al. Process model economics of xanthan production from confectionery industry wastewaters. *Environmental Management*. 2017, 203, 999-1004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.055>.
15. BRAGAD C., VERDIER V., MARAITE H. Genetic Diversity among *Xanthomonas campestris* Strains Pathogenic for Small Grains. *Applied and Environmental microbiology*. 1995, 1020-1026. ISSN: 0099 – 2240.
16. WEBER E, KOEBNIK R. Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*. 2005, 187(17), 6175-86. DOI: 10.1128/JB.187.17.6175-6186.2005.
17. BRADBURY JF. Genus II: *Xanthomonas*. *Manual of systematic bacteriology*. 1984. 199 - 210 .
18. REHM B.H.A. Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives. 2009. Caister Academic Press, Norfolk.
19. BECKER A. Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Front Microbiol*. 2015.6, 687. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00687.
20. BUTTNER D., BONAS U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol*. 2010, 34, 107–133. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x.
21. LI B., XIE G. L., SWINGS J. First report of leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* on poinsettia in China. *Plant Pathology*. 2006, 55, 293. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2005.01304.x.
22. KALOGIANNIS S., GESTHIAMI I., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M., et al. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. *Process Biochemistry*. 2003, 39, 249-256. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00067-0.
23. JEANS A, ROGOVIN P, CADMUS MC et al. Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: procedures of culture maintenance and polysaccharide production purification and analysis. ARS-NC-51. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Peoria, Illinois, 1976.
24. CADMUS MC, LAGODA SP, BURTON KA, et al. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Can J Microbiol* 1976, 22:942-8. DOI: 10.1139/m76-136.
25. DONOT F, FONTANA A, BACCOU JC, SCHORR-GALINDO S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr Polym*. 2012, 87(2), 951–962. ISSN: 0144–8617.
26. BAZAKA K., RUSELL J., CRAVFORD R.J., et. al.. Bacterial extracellular polysaccharides. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2011, 715, 213–226. DOI: 10.1007/978-94-007-0940-9_13.
27. KUMAR A.S., MODY K., JHA B., Bacterial exopolysaccharides: a perception. *J. Basic Microbiol*. 2007, 47 (2), 103–117. DOI: 10.1002/jobm.200610203.

28. YOUNG S.L., MARTINO M., KIENZLE-STERZE C., TORRES J.A. Potentiometric titration studies on xanthan solutions. *Journal of the science of food and agriculture*. 1994, 64(1), 121-127.
29. KLAIC P.M.A., VENDRUSCOLO C.T., FURLAN L. Ion exchange as post-fermentative process enhancer of viscosity of xanthan produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*. *Food Hydrocoll.* 2016, 56, 118–126.
30. SANDFORD PA, BAIRD J. The polysaccharides. Prague: Academia Press, 1983, 470-3.
31. YUI T., OGAWA K. X-ray diffraction study of polysaccharides. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. *Marcel Dekker, New York*. 1998, 100–130.
32. MORRIS ER. Molecular origin of xanthan solution properties. *Extracellular microbial polysaccharides*. Washington, DC. 1997, 81-9.
33. MATSUDA Y., BIYAJIMAY., SATO T. Thermal denaturation, renaturation, and aggregation of a double-helical polysaccharide xanthan in aqueous solution. *Polym. J.* 2009, 41, 526–532.
34. DARIO A.F., HORTENCIA L.M.A., SIERAKOVSKI M.R., et al. The effect of calcium salts on the viscosity and adsorption behavior of xanthan. *Carbohydr. Polym.* 2011, 84, 669–676. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.12.047.
35. VIEBKE C. Order–disorder conformational transition of xanthan gum. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. *Marcel Dekker, New York*. 2005, 459–474.
36. LI R., FEKE D.L. Rheological and kinetic study of the ultrasonic degradation of xanthan gum in aqueous solutions. *Food Chem.* 2015, 172, 808–813.
37. RINAUDO M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocoll.* 2001, 15, 433–440.
38. GARCIA-OHOA F., SANTOS V.E., CASAS, J.A., GOMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnol. Adv.* 2000, 18 (7), 549–579. PII: S0734-9750(00)00050-1.
39. MURPHY W.L., MCDEVITT T.C., ENGLER A.J. Materials as stem cell regulators. *Nature materials*. 2014, 13(6). DOI: 10.1038/nmat3937.
40. CASAS JA, GARCIA-OHOA F. Viscosity of solutions of xanthan/locust bean gum mixtures. *J Sci Food Agric.* 1999, 79:25-31. DOI: 10.1002.
41. KANG Y., LI P., ZENG X., et. al. Biosynthesis, structure and antioxidant activities of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* with additional furfural. *Carbohydrate polymers*. 2019, 216, 369-375. ISBN 0144-8617.
42. SILVA L.C.C., TARGINO B.N., FURTADO M.M. et al. Xanthan Biotechnological Production and Applications. *Microbial Production of Food ingredients and Additives*. 2017, 385-416.
43. HUBLIK G. Xanthan. *Elsevier Science and Technology*. Netherlands. 2012, 221–229. ISBN: 9780080878621.

