



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Ieva Simanaitytė

**BIOPOLIMERO KSANTANO GAMYBOS IŠ *XANTHOMONAS*
CAMPESTRIS OPTIMIZAVIMO TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**BIOPOLIMERO KSANTANO GAMYBOS IŠ *XANTHOMONAS*
CAMPESTRIS OPTIMIZAVIMO TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (621J70004)

Vadovas

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Recenzentas

Dr. Kazimieras Anusevičius

Projektą atliko

Ieva Simanaitytė

KAUNAS, 2018



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Ieva Simanaitytė

(Studento vardas, pavardė)

Pramoninė biotechnologija (621J70004)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Biopolimero ksantano gamybos iš *Xanthomonas campestris* optimizavimo tyrimai“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2018-06-01

Kaunas

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

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

SANTRAUKA	6
SUMMARY	7
SANTRUMPOS	8
IŽANGA	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų charakteristikos.....	11
1.2. Ksantano charakteristikos ir sandara	11
1.3. Ksantano biosintezė	12
1.4. Pramoninė ksantano gamyba	13
1.5. Veiksniai, turintys įtakos ksantano gamybai	14
1.5.1. Periodinio ir nenutrūkstamo procesų įtaka	14
1.5.2. <i>Xanthomonas</i> kamieno įtaka.....	14
1.5.3. Anglies šaltinio įtaka	15
1.5.4. Azoto šaltinio įtaka	15
1.5.5. Temperatūros įtaka.....	15
1.5.6. pH įtaka	16
1.6. Toksiškumas	16
1.7. Ksantano panaudojimas	16
1.7.1. Maisto pramonė	16
1.7.2. Medicinos pramonė.....	17
1.7.3. Kitos pramonės šakos	19
1.8. Veiksniai, darantys poveikį ksantano savybėms	19
1.8.1. Struktūros kintamųjų poveikis	19
1.8.2. Druskų poveikis	20
1.8.3. Temperatūros poveikis.....	20
1.8.4. pH įtaka	20
1.9. Ekonomika ir perspektyvos	20
1.10. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas	21
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI	22
2.1. Tyrimų metu naudota aparatūra	22
2.2. Ksantano gamyba.....	22
2.2.1. Naudotos bakterijos	22
2.2.2. Naudotos mitybinės terpės	22
2.2.3. Bakterijų dauginimas	23
2.2.4. Fermentacija.....	24

2.2.5. Ksantano nusodinimui naudotos medžiagos	24
2.2.6. Ksantano nusodinimas	24
2.3. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimas DPPH metodu	26
2.3.1. Naudotos medžiagos ksantanu slopinant DPPH	26
2.3.2. DPPH radikalo slopinimas ksantanu	26
2.4. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimas slopinant vandenilio peroksidą	26
2.4.1. Naudotos medžiagos slopinant vandenilio peroksidą	26
2.4.2. Vandenilio peroksido slopinimas ksantanu	27
2.5. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimas pagal linolo rūgštį	27
2.5.1. Naudotos medžiagos ksantano antioksidacinių savybių tyrimui pagal linolo rūgštį ...	27
2.5.2. Tiriamojo tirpalo paruošimas	27
2.5.3. Ksantano antioksidacinių savybių nustatymas pagal linolo rūgštį keičiant ksantano koncentraciją	27
2.5.4. Ksantano antioksidacinių savybių nustatymas pagal linolo rūgštį keičiant ksantano tirpalų koncentraciją ir pH	27
2.5.6. Ksantano antioksidacinių savybių nustatymas pagal linolo rūgštį keičiant ksantano tirpalų koncentraciją ir temperatūrą	28
2.6. Ksantano oksidacinių savybių tyrimas nustatant peroksido vertę	28
2.6.1. Naudotos medžiagos tiriant ksantano oksidacines savybes	28
2.6.2. Tiriamojo tirpalo paruošimas	28
2.6.3. Ksantano oksidacinių savybių nustatymas.....	28
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	30
3.1. Ksantano gamybos iš <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų rezultatai.....	30
3.2. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimo DPPH metodu rezultatai	51
3.3. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimo pagal linolo rūgštį rezultatai.....	54
3.4. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimo slopinant vandenilio peroksidą rezultatai.....	55
3.5. Ksantano oksidacinių savybių tyrimo nustatant peroksido vertę rezultatai.....	55
4. REKOMENDACIJŲ DALIS.....	56
IŠVADOS	58
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	59

Simanaitytė, Ieva. Biopolimero ksantano gamybos iš *Xanthomonas campestris* optimizavimo tyrimai. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Technologijų mokslai, biotechnologijos.

Reikšminiai žodžiai: biopolimeras, ksantanas, *Xanthomonas campestris*, optimizavimas, antioksidacinis aktyvumas.

Kaunas, 2018. 63 p.

SANTRAUKA

Ksantanas pramonėje turi plačias pritaikymo galimybes. Didėjant ksantano paklausai, siekiama optimizuoti jo gamybos procesą. Šis biopolimeras gaminamas aerobinės fermentacijos metu iš *Xanthomonas campestris* bakterijų. Ksantano išeiga priklauso nuo bakterijų kamieno, anglies bei azoto šaltinių, pH, temperatūros, pasirinkto gamybos proceso būdo.

Šio tyrimo metu gamyba buvo optimizuota keičiant YM–T terpės mitybinių elementų sudėtį arba pridedant į terpę priedų. Nustatyta, kad didžiausia ksantano išeiga gauta, kai anglies šaltinis buvo fruktozė, azoto – peptonas iš mėsos, anglies ir azoto šaltinių derinys – laktozė bei 3 g/l mielių ekstraktas, terpės priedas – *L*-glutamo rūgštis.

Taip pat nustatyta, kad ksantanas pasižymi antioksidacinėmis savybėmis slopindamas DPPH radikalą. Antioksidacinis aktyvumas didėja laikui bėgant. Atlikti tyrimai su linolo rūgštimi antioksidaciniam ksantano aktyvumui nustatyti parodė, kad didėjant biopolimero koncentracijai aktyvumas didėja. Be to, antioksidacinėms savybėms įtakos turi pH bei temperatūra.

Simanaitytė, Ieva. Optimization Studies of Biopolymer Xanthan Production by Bacteria *Xanthomonas Campestris*. Master's thesis in Industrial Biotechnology / supervisor assoc. prof. Ilona Jonuškienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: Technological sciences, Biotechnology.

Keywords: biopolymer, xanthan, *Xanthomonas campestris*, optimization, antioxidant activity.

Kaunas, 2018. 63 pages.

SUMMARY

Xanthan has a wide application in industry. The aim is to optimize its synthesis while its demand is on the rise. This biopolymer is made during aerobic fermentation from *Xanthomonas campestris* bacteria. Xanthan yield depends on bacterial strain, carbon and nitrogen source, pH, temperature and chosen production process.

For this assay xanthan production was optimized by changing nutritional elements of YM–T medium or adding additional nutrients. The biggest xanthan yield was noticed when fructose was the source of carbon, peptone from meat – the source of nitrogen, lactose with 3 g/l yeast extract – carbon and nitrogen combination, medium supplement – *L*-glutamic acid.

Additionally, xanthan was determined to have antioxidant properties by inhibiting DPPH radical. The antioxidant activity increased over time. Assays with linoleic acid for determining antioxidant activity showed, that with the increasing of biopolymer concentration, antioxidant properties also increased. pH and temperature also had influence on antioxidant properties.

SANTRUMPOS

ADP – adenzin-5'-difosfatas;

ATP – adenzin-5'-trifosfatas;

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

GDP – guanozin-5'-trifosfatas;

YM – mitybinė terpė (10 g/l gliukozė, 5 g/l peptonas, 3 g/l mielių ekstraktas, 3 g/l salyklas);

YM–T – mitybinė terpė (12 g/l gliukozė, 2,5 g/l peptonas, 1,5 g/l mielių ekstraktas, 1,5 g/l salyklas, 1,5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 2,5 g/l K_2HPO_4 , 0,05 g/l MgSO_4);

KoA – kofermentas A;

NAD^+ – oksiduota nikotinamido adenino dinukleotido forma;

NADH_2 – redukuota nikotinamido adenino dinukleotido forma;

UDP – uridin-5'-difosfatas;

UTP – uridin-5'-trifosfatas;

X. campestris – *Xanthomonas campestris*.

IŽANGA

Pastaraisiais dešimtmečiais didelio mokslininkų susidomėjimo susilaukė natūralūs biopolimeriniai polisacharidai dėl tokių savybių, kaip biologinis suderinamumas bei skaidumas, prieinamumas, netoksiškumas, maža kaina [1]. Vienas iš jų – ksantanas, kurį gamina *Xanthomonas* rūšies bakterijos, tokios kaip *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas pelargonii*, *Xanthomonas phaseoli* bei *Xanthomonas malvacearum* aerobinės fermentacijos metu [2]. Ksantanas tirpsta šaltame bei karštame vandenyje, išlieka stabilus vandeniniuose tirpaluose ir esant įvairiems pH bei temperatūros intervalams, yra suderinamas su daugeliu metalų druskų, palaiko didelę klampą tirpaluose esant mažai jo koncentracijai [1]. Būtent dėl šių savybių ksantanas yra vienas labiausiai paplitusių biopolimerų įvairiose pramonės šakose. Jis naudojamas maisto, medicinos, kosmetikos, žemės ūkio, naftos bei kitose industrijos srityse [3].

Ksantanas buvo vienas pirmųjų mikrobiologinių biopolimerų pradėtų gaminti komerciškai [4]. Paprastai pramoninėje gamyboje yra naudojami du fermentacijos proceso būdai – periodinis ir nenutrūkstamas. Iki šiol yra atliekama daug tyrimų orientuotų į gamybos optimizavimą. Galutinė ksantano išeiga priklauso nuo bakterijos kamieno, anglies bei azoto šaltinių, pH, temperatūros, pasirinkto gamybos proceso būdo [5].

Pramonėje vykdant ksantano fermentaciją dažniausiai naudojami gliukozės ir sacharozės anglies šaltiniai. Tačiau pastaruoju metu imta ieškoti alternatyvių substratų ksantano gamybai. Tokie substratai kaip žemės ūkio atliekos ar buitinės atliekos ne tik sumažina ksantano kainą, bet ir padeda kovoti su aplinkos tarša [6].

Tyrimo tikslas – optimizuoti biopolimero ksantano gamybą iš *Xanthomonas campestris* bakterijų.