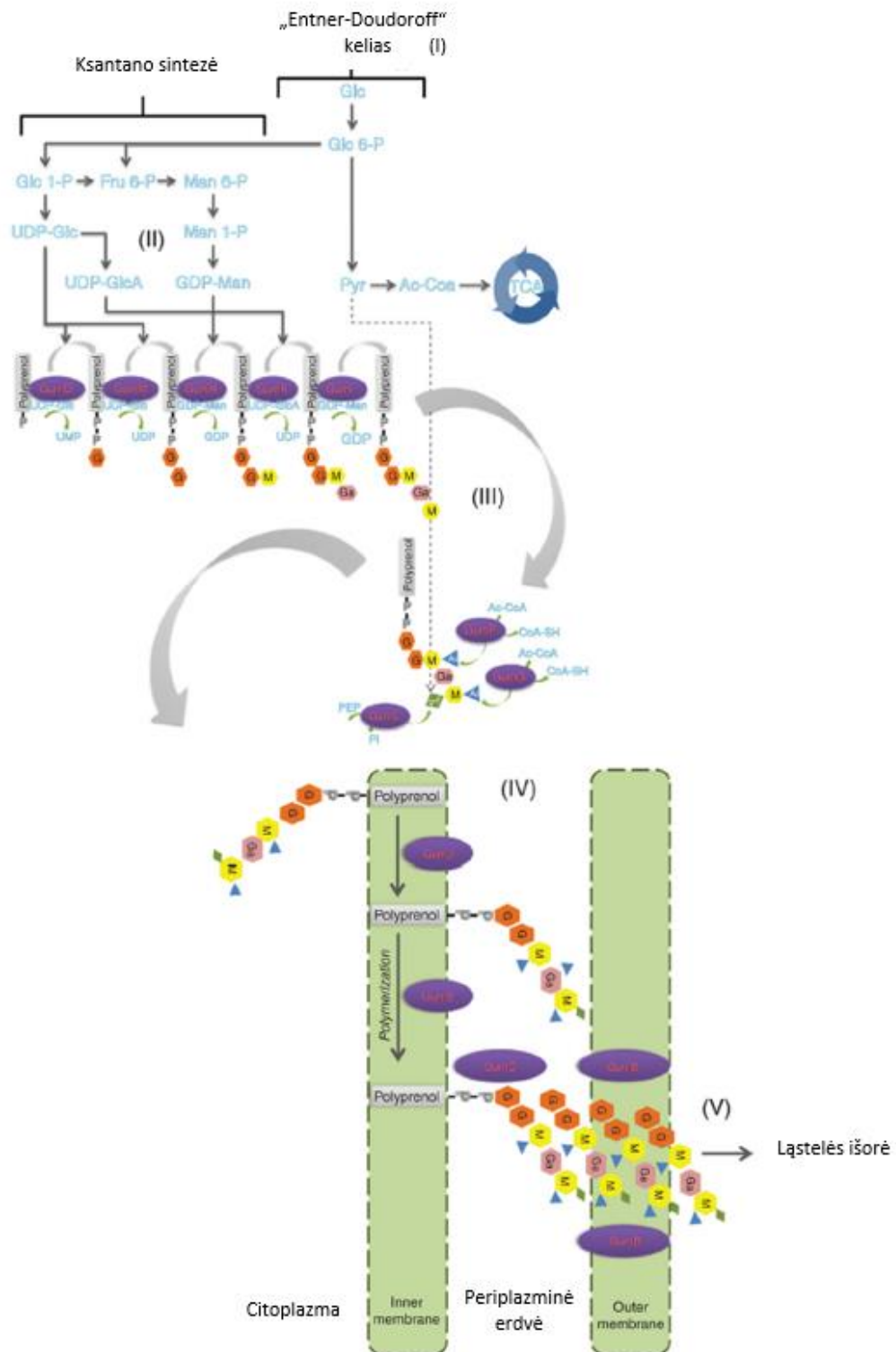
44. JACOBS M., SALINAS S.R., BIANCO M.I., IELPI L.I., Expression, purification and crystallization of the outer membrane lipoprotein GumB from *Xanthomonas campestris*. *Acta Crystallogr.* 2012, 68, 1255–1258. DOI: 10.1107/S1744309112036597.
45. SCHMID J., SIEBER V., REHM B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol.* 2015, 6, 496. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00496.
46. FREITAS F., ALVES V.D., REIS M.A.M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* 2011, 29 (8), 388–398. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.03.008.
47. PALANIRAJ A., JAYRAMAN V. Production recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of food engineering.* 2011, 106(1), 1-12. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2011.03.035.
48. ROSALMAN S., ENGLAND R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas Campestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology.* 2006, 39(2), 197-207. DOI:10.1016/j.enzmictec.2005.10.019.
49. NEJADMANSOURI M., SHAD E., RAZMJOOEI M. et al. Production of xanthan gum using immobilized *Xanthomonas campestris* cells: Effects of support type. *Biochemical engineering journal.* 2020, 157, 107554. DOI: 10.1016/j.bej.2020.107554.
50. CANDIA F. J-L., DECKWER W-D. Xanthan gum. *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation, vol. 5.* New York: Wiley, 1999, 2695-711.
51. ROY A., COMESSE S., GRISEL M., HUCKNER N., et al. Hydrophobically modified xanthan: an amphiphilic but not associative polymer. *Biomacromolecules.* 2014, 15, 1160–1170. DOI: 10.1021/bm4017034.
52. TORRESTIANA B, FUCIKOVSKY L, GALINDO E. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. *Lett Appl Microbiol.* 1990, 10(2), 81–83. ISSN: 0266–8254.
53. DONOT F., FONTANA A., BACCOU J.C. SCHORR-GALINDO S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr. Polym.* 2012, 87, 951–962. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.08.083.
54. LOPES B.M., LESSA V.L., SILVA B.M., FILHO M.A.S.C., et al. Xanthan gum: properties, production conditions, quality and economic perspective. *J. Food Nutr. Res.* 2015, 54 (3), 185–194. ISSN 1336-8672.
55. PAPAGIANNIM, PSOMAS S., BATSILAS L, PARAS S., KYRIAKIDIS D., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. *Process Biochem.* 2001, 37(1), 73–80. ISSN: 1359–5113.
56. SILVA M.F., FORNARI R.C.G., MAZUTTI M.A., et al. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *J. Food Eng.* 2009, 90 (1), 119–123. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2008.06.010.

57. BERGMAN D., FURTH G., MEYER C. Binding of bivalent cations by xanthan in aqueous solutions. *International Journal of biological macromolecules*. 2008, 43(3), 245-251. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2008.06.001.
58. PSOMAS S.K., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, KYRIAKIDIS M. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 2007, 35, 273–280. DOI:10.1016/j.bej.2007.01.036.
59. GUMUS T., SUKRU DEMIRICI A., MIRIK M., et al. Xanthan gum production of *Xanthomonas spp.* isolated from different plants. *Food Sci. Biotechnol.* 2010, 19 (1), 201–206. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0027-9>.
60. KUMAR A, RAO KM, HAN SS. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydr Polym.* 2018, 180, 128–144. ISSN: 0144–8617.
61. FARIA S., PETKOWICZ D. O., MORAIS S.A.L., et al. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. *Carbohydr. Polym.* 2011, 86 (2), 469–476. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.04.063.
62. SWORN G., Xanthan gum: functionality and application. *Practical Food Rheology: An Interpretive Approach*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. 2011.
63. SUJITHRA B., DEEPIKA S., AKSHAYA V., PONNUSAMI V. Production and optimization of xanthan gum from three-step sequential enzyme treated cassava bagasse hydrolysate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019, 21, 101294. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101294.
64. ZHOU W., HUI Y.H. *Bakery Products Science and Technology*. Wiley, West Sussex. 2014. ISBN: 978-1-119-96715-6.
65. GRISEL M., AGUNI Y., RENOU F., MALHIAC C. Impact of fine structure of galactomannans on their interactions with xanthan: two co-existing mechanisms to explain the synergy. *Food Hydrocoll.* 2015, 51, 449–458.
66. SHARMA B.R., NARESH L., DHULDHOYA N.C., et. al. Xanthan gum: a boon to food industry. *Food Promotion Chronicle*. 2006, 1 (5), 27–30.
67. TROSZYNCKA A., NAROLEVSKA O., ROBREDO S., ESTRELLA I., et al. The effect of polysaccharides on the astringency induced by phenolic compounds. *Food Qual. Prefer.* 2010, 21, 463–469. DOI:10.1016/j.foodqual.2009.12.005.
68. RAMASMY T., KANDHASAMI U.D.S., RUTTALA H., et al. Formulation and evaluation of xanthan gum based aceclofenac tablets for colon targeted drug delivery. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2011, 47 (2), 299–311. DOI: 10.1590/S1984-82502011000200011.
69. PETRI D.F.S. Xanthan gum: a versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *J. Appl. Polym. Sci.* 2015, 132 (23), 2–13. DOI:10.1002/app.42035.
70. CHELLAPANDI P. *Laboratory manual in industrial biotechnology*. Pointer Publishers. 2007, 220. ISBN: 8171324886, 9788171324880.