Tyrimo uždaviniai:

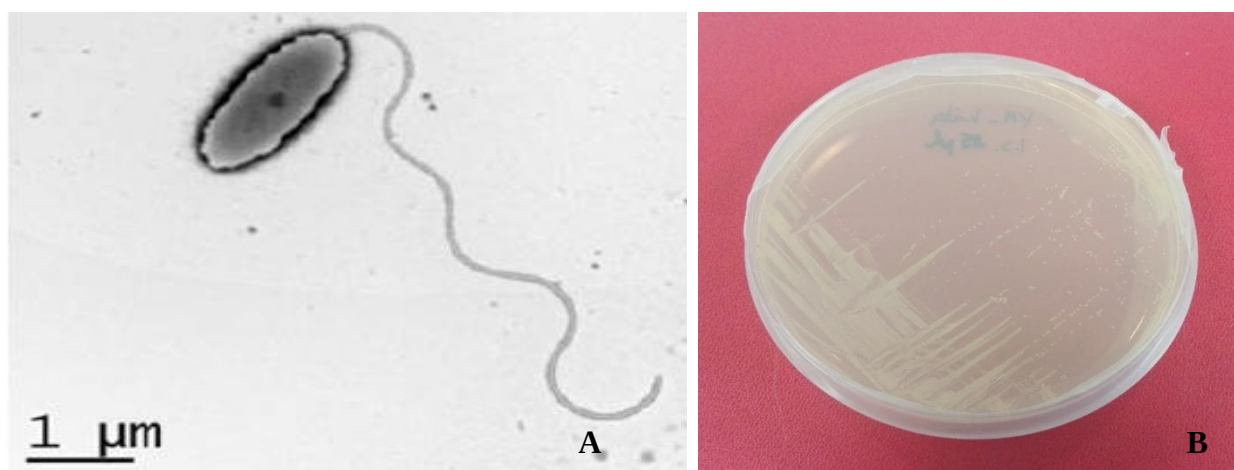
1. optimizuoti ksantano gamybą, parenkant skirtingus anglies šaltinius mitybinėje *Xanthomonas campestris* bakterijų terpėje;
2. optimizuoti ksantano gamybą, parenkant skirtingus azoto šaltinius mitybinėje *Xanthomonas campestris* bakterijų terpėje;
3. optimizuoti ksantano gamybą, parenkant skirtingus anglies ir azoto šaltinius mitybinėje *Xanthomonas campestris* bakterijų terpėje;
4. optimizuoti ksantano gamybą, parenkant mitybinės *Xanthomonas campestris* bakterijų terpės priedus;
5. įvertinti ksantano antioksidacinį aktyvumą pagal linolo rūgštį bei DPPH radikalo slopinimo metodą;

6. Iširti acetono, izopropanolio ir bioetanolio poveikį ksantano nusodinimui;
7. Sudaryti optimalias sąlygas atitinkančią ksantano gamybos aparatūrinę schemą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Xanthomonas campestris* bakterijų charakteristikos

Xanthomonas campestris bakterijos yra naudojamos ksantano gamyboje. Tai – gram-neigiamos, aerobinės, lazdelės formos bakterijos, turinčios vieną 1,7–3 μm ilgio polinį žiuželį (1.1. pav., A). Paprastai šios bakterijos būna 0,4–0,7 μm pločio ir 0,7–1,8 μm ilgio. Dažniausiai šių bakterijų kolonijos būna geltonos, lygios bei tšios (1.1. pav., B). *Xanthomonas campestris* gali būti kultivuojamos 25–35 °C temperatūroje esant neutraliam aplinkos pH [7]. Yra randami L, Sm bei Vs kamieniai: L kamienas (didelis), kuris gamina ryškiai geltonas, 4–5 mm diametro, tšias kolonijas. Šis kamienas geba pagaminti didžiausią kiekį ksantano, kurio sudėtyje yra daug piruvo rūgšties liekanų; Sm kamienas (mažas) gamina tamsiai geltonas, 2 mm diametro, tšias bakterijų kolonijas. Gaminamo ksantano išeiga yra mažesnė nei L kamieno atveju; Vs kamienas (labai mažas) gamina netšias, švelniai geltonos spalvos, iki 1 mm diametro kolonijas. Šis kamienas ksantano nesintezuoja. Dažniausiai Sm ir Vs kamieniai susiformuoja skylant L kamienui, taip atsitinka dėl to, kad kultūra pasensta [5]. Vienas didžiausių *Xanthomonas campestris* pramoninio panaudojimo trūkumų yra ksantano gamybos sumažėjimas, kai bakterijų kamieniai daug kartų inokuliuojami agarų lėkštelėse. Manoma, kad tai susiję su metabolizmo genų mutacija [8].

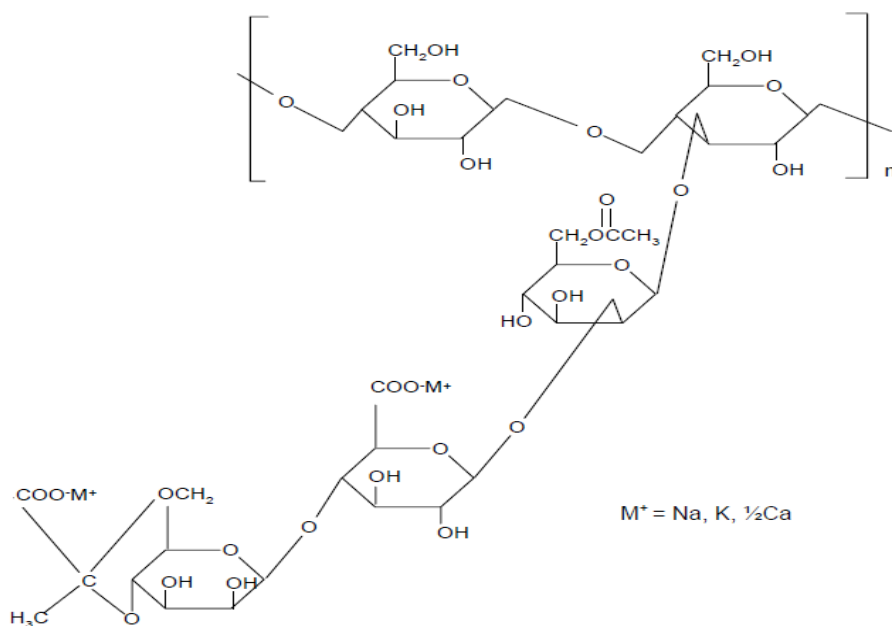


1.1. pav. *Xanthomonas campestris* bakterijos elektroninės mikroskopijos vaizdas (A) [9] ir *Xanthomonas campestris* bakterijų kolonijos, užaugusios YM terpėje (B)

1.2. Ksantano charakteristikos ir sandara

Ksantanas buvo atrastas 1950 metais Jungtinėse Amerikos Valstijose. Tai pirmas biopolimeras pradėtas gaminti pramoniniu būdu [4]. Ksantanas yra vandenyje tirpus, anijoninis egzopolisacharidas gaunamas aerobinės fermentacijos būdu iš *X. campestris* [6,7]. Jo molekulinė masė gali svyruoti nuo 500 iki 2000 kDa [10]. Ksantanas susideda iš β -D-gliukozil-, D-manozil-

, D-gliukuronil- rūgšties liekanų moliniu santykiu 2:2:1 bei kintančio kiekio O-acetil- ir piruvil- liekanų. Pagrindinės grandinės cheminė struktūra yra identiška celiuliozei. Prie pagrindinės grandinės yra trisacharidų šoninės grandinės, susidedančios iš manozės (β -1,4), gliukuroninės rūgšties (β -1,2) liekanų bei manozės, prisijungusios prie gliukozės liekanos α -1,3 ryšiu (1.2. pav.) [11]. Galutinę ksantano molekulinę masę ir struktūrą nulemia bakterijų augimo sąlygos [12].



1.2. pav. Struktūrinis ksantano vienetas. Modifikuota pagal [13]

1.3. Ksantano biosintezė

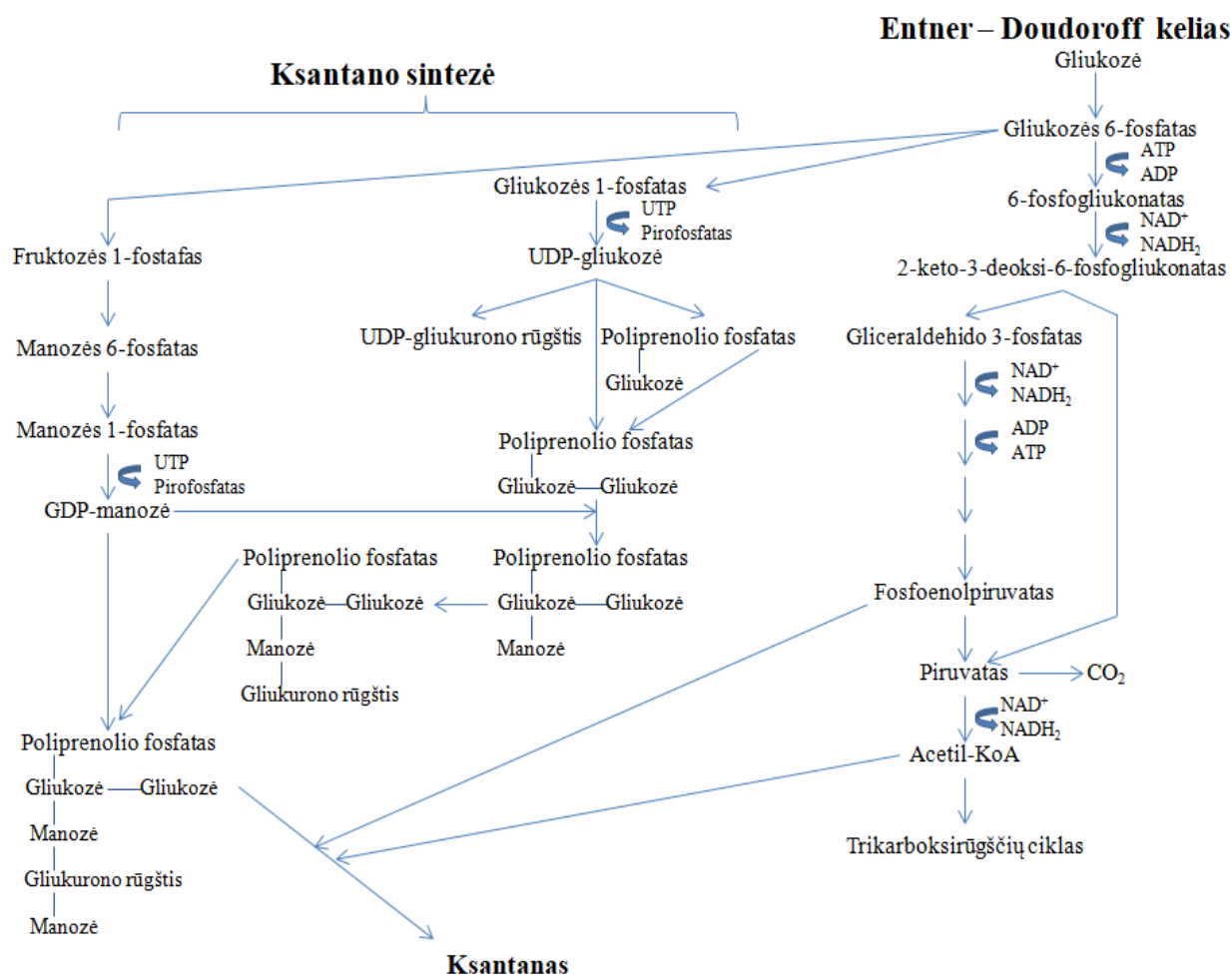
Ksantano biosintezė vyksta panašiai kaip ir kitų egzopolisacharidų sintezė gramneigiamose bakterijose. Šį procesą galima suskirstyti į tris etapus: (i) paprastų cukrų įsisavinimas ir pavertimas į nukleotidinius junginius; (ii) pentasacharidų pernaša lipidiniu nešikliu; (iii) pasikartojančių pentasacharidų vienetų polimerizacija ir jų sekrecija [14].

Biosintezė prasideda nuo angliavandenių skaidymo. Angliavandeniai gali būti įsisavinami iš aplinkos, gauti skaidant glikogeną arba sintezuojami pačių bakterijų. Entner-Doudoroff sintezės kelias ir trikarboksirūgščių ciklas yra pagrindiniai gliukozės katabolizmo mechanizmai *X. campestris* bakterijoje [11].

Ksantano monomerų sintezė prasideda nuosekliai prijungiant monosacharidus, acetil-KoA bei fosfoenolpiruvatą. Pirmajame etape gliukozės 1-fosfatas pernešamas nuo UDP-gliukozės ir prijungiamas prie lipidinio poliprenolio fosfato nešiklio. Vėliau iš eilės prijungiamos kitos monosacharidų liekanos: D-manozė ir D-gliukurono rūgštis atkeliauja atitinkamai iš GDP-manozės ir UDP-gliukurono rūgšties. O-acetilo grupės yra pernešamos nuo acetil-KoA ant vidinės manozės liekanos, o piruvatas nuo fosfoenolpiruvato ant galutinės manozės liekanos

(1.3. pav.) [11]. Visi šie etapai reikalauja specifinių substratų ir specifinių fermentų, tokių kaip polimerazės bei transferazės [10].

Pirminė sintezė vyksta citoplazmoje, o polimerizacija – periplazmoje. Paskutiniame sekrecijos etape egzopolisacharidas pereina per periplazmą bei išorinę membraną. Šiam procesui reikalinga energija, kuri gaunama iš ATP [11].



1.3. pav. Ksantano biosintezė ir gliukozės metabolizmas *Xanthomonas campestris* bakterijoje. Modifikuota pagal [15]

1.4. Pramoninė ksantano gamyba

Pirmiausia yra įsitikinama, kad pasirinktas *Xanthomonas* bakterijų kamienas buvo laikomas pagal tam tikrus metodinius nurodymus, kurie padeda išlaikyti jo savybes. Mažas kiekis kultūros perkeliamas į kietą arba skystą terpę siekiant gauti inokulianto kiekį, skirtą dideliems bioreaktoriams [5]. Fermentacija atliekama aerobinėmis sąlygomis, jos metu būtina palaikyti tam tikras sąlygas: 28–30 °C temperatūrą, neutralų pH, maišymo jėgą didesnę nei 1 $\text{kW} \cdot \text{m}^{-3}$, didelį aeracijos greitį 0,3 v/v. Fermentacijos procesas trunka 100 valandų ir apie 50 % gliukozės yra paverčiama produktu. Po fermentacijos pramoninius reikalavimus atitinkantis ksantanas išgaunamas pasterizavus bioreaktoriaus turinį tam, kad būtų inaktyvinti fermentai ir

degraduojamos ląstelės [11]. Bakterijų ląstelės paprastai pašalinamos filtruojant arba centrifuguojant. Toliau gryninimas atliekamas tirpikliais, tokiais kaip izopropanolis, acetonas ar bioetanolis, kartu pridėdant druskos. Šis etapas reikalauja didelio kiekio tirpiklio [5]. Jei ksantano nusodinimui naudojamas alkoholis, jis gali būti regeneruojamas distiliavimo kolonoje. Nusodintas ksantanas išpurškiamas į vandenį arba prieš tai suspenduojamas ir tada išpurškiamas, kur vėl pakartotinai būna nusodinamas. Praplovimas vandeniu pagerina produkto kokybę, visiškai pašalinamos kietosios dalelės, organiniai likučiai, pigmentai. Koncentruotas ksantanas vėl ištirpinamas ir plaunamas vandens bei KCl mišiniu siekiant sumažinti klampumą. Ksantanas nusodinamas ir vėl plaunamas tol, kol yra pasiekama reikiama kokybė. Galiausiai po gryninimo gautas biopolimeras nusausinamas, išdžiovinamas, susmulkinamas ir supakuojamas [11].

1.5. Veiksniai, turintys įtakos ksantano gamybai

Įtaką ksantano gamybai daro tokie veiksniai kaip bioreaktoriaus tipas ir veikimo principas (periodinis arba nenutrūkstamas), terpės sudėtis, kultūros augimo sąlygos (temperatūra, pH, ištirpusio deguonies koncentracija) [5].

1.5.1. Periodinio ir nenutrūkstamo procesų įtaka

Dauguma pramonės šakų renkasi periodinį procesą, nes šis gamybos būdas turi mažiau parametrų, kuriuos reikia kontroliuoti. Šio proceso metu gali kisti bakterijų augimo aplinka, o tai gali sukelti nepalankias sąlygas, tokias kaip toksinių produktų susidarymas, ekstremaliai aukštas pH, maistinių medžiagų stoka. Taikant nenutrūkstamą gamybos būdą augimo terpė nuolat tiekama į bioreaktorių, ji praskiedžia jau ten buvusią terpę, o perteklius pašalinamas. Todėl šiame gamybos procese ekstremalių sąlygų nesusidaro [11]. Be to, šiuo būdu susidaro 60–70 % produkto išeiga, kuri yra didesnė nei periodinio proceso atveju [12]. Tačiau vykdant fermentaciją nenutrūkstamu būdu yra sunku išlaikyti sterilumą, yra galimybė mutuoti ląstelėms, kurios ima gaminti nepagėdajamą galutinį produktą [11].

1.5.2. *Xanthomonas kamienų* įtaka

Buvo atlikti tyrimai, kurių metu *Xanthomonas* kamienų izoliatai buvo surinkti iš skirtingų šaltinių. Visi jie buvo įvertinti pagal morfologiją, galutinę ksantano koncentraciją, klampumą bei atsparumą antibiotikams. Įrodyta, kad klampa ir ksantano kiekis skiriasi tarp skirtingų *Xanthomonas* bakterijų kamienų. Tačiau reikšmingo skirtumo nepastebėta tarp kolonijos diametro, klampumo ir galutinio produkto koncentracijos. Be to, šių tyrimų metu rezultatai parodė, kad jautrumas penicilinui gali būti aukštos kokybės ksantano gamybos rodiklis [16].

1.5.3. Anglies šaltinio įtaka

Ląstelių augimui ir reprodukcijai yra būtinos maistinės medžiagos. Iš jų gaminamos membranos, reikalingi baltymai, ląstelių sienelės, chromosomos ir kiti komponentai. Keičiantis augimo terpės sudėčiai, pavyzdžiui, naudojant skirtingus substratus ar ribojant maistinių medžiagų srautus, pagrindinės ksantano grandinės struktūra išlieka nepakitusi, tačiau kinta šoninių grandinių struktūra, molekulinė masė bei išeiga. Dažniausiai naudojami anglies šaltiniai gliukozė ir sacharozė. Labai svarbu tinkama anglies šaltinio koncentracija, nes tai turi įtakos ksantano išeigai [3]. Paprastai ši koncentracija būna 2–4 % [17]. Didesnė koncentracija turi slopinantį poveikį ląstelių augimui.

1.5.4. Azoto šaltinio įtaka

Azotas yra viena iš pagrindinių maistinių medžiagų. Pramoninėje ksantano gamyboje azoto koncentracija siekia 0,05–0,1 % [17]. Nėra vienodai nuspręsta dėl azoto šaltinio kilmės. Yra teigiančių, kad geriausiai *X. campestris* auginimui tinka neorganinės kilmės azotas, pavyzdžiui, $(\text{NH})_2\text{HPO}_4$, kiti – organinės, pavyzdžiui, glutamatas. [5,18,19]. Svarbiausią vaidmenį azotas atlieka augindamas bakterijas ir gamindamas fermentus vėlesniems kataboliniais ir anaboliniais bakterinių ląstelių vyksmams. Kadangi azotas neįeina į ksantano struktūrą, jis nėra būtinas jo gamybai ir gali turėti neigiamą poveikį [2]. Todėl būtina išlaikyti tinkamą anglies ir azoto (C/N) santykį. Biomasės augimą riboja azoto koncentracija, o gamybos greitį – anglies koncentracija [6]. Augant bakterijoms rekomenduojamas mažas C/N santykis, kad būtų galima išgauti kuo didesnę bakterijų koncentraciją ir pasiekti optimalų specifinį augimo greitį. Gamybos etape C/N santykis padidinamas, nes tai padeda gauti didesnę ksantano išeigą [2].

1.5.5. Temperatūros įtaka

Ksantano gamyboje paprastai naudojama 25–34 °C temperatūra. Tačiau kultivuojant bakterijas rekomenduojama 28–30 °C temperatūra [5]. Daugelis autorių teigia, kad optimali temperatūra ksantano gamyboje yra 28 °C [7,20–22]. Yra atliktų tyrimų, rodančių, kad didžiausia ksantano išeiga gaunama, kai temperatūra yra mažinama nuo 30 iki 25 °C arba didinama nuo 30 iki 35 °C [7]. Žemesnėje nei 24 °C ksantano gamyba labai sulėtėja, lyginant su ląstelių augimo greičiu. Tai siejama su antriniu metabolizmu. Tačiau 27 °C ir aukštesnėje temperatūroje tiek ksantano gamyba, tiek ląstelių augimas vyksta panašiu tempu. Pasiekus 35 °C augimas visiškai sustoja. Tam, kad procesas būtų optimizuotas yra siūloma bakterijų kultivavimui ir ksantano gamybai skirtingos temperatūros. Be to, įtakos optimaliai temperatūrai gali turėti naudojamos terpės sudėtis [23].

1.5.6. pH įtaka

Neutralus pH yra optimalus *X. campestris* augimo rodiklis [7,21]. Ksantano gamybos metu pH reikšmė sumažėja nuo 7 iki 5. Taip atsitinka dėl ksantane esančių rūgšties grupių [22]. Gamybos metu kontroliuoti pH nebūtina, tačiau, tai galima padaryti panaudojus šarmus, tokius kaip KOH, NaOH bei (NH)₄OH [5]. Atlikti tyrimai parodė, kad pH kontrolė turėjo įtakos bakterijų augimui, bet neturėjo įtakos ksantano gamybai [24].

1.6. Toksiškumas

Kadangi ksantanas buvo pirmasis natūralus biopolimeras, pradėtas gaminti dideliais kiekiais, jo toksiškumui patikrinti buvo atlikta daugybė tyrimų. Naujausi tyrimai atlikti su gyvūnais vertinant ūminį toksiškumą. Tokių bandymų metu nepastebėta jokio toksinio poveikio organizmui, kai ksantano koncentracija siekė iki 20g/kg kūno masės. Tam buvo atlikti ilgalaikės ksantano dietos bandymai su žiurkėmis bei šunimis [25]. Be to, buvo tiriamas ksantano poveikis odai. Nustatyta, kad ksantanas neturi dirginančio poveikio triušių odai, kai jo koncentracija yra iki 1 % [26].

1.7. Ksantano panaudojimas

Ksantanas dėl savo reologinių savybių, tokių kaip didelė klampa bei pseudoplastiškumas, naudojamas naftos pramonėje, statybos produktų gamyboje optimizuojant jų savybes, tekstilės, kosmetikos bei maisto pramonėje kaip tirštiklis, emulsiklis bei stabilizatorius, taip pat medicinoje bei farmacijoje. Ksantano tirpalai išlieka stabilūs esant didesnei nei 150 g/l druskos koncentracijai, esant 90 °C temperatūrai bei pH reikšmei intervale nuo 2 iki 11, todėl jis turi tokias plačias pritaikymo galimybes [11,27].