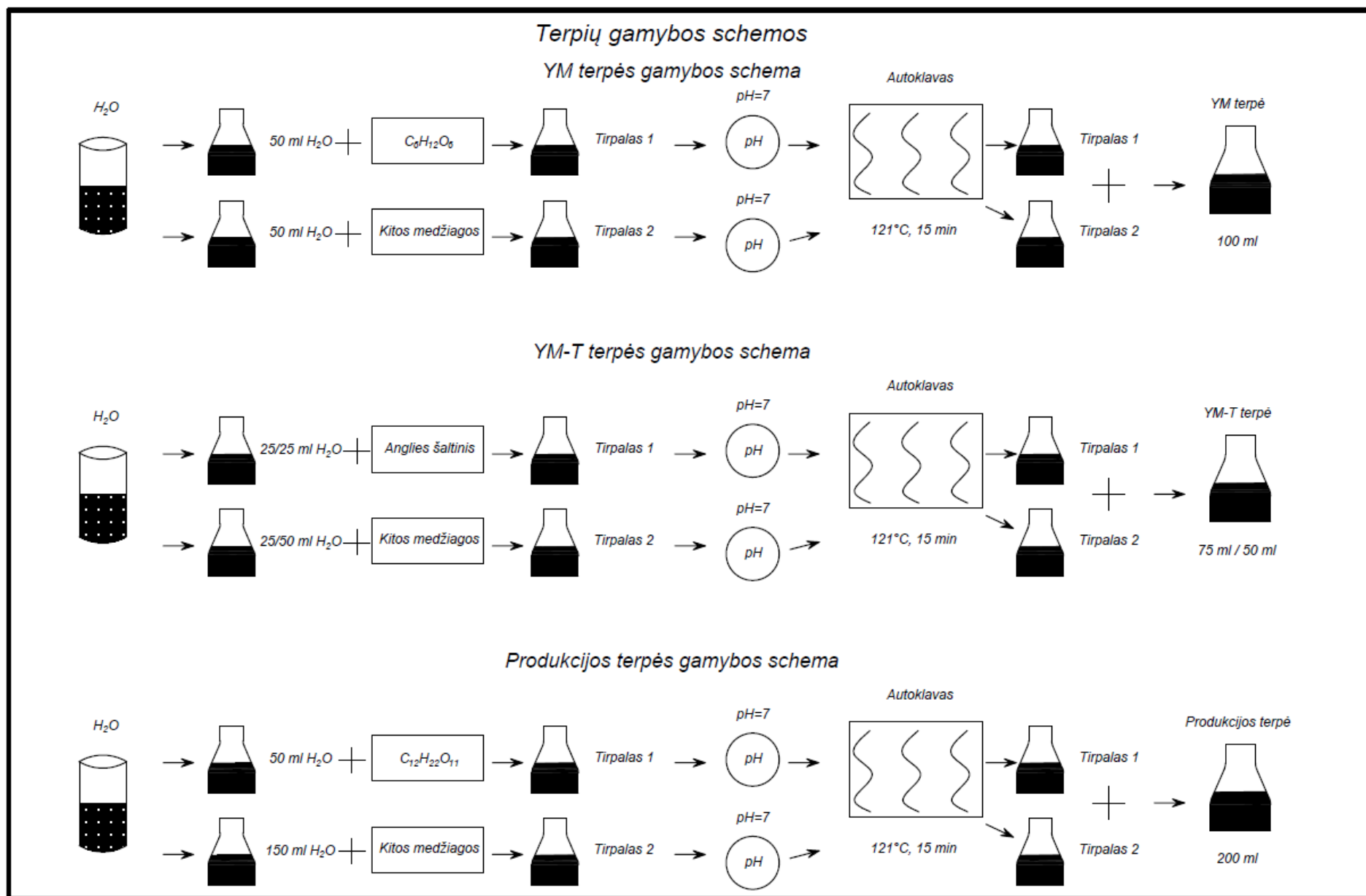
Priedai



1 priedas. Filogenetinis *Xanthomonas* rūšies medis [42].