1.7.1. Maisto pramonė

Maisto sektoriuje yra naudojamos mažos ksantano koncentracijos. Tai suteikia produktams reikiamas savybes, bet nepakeičia galutinio produkto skonio (1.1. lentelė) [11].

Ksantanas dažnai naudojamas kepiniams be gliuteno kepti. Tyrimai parodė, kad šis biopolimerinis polisacharidas padidina kepinio drėgmę ir sumažina kietumą [28]. Kepiniuose ksantanas gali pakeisti kiaušinio baltymus nepadarydamas įtakos skoniui ir tekstūrai [13]. Be to, jis yra tinkamas košeriniam bei islamo religiją atitinkančio maisto gamybai.

1969 metais ksantanas buvo pripažintas kaip maisto priedas, kurį galima naudoti kaip stabilizatorių, tirštiklį ar emulsiklį. 1980 metais jam suteiktas E415 sąrašo numeris, o 1988

metais patvirtinta, kad ksantanas yra saugus maisto priedas, perkvalifikuojant šio polisacharido leistiną paros dozę į nenurodytą [29].

1.1. lentelė. Ksantano panaudojimas maisto produktuose. Modifikuota pagal [2,3]

Maisto produktų grupė	Kiekis	Funkcija
Salotų padažai	0,1–0,5 %	Užtikrina gerą sukibimą; palaiko pastovų klampumą dideliame temperatūros diapazone
Kepiniai	0,05–0,3 %	Suriša vandenį; pagerina tekstūrą; suteikia svorio bei apimties
Gaivieji gėrimai	0,05–0,2 %	Pagerina tekstūrą; suspenduoja vaisių minkštimą
Pieno produktai	0,05–0,2 %	Slopina sinerezę; stabilizuoja emulsijas; pagerina atsparumą karščiui; pailgėja galiojimo laikas
Mėsos produktai	0,2–0,5 %	Suriša vandenį; slopina sinerezę; naudojamas vietoj riebalų norint mėsą perdirbti į mažo riebumo
Sriubos	0,05–0,5 %	Palaiko didelį klampumą ir stabilumą keičiantis temperatūrai; padeda išvengti separacijos
Šaldyti produktai	0,05–0,2 %	Pagerina stabilumą; neleidžia formuotis ledo kristalams
Šokoladas	0,3–2 %	Naudojamas kaip alternatyva kakavos sviestui; sumažina riebalų kiekį; padidina klampumą
Inkapsuliuotos maistinės medžiagos	0,5–1 %	Pagerina inkapsuliavimo efektyvumą; apsaugo nuo drėgmės

1.7.2. Medicinos pramonė

Medicinos srityje polisacharidai dažniausiai naudojami kaip medicininės biomedžiagos, priešvėžiniai ir hipoglikeminiai produktai bei taikomi osteoartrito profilaktikai ir gydymui [27].

Osteoartritui yra būdingas kremzlės dilimas ir kaulų hiperplazija. Tai sąnarių liga, kurią lydi sąnarių skausmai, sumažėjusi sąnarių judėjimo amplitudė, ilgai nei galimas judėjimo funkcijos praradimas. Todėl tai ir tapo viena svarbiausių polisacharidų pritaikymo sričių medicinoje. Skirtingi polisacharidai yra naudojami ne vien dėl bendrų savybių, bet ir dėl savito poveikio osteoartrito gydymui [30,31]. Be ksantano, osteoartrito gydymui yra naudojama hialurono rūgštis, chondroitino sulfatas, chitozanas, gliukozaminas, mažos molekulinės masės heparinas ir kiti polisacharidai [27].

Ksantanas turi gydomąjį poveikį osteoartritui dėl šių priežasčių: (i) intraartikuliarinės ksantano injekcijos sutepa sąnarį, sumažina trintį, taip apsaugoma kremzlė ir tuo pačiu skatinama savaiminė kremzlės regeneracija; (ii) šoninės ksantano grandinės neleidžia suktis pagrindinei grandinei, todėl jis yra stabilus, ilgiau išlieka sąnario ertmėje ir gali sumažinti vaistų injekcijų poreikį; (iii) ksantano struktūra sukuria bioninę aplinką chondrocitų augimui; (iiii) ksantanas ilgiau užsilaiko sąnario ertmėje, yra patvarus ir stabilus, sukuria idealias sąlygas pažeistų chondrocitų atkūrimui [27]. Be to, atliktos studijos su gyvūnais parodė, kad intraartikuliarinės ksantano injekcijos gali apsaugoti kremzlę, slopinti eksperimentiškai sukulto osteoartrito procesą, mažinti uždegimą bei skausmą, skatinti savaiminį kremzlės atsinaujinimą [32].

Šiuo metu bandoma sukurti modifikuotus jonizuojamomis grupėmis ksantano hidrogelius, kuriuos būtų galima naudoti dirbtinių raumenų, kremzlių, bioninių diskų kūrime [27]. Audinių inžinerijoje ksantanas yra vertinamas dėl savo unikalių reologinių savybių, biologinio suderinamumo, imunogeninių savybių, atsparumo temperatūrai, pseudoplastiškumo. Be to, ksantano struktūroje yra daug hidroksilo (-OH) grupių bei laisvų karboksilinių (-COO⁻) grupių, kurios gali būti funkcionalizuotos arba modifikuotos siekiant optimizuoti fizikines, chemines ar biologines savybes [33].

Farmacijos pramonėje ksantaną naudoja tiek skystos, tiek kietos agregatinės būsenos vaistų sudėtyje. Kietos būsenos preparatuose ksantanas naudojamas kaip kontroliuojamo atpalaidavimo agentas, o skystos būsenos – kaip tirštiklis, emulsijos stabilizatorius [34,35]. Be to, ksantanas naudojamas siekiant paruošti ir stabilizuoti neorganines geležies bei paladžio nanodaleles [36]. Nanodalelės yra tvirtos, mažesnės nei 200 nm dydžio ir naudojamos vaistų bei genų pernašai. Dažniausiai vaistų pernašai naudojamos aukso nanodalelės. Jos pasirenkamos dėl to, kad galima kontroliuoti jų dydį, jos pasižymi dideliu efektyvumu ir tikslingumu [37]. Natūralios gumos, tokios kaip ksantanas, stabilizuoja nanodaleles dviem mechanizmais: (i) adsorbuoja ant nanodalelių paviršiaus, taip sukuriamas erdvinis atsparumas; (ii) padidina nanodalelių suspensijos klampumą, taip sulėtinami agregavimo procesai [38]. Buvo atlikti tyrimai, kurie parodė, kad ksantanu stabilizuotos ir doksorubicino hidrochlorido įkrautos aukso dalelės pašalina šio vaisto apribojimus, tokius kaip nespecifinis toksiškumas ir atsparumas [39]. Doksorubicino hidrochloridas yra naudojamas įvairių rūšių vėžio, hematologinių piktybinių navikų bei minkštųjų audinių sarkomoms gydyti [40].

Taip pat ksantanas stabilizuoja netirpių medžiagų suspensijas, tokias kaip bario sulfato, kuris naudojamas rentgeno diagnozei, kompleksinio dekstrometorfano, naudojamo kosuliui gydyti [3].

1.7.3. Kitos pramonės šakos

Žemės ūkio pramonėje ksantanas naudojamas pagerinti fungicidų, herbicidų ir insekticidų srautus, suspenduojant aktyvius komponentus. Unikali šio polimero savybės užtikrina pesticidų patvarumą, sukibimą su pasėliais, padeda kontroliuoti purškimo tėkmę [3,11].

Kosmetikos pramonėje ksantanas naudojamas pagerinti šampūnų bei skysto muilo tekstūros ir putojimo savybes, sudėties stabilumą. Taip pat ksantanas yra puikus komponentų rišiklis dantų pastoje [3].

Naftos pramonėje ksantanas naudojamas naftos gręžime bei perdirbime, praplovime, vėliau naftotiekio valymui. Šis biopolimeras yra atsparus terminei degradacijai bei puikiai atlieka savo funkciją esant druskoms, todėl dažnai naudojamas kaip priedas įvairiuose naftos gręžinių produktuose. Dėl savo pseudoplastiškumo ksantanas užtikrina mažą klampą ten, kur šlyties jėga didelė, ir atvirkščiai, o tai padidina naftos išeigą [11,29].

Ksantanas naudojamas ir kitose specialios paskirties priemonėse. Jį renkami dėl plataus diapazono pH atsparumo ir tinkamo srauto užtikrinimo, nors jis naudojamas kaip tirštiklis. Ksantanas yra šarminių vamzdžių bei pytelų valymo priemonių, rūgštinių tirpalų, skirtų šalinti rūdis ir metalų oksidus, grafiti piešinių šalinimo priemonių, tualetų valiklių sudedamoji dalis. Taip pat ksantanas naudojamas gaminant apdailos plyteles bei dažus. Tai padeda užtikrinti medžiagų stabilumą, geresnę sukibimą su pagrindu bei išlaikyti tinkamą tekstūrą. Ksantanas suspenduoja cinko, vario ir kitų metalų priedus korozinėse dangose. Be to, polimeras naudojamas kaip stabilizatorius popieriaus ir kartono gamyboje, ypač kai planuojamas kontaktas su maistu [3].

1.8. Veiksniai, darantys poveikį ksantano savybėms

1.8.1. Struktūros kintamųjų poveikis

Ksantano tirpalų savybės gali kisti priklausomai nuo ksantano prigimties. Tai reiškia, tirpalų savybės yra susijusios su acetato ir piruvato koncentracija. Ksantano molekulės struktūroje esančių piruvo rūgšties ir acetalio pakaitų kiekis priklauso nuo bakterijų kultūrų, jų auginimo sąlygų bei gamybos proceso [41]. Didelis šių pakaitų kiekis padidina vandeninių ksantano tirpalų klampumą, manoma, kad dėl tinkamo tarpmolekulinio išsidėstymo [42]. Ksantanas, kurio struktūroje yra mažai piruvo rūgšties pakaitų, labiau tinkamas naudoti vykdant naftos perdirbimo operacijas, siekiant paruošti gaminį eksploatacijai [41].

1.8.2. Druskų poveikis

Vandenyje druskos gali sulėtinti ksantano hidrataciją. Todėl prieš įdedant druskos į tirpalą, pirmiausia reikia hidratuoti ksantaną. Hidratuotas polimeras pasižymi labai geru atsparumu druskoms. Net 200–300 g/l druskų koncentracija vandeniniame ksantano tirpale nedaro įtakos klampumui [43,44].

Kai ksantano koncentracija yra lygi arba mažesnė nei 2,5 g/l, monovalentinės druskos, tokios kaip natrio chloridas, sukelia labai nedidelį klampumo sumažėjimą. Esant didesnei ksantano koncentracijai klampa didėja pridėjus druskų. Greičiausiai taip vyksta dėl padidėjusios sąveikos tarp polimero molekulių [43,44]. Panašų poveikį klampumui turi ir divalentės, tokios kaip kalcio ar magnio, druskos. Trivalentės druskos sukelia ksantano geliaciją [41].

1.8.3. Temperatūros poveikis

Didėjant temperatūrai ksantano vandeninių tirpalų klampumas mažėja. Procesas grįžtamas, kai temperatūros intervalas yra nuo 10 iki 80 °C. Kylant temperatūrai klampumas mažėja, tačiau temperatūrai keičiantis intervale 40–60 °C, klampumas didėja. Pasiekus aukštesnę nei 60 °C temperatūrą, ksantano tirpalų klampa vėl ima mažėti. Tam įtakos turi konformaciniai molekulės pokyčiai. Šaldant, galima išgauti pirminį didelį klampumą [45]. Tam, kad terminis atsparumas būtų didesnis, prieš terminį ksantano tirpalų apdorojimą rekomenduojama įdėti numatytas druskas, tokias kaip natrio, kalio, kalcio [46].

1.8.4. pH įtaka

Dažniausiai maisto produktuose palaikomas pH nekeičia ksantano tirpalų klampumo. Pastovus klampumas yra palaikomas pH ribose nuo 1 iki 12. Aukštesniame nei 9 pH palaipsniui vyksta ksantano deacetilinimas, o žemesniame nei 3 pH, ksantanas praranda piruvo rūgšties acetilo grupes [42]. Ksantanas hidratuoja daugybėje rūgštinių tirpalų, o hidratacijos greitis padidėja, jei jis ištirpinamas vandenyje prieš pridedant rūgštį arba šarmą. Ksantanas tirpus 5 % acto rūgštyje, 5 % sieros rūgštyje, 5 % azoto rūgštyje ir 25 % fosforo rūgštyje, 5 % natrio hidrokside [13].

1.9. Ekonomika ir perspektyvos

Apskaičiuota, kad per metus yra pagaminama 30 000 tonų ksantano, o poreikis kasmet palaipsniui didėja 5–10 %. Dėl didelės gliukozės ir sacharozės substratų kainos, kuri siekia 400–600 JAV dolerių už toną, kartu išauga ir ksantano vertė. Tona ksantano įvertinta 4000–5000 JAV dolerių. Todėl imtasi ieškoti alternatyvių ksantano fermentacijai tinkančių substratų [26].

Pastaruoju metu daug tyrimų atliekama substratu panaudojant pramonines atliekas ir ne tik: cukrinių runkelių minkštimą, žemės ūkio atliekas, rūgščių hidrolizatus, nemodifikuotą krakmolą, sūrio išrūgas, cukranendrių melasą, datulių ekstraktą, buitines atliekas, vynuogių sulčių koncentratą [2]. Šios substratų alternatyvos ne tik ekonomiškai naudingos, bet kartu padeda sumažinti aplinkos taršą [9].

Net trečdalis maisto produktų tampa buitinėmis atliekomis [47]. Kinijoje dėl sparčiai augančios žmonių populiacijos bei maisto pramonės susidaro labai dideli šių atliekų kiekiai [48]. Kasdien Kinijos mieste Čengdu susidaro daugiau nei 500 tonų buitinių atliekų. Tinkamai neutilizavus atliekų, jos teršia aplinką, gali patekti į gruntinius vandenis ar užteršti atvirus vandens telkinius. Kinijoje dalis atliekų deginamos. Tačiau su išmetamosiomis dujomis į aplinką patenka kenksmingų junginių, kurie taip pat didina taršą [49,50]. Todėl buitinės atliekos pradėtos naudoti pridėtinės vertės turinčių produktų gamyboje, tokių kaip pieno rūgštis, etanolis, vandenilis, metanas [51–53]. O vienas naujausių tyrimų parodė, kad naudojant buitines atliekas kaip vienintelį substratą galima gauti ir ksantaną. Iš 500 g buitinių atliekų gauta 58,65 g ksantano [26].

Skatinant kurti ekonomiškai naudingas ir ekologiškai veiksmingas gamybos technologijas, pradėta kurti simuliaciniai procesų modeliai naudojant SuperPro Designer programinę įrangą. Vienas tokių modelių buvo sukurtas palyginti ksantano kiekį, gaunamą fermentacijos etape naudojant sintetinę mitybinę terpę ir terpę, sudarytą iš konditerijos fabrikų vandens nuotekų. Atitinkamai buvo gauta 58,442.69 kg per metus ir 49,465.64 kg per metus. Nors pirmuoju atveju gauta daugiau ksantano, teigiama, kad antrasis būdas yra ekonomiškesnis. Perkant komercinę mitybinę terpę būtų išleista daug daugiau nei tiesiog panaudojant vandens nuotekas [54].

1.10. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas

Ksantanas yra naudojamas įvairiose pramonės šakose, būtent dėl to kasmet jo gamybos apimtys didėja. Norint gauti daugiau ksantano, reikia atrinkti ir pritaikyti optimalias gamybos proceso sąlygas. Biopolimero kiekis priklauso nuo tokių veiksnių kaip pasirinktas gamybos būdas, bakterijos kamienas, naudoti anglies, azoto šaltiniai bei tirpikliai, pH, temperatūra.

Šis tyrimas buvo atliktas tam, kad būtų optimizuota ksantano gamyba. Keičiant anglies ir azoto šaltinius YM–T terpėje, pridedant į terpę priedų bei nusodinimui naudojant skirtingus tirpiklius pastebėti ksantano išeigų skirtumai. Atrinkus optimalias sąlygas gamybą galima pritaikyti pramonėje.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1. Tyrimų metu naudota aparatūra

2.1. lentelė. Naudota aparatūra

Prietaisas	Gamintojas, modelis
Autoklavas	<i>Certoclav CV-EL 10 L/ 12 L/ 18 L</i>
Centrifuga	<i>Universal 320 R</i>
Laminaras	<i>Holten LaminAir</i>
Magnetinė maišyklė	<i>Heidolph MR Hei-Tec</i>
Mėgintuvėlių maišyklė	<i>Biosan BioVortex V1</i>
pH metras	<i>Winlab data line pH-Meter</i>
Spektrofotometras	<i>Shimadzu UV-1280</i>
Svarstyklės	<i>Shimadzu ATX84</i>
Termostatas	<i>Memmert IN55</i>
Termostatinė maišyklė	<i>Biosan ES-20</i>
Vandens vonelė	<i>Biosan BWT-U</i>

2.2. Ksantano gamyba

2.2.1. Naudotos bakterijos

Tyrimui naudotos *Xanthomonas campestris* bakterijos, kurios buvo augintos Petri lėkštelėse su kieta YM terpe. Lėkštelės su bakterijomis inkubuotos termostate 27 °C temperatūroje parą laiko.

2.2.2. Naudotos mitybinės terpės

Naudotos kietos ir skystos būsenos YM terpė *Xanthomonas campestris* bakterijų auginimui. Terpės pH=7. Kietai būsenai gauti į YM terpę buvo įdėta 20 g/l agaro [55].

2.2. Lentelė. YM terpės sudėtis [55,56]

Sudedamoji dalis	Koncentracija (g/l)
Gliukozė	10
Peptonas	5
Mielų ekstraktas	3
Salyklas	3

Vėliau *X. campestris* bakterijų auginimui naudota skysta YM–T terpė. Terpės pH=7.

2.3. Lentelė. YM–T terpės sudėtis [55,56]

Sudedamoji dalis	Koncentracija (g/l)
Gliukozė	12
Peptonas	2,5
Milių ekstraktas	1,5
Salyklas	1,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,5
K ₂ HPO ₄	2,5
MgSO ₄	0,05

Ksantano fermentacijai naudota speciali produkcijos terpė. Šios terpės pH=7.

2.4. Lentelė. Produkcijos terpės sudėtis [55,56]

Sudedamoji dalis	Koncentracija (g/l)
Sacharozė	40
Citrinos rūgštis	2,1
NH ₄ NO ₃	1,14
KH ₂ PO ₄	2,86
MgCl ₂	0,5
Na ₂ SO ₄	0,08
H ₃ BO ₃	0,006
ZnO	0,006
FeCl ₃	0,02
CoCO ₃	0,02

Neutraliai terpei gauti naudota 0,01N NaOH. Visos terpės buvo autoklavuotos 15 min 20 °C temperatūroje esant 0,75–1 atm. slėgiui. Produkcijos terpėje sacharozė autoklavuota atskirai.

2.2.3. Bakterijų dauginimas

Iš pradžių į mėgintuvėlį su 7 ml YM terpės įnešta po vieną *Xanthomonas campestris* bakterijų koloniją. Mėgintuvėliai inkubuoti 12 valandų 28 °C temperatūroje, pastoviai maišant 200 aps./min greičiu. Po inkubacijos matuota šviesos sugertis prie 600 nm bangos ilgio, stebėtas bakterijų prieaugis [55].

Tada ši YM terpė su bakterijomis buvo perkelta į kolbą su 43 ml YM–T terpės. Mėginys maišytas 200 aps./min greičiu 6 valandas 28 °C temperatūroje. Pasibaigus inkubacijai matuota šviesos sugertis prie 540 nm bangos ilgio. Pagal tai apskaičiuota biomasės koncentracija prieš fermentaciją. Biomasės koncentracija apskaičiuota pagal (1) formulę [55]:

$$c_{\beta}=0,2845 \cdot OD_{540 \text{ nm}} \quad (1);$$

c_{β} – biomasės koncentracija, g/l;

$OD_{540 \text{ nm}}$ – optinis tankis.

2.2.4. Fermentacija

50–60 % YM–T terpės su *X. campestris* bakterijomis buvo perkelta į kolbą su 200 ml produkcijos terpės. Mėginys inkuobuotas 44–74 valandas 28 °C temperatūroje maišant 200 aps./min greičiu [55].

Kas 24 valandas matuota šviesos sugertis prie 540 nm bangos ilgio, stebėtas bakterijų prieaugis [55].

2.2.5. Ksantano nusodinimui naudotos medžiagos

- 5 g/l koncentracijos NaCl druska;
- Tirpikliais buvo pasirinkta naudoti acetoną, izopropanolį bei bioetanolį.