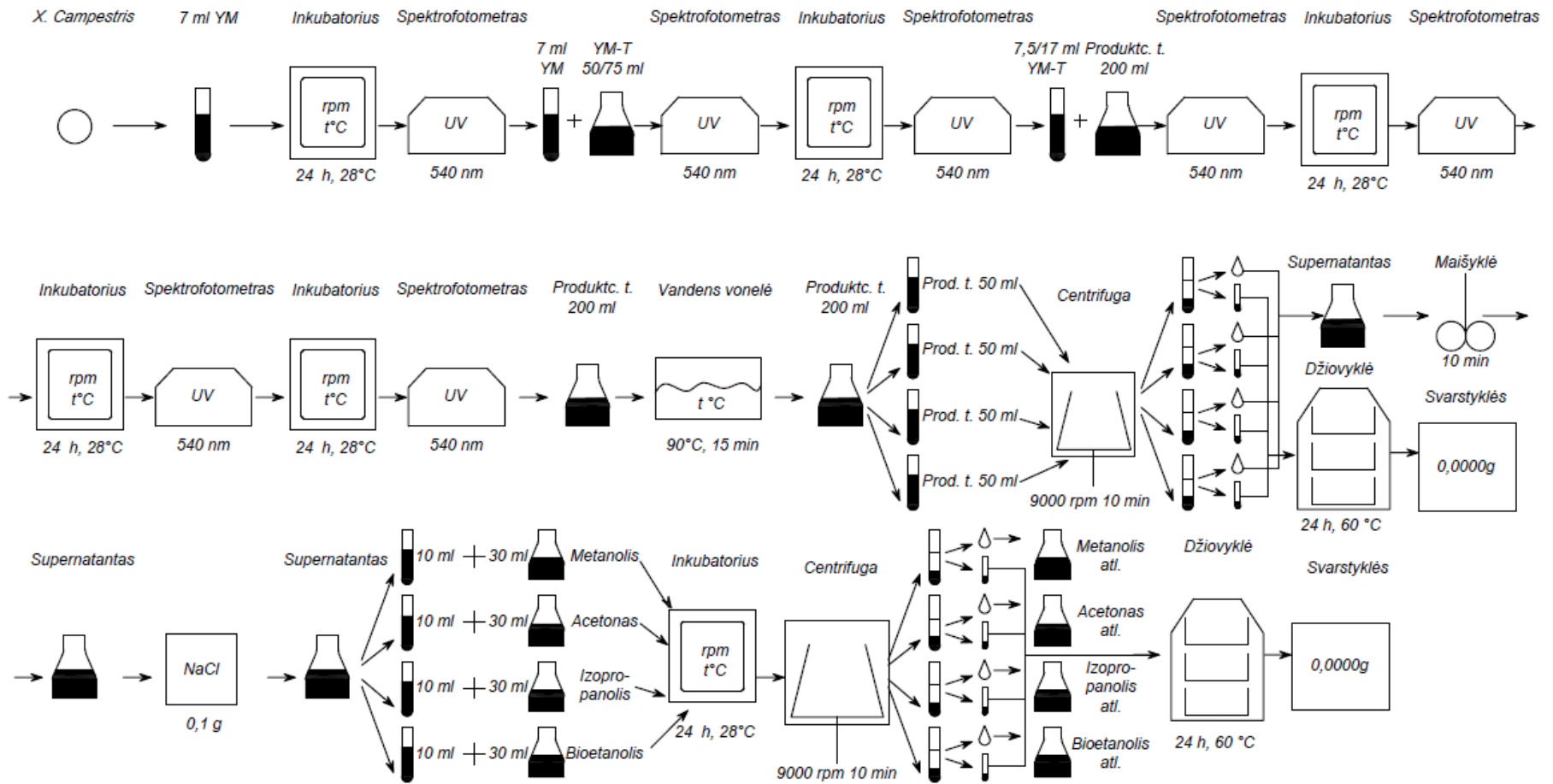


2 priedas. Ksantano biosintezės mechanizmas *Xanthomonas campestris* bakterijose. I - substrato įsisavinimas, II - gliukozės transformacija į nukleotidinius darinius, III - oligosacharidų subvienetų surinkimas (asimiliacija), IV - polimerizacija, V - ekopolisacharido pašalinimas į ląstelės išorę [42].



3 priedas. Technologinė terpių gamybos schema

Ksantano gamybos schema



4 priedas. Technolinė ksantano gamybos schema