2.2.6. Ksantano nusodinimas

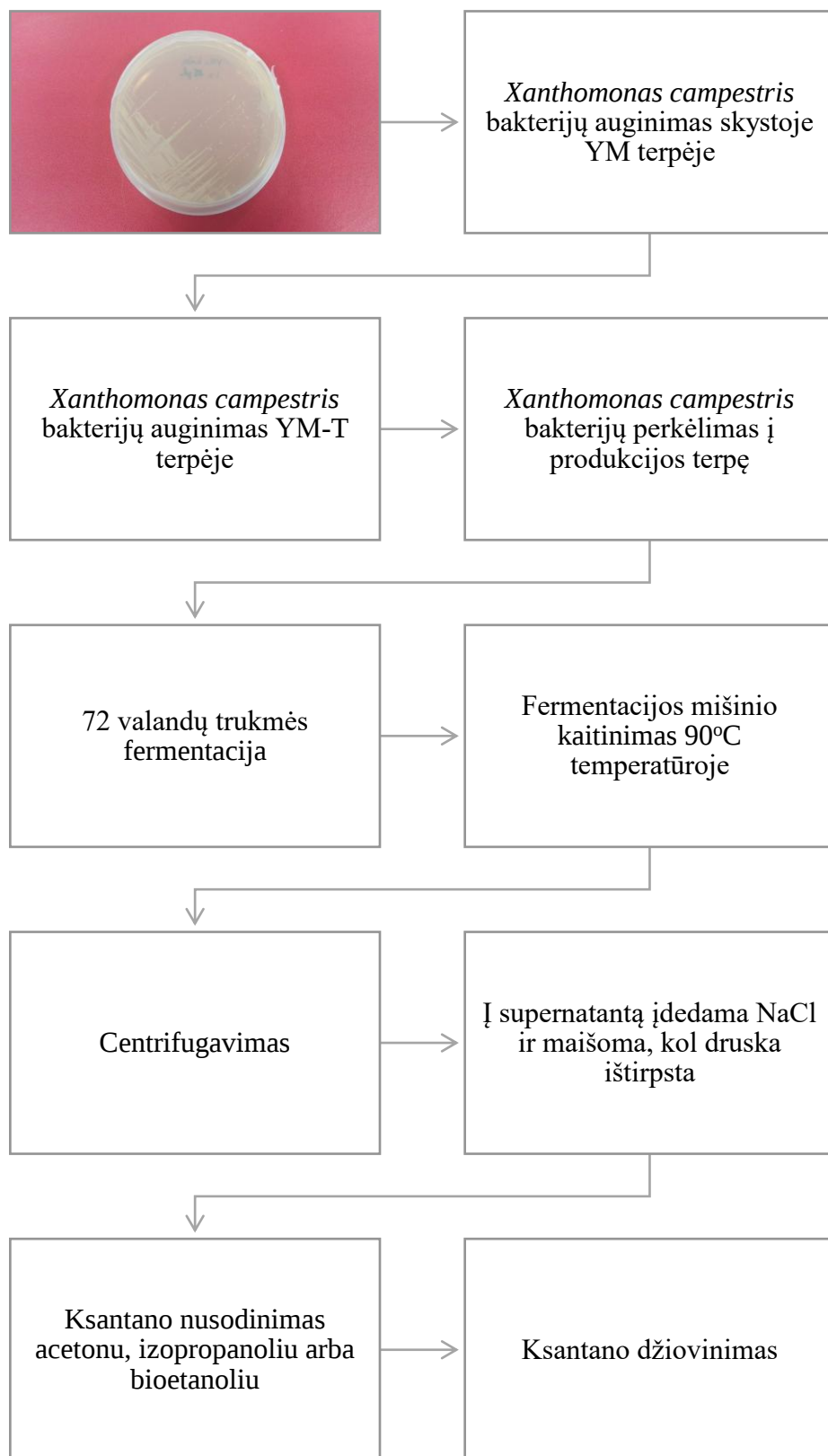
Pasibaigus fermentacijai produkcijos terpė buvo kaitinta 15 min 90 °C temperatūroje tam, kad padidėtų ksantano tirpumas, sumažėtų terpės klampa, degraduotų *X. campestris* ląstelės ir fermentai, galintys paveikti biopolimerą [55].

Po kaitinimo terpė centrifuguota 10 min 9000 aps./min greičiu [55]. Gautas supernatantas nupiltas į atskirą kolbą, o nuosėdos įdėtos į termostatą ir džiovintos 60 °C temperatūroje parą laiko. Išdžiovinta biomasė kiekybiškai įvertinta.

Į supernatantą įdėta NaCl ir maišyta 10 min arba kol druska visiškai ištirpo [55].

Paskutiniame nusodinimo etape 10 ml supernatanto praskiesta iki 40 ml atitinkamais tirpikliais. Visais atvejais buvo išlaikytas supernatanto ir tirpiklio santykis 1:3. Mėginiai buvo gerai sumaišyti ir palikti keletui valandų. Vėliau mėginiai centrifuguoti 10 min 9000 aps./min greičiu tam, kad nusėstų ksantanai [55]. Tirpiklių atliekos išpiltos, o ksantano nuosėdos įdėtos džiovintis į termostatą 60 °C temperatūroje parą laiko

Išdžiovintas ksantanas buvo kiekybiškai įvertintas, susmulkintas ir panaudotas tolimesniems tyrimams.



2.1. pav. Ksantano gamybos schema.

2.3. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimas DPPH metodu

2.3.1. Naudotos medžiagos ksantanu slopinant DPPH

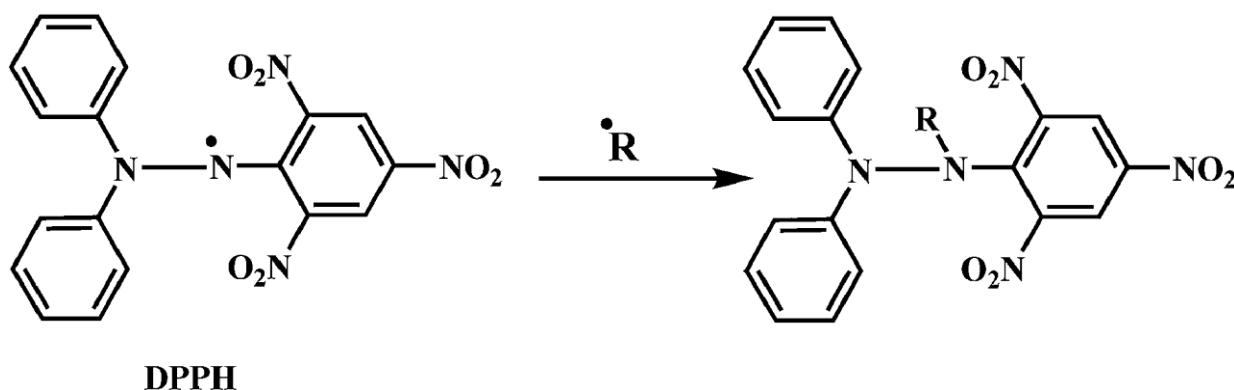
- 0,128 g/l koncentracijos metanolinis DPPH tirpalas;
- 0,2 g/l koncentracijos vandeniniai ksantano tirpalai.

2.3.2. DPPH radikalo slopinimas ksantanu

2 ml vandeninio ksantano tirpalo buvo sumaišyta su 1 ml metanoliniu DPPH tirpalu. Absorbcijos pokyčiai matuoti spektrofotometru prie 515 nm bangos ilgio po 10 min, 60 min ir 240 min. Palyginamasis tirpalas buvo vandens ir metanolinio DPPH tirpalo mišinys. DPPH slopinimas apskaičiuotas pagal (2) formulę [57]:

$$\text{slopinimas, \%} = \frac{A(\text{palyginamasis}) - A(\text{tiriamasis})}{A(\text{palyginamasis})} \cdot 100\% \quad (2);$$

A – šviesos sugertis.



2.2. pav. Radikalo DPPH redukcijos reakcija su antioksidantu

2.4. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimas slopinant vandenilio peroksida

2.4.1. Naudotos medžiagos slopinant vandenilio peroksida

- 1 g/l koncentracijos 1-butanoliniai ksantano tirpalai;
- Fosfatinis buferis, pH=7,4;
- 10 mmol koncentracijos vandenilio peroksido tirpalas, ruoštas pasigamintame fosfatiniame buferyje.

2.4.2. Vandenilio peroksido slopinimas ksantanu

2 ml 1-butanolinio ksantano tirpalo buvo sumaišyta su 1,2 ml vandenilio peroksido tirpalu. Mišinys palaikytas 30 min. Vandenilio peroksido suardymas stebėtas matuojant absorbcijos pokyčius spektrofotometru prie 230 nm bangos ilgio. Palyginamasis tirpalas buvo vandenilio peroksido tirpalas buferyje. Vandenilio peroksido slopinimas apskaičiuotas pagal DPPH slopinimui apskaičiuoti taikytą (2) formulę.

2.5. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimas pagal linolo rūgštį

2.5.1. Naudotos medžiagos ksantano antioksidacinių savybių tyrimui pagal linolo rūgštį

- Linolo rūgštis;
- 0,1M fosfatinis buferis, pH=7;
- Detergentas Tween 20;
- Ksantanas;
- 1N HCl;
- 1N NaOH.

2.5.2. Tiriamojo tirpalo paruošimas

1 ml linolo rūgšties ištirpiname 10 ml etanolio. 3,13 ml paruošto linolo rūgšties tirpalo buvo sumaišyta su 3,13 ml fosfatinio buferio bei įlašinta lašas detergento Tween 20. Į gautą emulsiją įdėta atitinkamas kiekis ksantano. Buvo paruošti 0,2 g/l, 0,4 g/l, 0,6 g/l koncentracijų ksantano tirpalai pasigamintoje emulsijoje. Tirpalai inkubuoti 20 valandų 50 °C temperatūroje [57].

2.5.3. Ksantano antioksidacinių savybių nustatymas pagal linolo rūgštį keičiant ksantano koncentraciją

Po inkubacijos buvo matuota ksantano tirpalų pasigamintoje emulsijoje šviesos sugertis prie 234 nm bangos ilgio [57].

2.5.4. Ksantano antioksidacinių savybių nustatymas pagal linolo rūgštį keičiant ksantano tirpalų koncentraciją ir pH

Po inkubacijos naudojant HCl ir NaOH buvo pakeistas ksantano tirpalų pasigamintoje emulsijoje pH. Tirpalų šviesos sugertis matuota prie 234 nm bangos ilgio, kai pH=3; 5; 7; 9; 11 [57].

2.5.6. Ksantano antioksidacinių savybių nustatymas pagal linolo rūgštį keičiant ksantano tirpalų koncentraciją ir temperatūrą

Po inkubacijos vandens vonelėje buvo pakeista ksantano tirpalų pasigamintoje emulsijoje temperatūra. Tirpalų šviesos sugertis matuota prie 234 nm bangos ilgio, kai temperatūra buvo 30 °C, 40 °C, 50 °C, 70 °C, 90 °C [57].

2.6. Ksantano oksidacinių savybių tyrimas nustatant peroksido vertę

2.6.1. Naudotos medžiagos tiriant ksantano oksidacines savybes

- Saulėgrąžų aliejus;
- 0,1M fosfatinis buferis, pH=7;
- Detergentas Tween 20;
- Ksantanas;
- Acto rūgštis;
- Chloroformas;
- Sotus KI tirpalas;
- 0,1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- 1 % krakmolo tirpalas.

2.6.2. Tiriamojo tirpalo paruošimas

10 g saulėgrąžų aliejaus buvo sumaišyta su 22,3 ml fosfatinio buferio bei 0,6 ml detergento Tween 20. Į gautą emulsiją įdėtas atitinkamas kiekis ksantano. Paruošti 0,2 g/l ir 0,4 g/l, koncentracijų ksantano tirpalai pasigamintoje emulsijoje. Tirpalai laikyti tamsoje 50 valandų 60 °C temperatūroje. Po inkubacijos aliejus atskirtas centrifuguojant 5 min 9000 aps./min greičiu [57].

2.6.3. Ksantano oksidacinių savybių nustatymas

5 ml tiriamojo tirpalo sumaišyta su 18 ml acto rūgšties ir 12 ml chloroformo. Įpilta 0,5 ml sotaus KI tirpalo, gautas mišinys maišytas lygiai vieną minutę. Iš kart po to įpilta 30 ml distiliuoto vandens ir maišyta tol, kol jodas išsiskiria iš chloroformo sluoksnio. Įlašinus 1 ml krakmolo tirpalo, susidarė melsvos spalvos tirpalas. Gautas tirpalas titruotas $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, kol spalva išnyko. Palyginamasis tirpalas buvo ruošiamas be ksantano. Oksidacijos procesas įvertintas apskaičiavus peroksido vertę pagal (3) formulę [57]:

$$\text{Peroksido vertė, } \frac{\text{miliekvivalentai}}{\text{kg}} = \frac{(A(\text{tiriamasis}) - A(\text{palyginamasis})) \cdot N(\text{natrio tiosulfatas}) \cdot 1000}{m(\text{tiriamasis})} \quad (3);$$

A – šviesos sugertis;

N – normalinė koncentracija;

m – masė, kg.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Ksantano gamybos iš *Xanthomonas campestris* bakterijų rezultatai

Optimizuojant ksantano gamybą buvo atlikta 18 skirtingų bandymų keičiant YM–T terpės sudėtį. Bandymai suskirstyti į keturias grupes: pagal anglies šaltinį (I–VI variantai), azoto šaltinį (VII–X variantai), anglies ir azoto šaltinį (XI–XV variantai) bei priedą, naudotą YM–T terpėje (XVI–XVIII variantai).

I variantas

YM–T terpės sudėtyje anglies šaltiniu naudota 12 g/l koncentracijos gliukozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,424$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,792$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,792 = 0,51$ g/l. YM–T terpę su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,542 = 0,44$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,2097 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.1. lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, $\lambda=540$
0	0,230
23,5	0,632
46,6	1,750
72	1,542

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.2. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0468	4,7
Izopropanolis	0,0202	2,02
Bioetanolis	0,0189	1,89

II variantas

Antrame variante buvo pakeistas anglies šaltinis YM–T terpėje. Naudota 12 g/l koncentracijos sacharozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,775$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,683$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,683 = 0,48$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,751 = 0,5$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,305 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.3. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, λ_{540nm}
0	0,161
21,9	1,182
44	1,328
72	1,751

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.4. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0401	4,01
Izopropanolis	0,0274	2,74
Bioetanolis	0,0103	1,03

III variantas

Anglies šaltinis YM–T terpėje pakeistas 12 g/l koncentracijos laktoze. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,784$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,592$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,592 = 0,45$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,397 = 0,4$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,1729 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.5. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, $\lambda_{540\text{nm}}$
0	0,224
22	1,413
44,3	1,397

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.6. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0543	5,17
Izopropanolis	0,0371	3,71
Bioetanolis	0,0036	0,36

IV variantas

YM–T terpės sudėtyje anglies šaltiniu naudota 12 g/l koncentracijos fruktozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,333$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,772$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,772 = 0,5$ g/l. YM–T terpę su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,915 = 0,55$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,2142 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.7. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, $\lambda_{540\text{nm}}$
0	0,364
21,3	1,378
47,1	1,734
70,2	1,807
74,1	1,915

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.8. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0708	7,08
Izopropanolis	0,0361	3,61
Bioetanolis	0,021	2,1

V variantas

YM–T terpės sudėtyje anglies šaltiniu naudota 12 g/l koncentracijos manozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,270$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,604$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,604 = 0,46$ g/l. YM–T terpę su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,660 = 0,47$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,2266 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.9. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, λ_{540nm}
0	0,236
21,3	1,466
47,1	1,788
70,2	1,660

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.10. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0588	5,88
Izopropanolis	0,0325	3,25
Bioetanolis	0,0198	1,98

VI variantas

YM–T terpės sudėtyje anglies šaltiniu naudota 12 g/l koncentracijos ksilozę. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,458$. Perkėlus YM terpę su

bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,605$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,605 = 0,46$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,236 = 0,35$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,2242 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

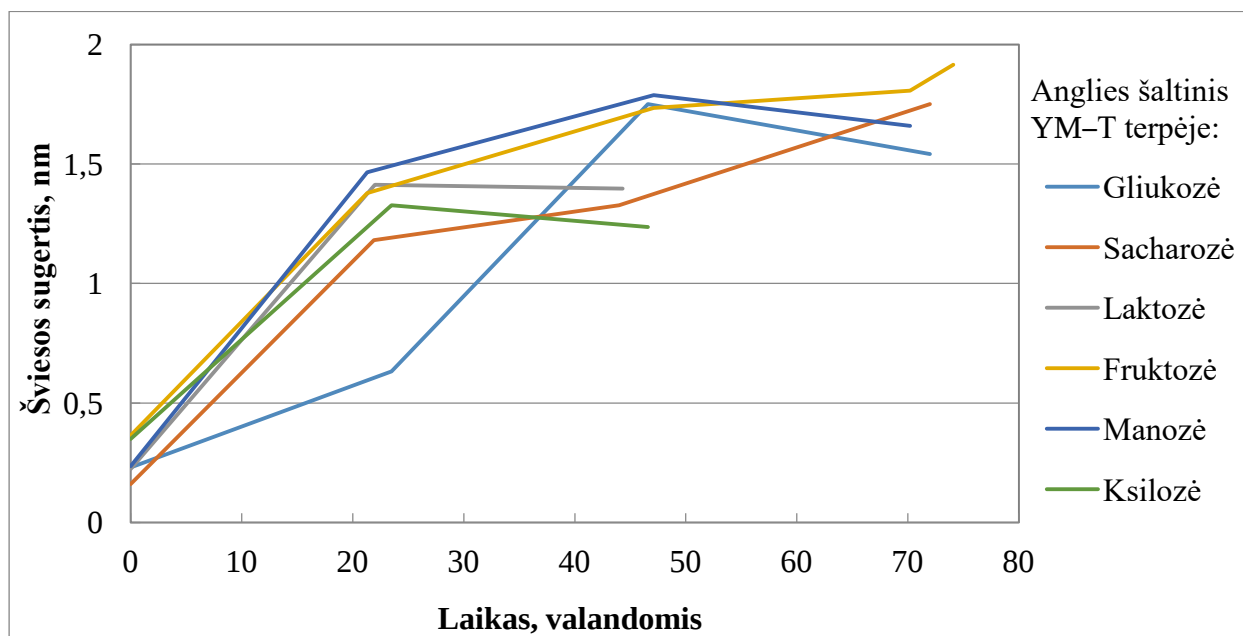
3.11. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, λ_{540nm}
0	0,350
23,5	1,328
46,6	1,236

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

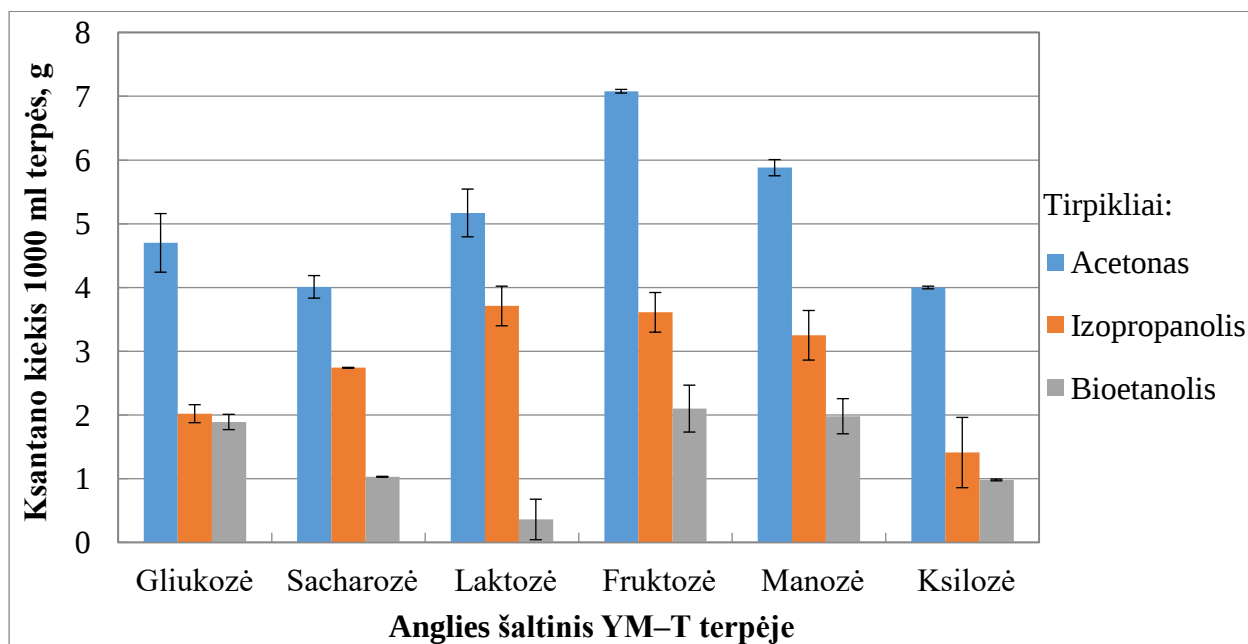
3.12. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,04	4
Izopropanolis	0,0141	1,41
Bioetanolis	0,0098	0,98



3.1. pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko ir anglies šaltinio YM–T terpėje

Lyginant *Xanthomonas campestris* bakterijų augimo priklausomybę nuo laiko esant skirtingiems anglies šaltiniams (3.1. pav.), didžiausias bakterijų augimas pastebėtas YM–T terpėje naudojant fruktozę. Galutinė biomasės koncentracija po fermentacijos buvo 0,55 g/l. Panašius rezultatus parodė ir sacharozės anglies šaltinis. Naudojant gliukozės bei manozės anglies šaltinius, bakterijų prieaugis pradėjo mažėti po 46–47 valandų. Mažiausias bakterijų prieaugis buvo naudojant laktozės ir ksilozės anglies šaltinius. Bakterijų koncentracijai ėmus mažėti, inkubacija nutraukta po 44–46 valandų. Mažiausia biomasės koncentracija po fermentacijos buvo 0,35 g/l naudojant ksilozės anglies šaltinį YM–T terpėje.



3.2. pav. Ksantano kiekio priklausomybė nuo anglies šaltinio YM–T terpėje ir išsodinimui naudoto tirpiklio

Atlikti tyrimai parodė, kad nuo pasirinkto anglies šaltinio YM–T terpėje ir skirtingų tirpiklių priklauso galutinė ksantano išeiga (3.2. pav.). Geriausią rezultatą parodė fruktozės anglies šaltinis, kuomet ksantanas buvo nusodintas acetonu. Šiuo atveju gauta 7,08 g ksantano. Visais atvejais didžiausi kiekiai ksantano gauti, jį nusodinus acetonu. Statistiškai reikšmingo skirtumo nepastebėta tarp ksantano kiekio, nusodinto panaudojus gliukozės ir laktozės anglies šaltinius, atitinkamai gauta 4,7 g ir 5,17 g. Mažiausiai ksantano nusodinta acetonu iš sacharozės ir ksilozės, kurių rezultatai beveik identiški, atitinkamai 4,01 g ir 4 g. Panaudojus izopropanolį kaip tirpiklį pastebėti kiek mažesni nusodinto ksantano kiekiai lyginant su acetonu. Didžiausias izopropanoliu gautas ksantano kiekis buvo anglies šaltiniu pasirinkus laktozę, fruktozę bei manozę, atitinkamai 3,71 g, 3,61 g, 3,25 g. Mažiausias – ksilozę, šiuo atveju ksantano nusodinta 1,41 g. Nusodinus bioetanolium didžiausia ksantano išeiga buvo naudojant gliukozės, fruktozės bei manozės anglies šaltinius YM–T terpėje. Pastebėta, kad šie rezultatai naudojant bioetanolį

statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo duomenų, gautų nusodinant izopropanoliu YM–T terpėje panaudojus anglies šaltinius gliukozę arba ksilozę. Rezultatai parodė, kad ksantano gamybai mažiausiai tinkantis anglies šaltinis buvo laktozė, kai biopolimeras nusodintas bioetanoliu. Gautas ksantano kiekis buvo 0,36 g.

VII variantas

Pakeistas azoto šaltinis 2,5 g/l koncentracijos peptonu iš kazeino. Anglies šaltinis naudotas 12 g/l koncentracijos gliukozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,170$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,106$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_p = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,106 = 0,31$ g/l. YM–T terpę su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_p = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 2,131 = 0,61$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,3697 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.13. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, λ_{540nm}
0	0,124
22,1	1,538
44,5	1,841
72,4	2,131

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.14. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,057	5,7
Izopropanolis	0,0347	3,47
Bioetanolis	0,0089	0,89

VIII variantas

Pakeistas azoto šaltinis 2,5 g/l koncentracijos peptonu iš mėsos. Anglies šaltinis naudotas 12 g/l koncentracijos gliukozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,159$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,194$.

Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,194 = 0,34$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkeliame į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,940 = 0,55$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,2724 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.15. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, λ_{540nm}
0	0,119
22,1	1,385
44,5	1,689
72,4	1,940

Po fermentacijos ksantanas nusodinamas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.16. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0617	6,17
Izopropanolis	0,0517	5,17
Bioetanolis	0,0247	2,47

IX variantas

Pakeistas azoto šaltinis 2,5 g/l koncentracijos peptonu iš sojos. Anglies šaltinis naudotas 12 g/l koncentracijos gliukozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,303$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,207$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,207 = 0,34$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,904 = 0,54$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,2611 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.17. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, $\lambda_{540\text{nm}}$
0	0,229
24,2	1,461
47,9	1,779
72,1	1,904

Po fermentacijos ksantanas nusodinamas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.18. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0486	4,86
Izopropanolis	0,0460	4,6
Bioetanolis	0,0171	1,71

X variantas

Pakeistas azoto šaltinis 2,5 g/l koncentracijos triptonu. Anglies šaltinis naudotas 12 g/l koncentracijos gliukozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,302$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,276$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,276 = 0,36$ g/l. YM–T terpę su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,696 = 0,48$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,2683 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

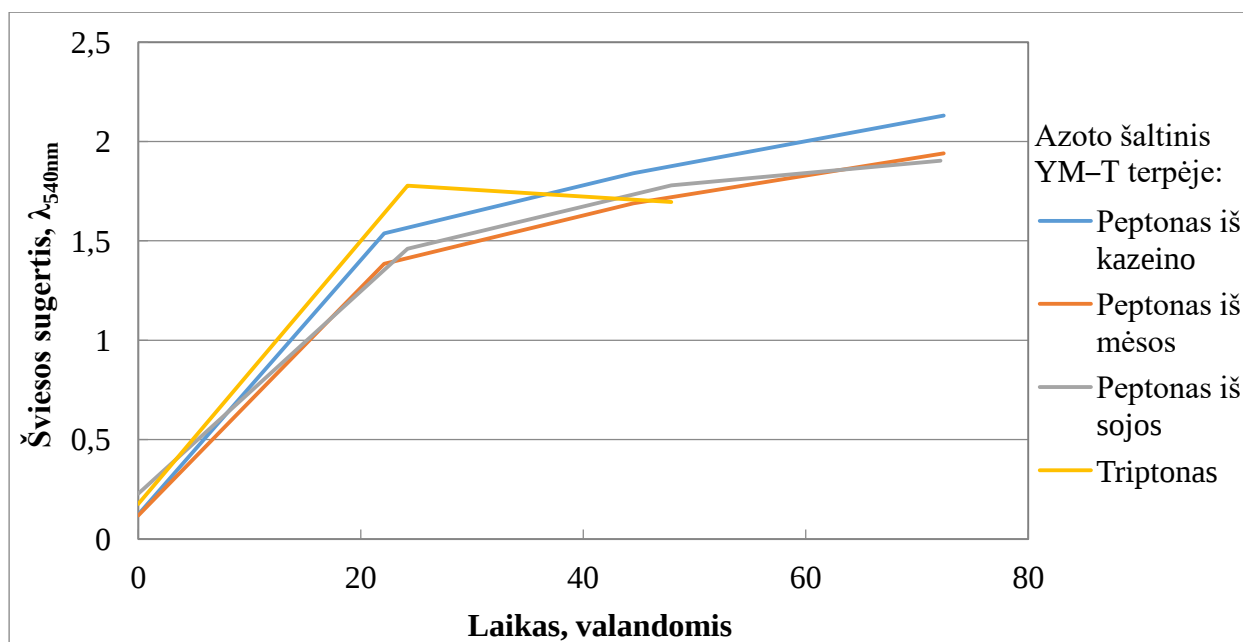
3.19. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, $\lambda_{540\text{nm}}$
0	0,176
24,2	1,777
47,9	1,696

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

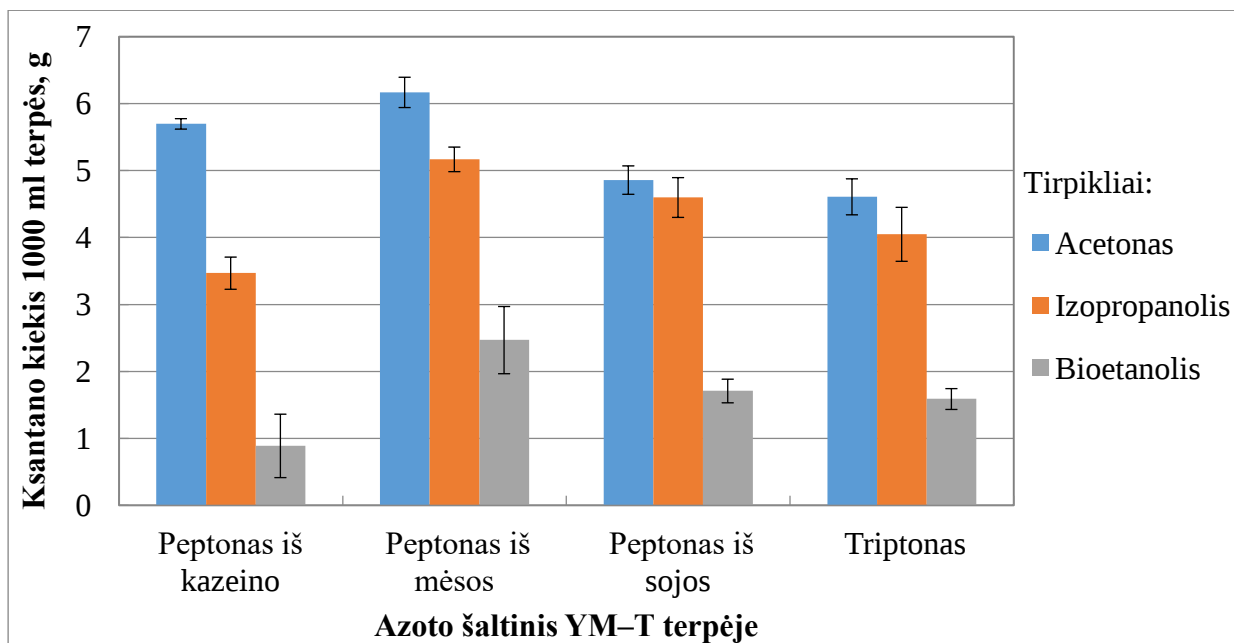
3.20. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0461	4,61
Izopropanolis	0,0405	4,05
Bioetanolis	0,0159	1,59



3.3. pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko ir azoto šaltinio YM–T terpėje

Keičiant azoto šaltinius YM–T terpėje, didžiausias *Xanthomonas campestris* bakterijų bakterijų augimas pastebėtas naudojant peptoną iš kazeino, gauta biomasės koncentracija po fermentacijos buvo 0,61 g/l. Terpės sudėtyje azoto šaltinius pakeitus peptonu, gautu iš mėsos ir kitu atveju – peptonu, gautu iš sojos, bakterijų augimas buvo panašus. Po fermentacijos biomasės koncentracija buvo 0,55 g/l ir 0,54 g/l, atitinkamai. Mažiausias augimas pastebėtas, kai panaudotas triptono azoto šaltinis. Fermentacija sustabdyta po 48 valandų, nes biomasė pradėjo mažėti. Gauta biomasės koncentracija – 0,48 g/l (3.3. pav.).



3.4. pav. Ksantano kiekio priklausomybė nuo azoto šaltinio YM–T terpėje ir išsodinimui naudoto tirpiklio

Geriausius ksantano išeigos rezultatus parodė peptonas, išskirtas iš mėsos (3.4. pav.). Acetonu nusodinto ksantano kiekis panaudojus šį azoto šaltinį buvo 6,17 g. Reikšmingo skirtumo nepastebėta tarp acetonu nusodinto ksantano kiekio YM–T terpėje azoto šaltinį pakeitus į peptoną iš sojos bei triptoną, atitinkamai gauta 4,86 g ir 4,61 g biopolimero. Iš šių azoto šaltinių izopropanoliu nusodintas panašus ksantano kiekis, panaudojus peptoną iš sojos gauta 4,6 g galutinio produkto, panaudojus triptoną – 4,05 g. Didžiausia ksantano išeiga nusodinant izopropanoliu buvo 5,17 g, panaudojus peptoną iš mėsos. Pastebėta išimtis, kai galutinio produkto kiekis nusodintas izopropanoliu buvo didesnis už kiekį, gautą nusodinus ksantaną acetonu, o azoto šaltiniais panaudojus peptoną iš sojos bei triptoną. Keičiant azoto šaltinius YM–T terpėje pastebėta, kad mažiausiai ksantano nusodinta bioetanoliu. Pats mažiausias kiekis, t.y. 0,89 g, gautas iš kazeino peptono. Didžiausia biopolimero išeiga gauta nusodinant bioetanoliu buvo iš mėsos peptono.

XI variantas

YM–T terpėje padidinta azoto šaltinio koncentracija. Naudota 3 g/l koncentracijos mielių ekstraktas. Anglies šaltinis naudotas 12 g/l koncentracijos gliukozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,749$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,745$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,745 = 0,5$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,036 = 0,29$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,1471 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.21. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, $\lambda_{540\text{nm}}$
0	0,066
22,3	1,050
50,3	1,065
71,5	1,036

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.22. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0475	4,75
Izopropanolis	0,0193	1,93
Bioetanolis	0,0059	0,59

XII variantas

Pakeistas anglies šaltinis 12 g/l koncentracijos sacharoze. Naudota 3 g/l koncentracijos mielių ekstraktas. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,692$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,739$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,739 = 0,49$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,660 = 0,47$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,1471 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.23. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, $\lambda_{540\text{nm}}$
0	0,416
22,3	0,941
50,3	1,393
71,5	1,660

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.24. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0438	4,38
Izopropanolis	0,041	4,1
Bioetanolis	0,0185	1,85

XIII variantas

Pakeistas anglies šaltinis 12 g/l koncentracijos laktoze. Naudota 3 g/l koncentracijos mielių ekstraktas. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,705$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,776$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,776 = 0,51$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,097 = 0,31$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,2257 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.25. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, λ_{540nm}
0	0,429
22,3	1,049
50,3	1,259
71,5	1,097

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.26. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0487	4,87
Izopropanolis	0,0333	3,33
Bioetanolis	0,0206	2,06

XIV variantas

Pakeistas anglies šaltinis 12 g/l koncentracijos fruktoze bei azoto šaltinis 2,5 g/l koncentracijos peptonu iš mėsos. Naudotas pakeistas 1,5 g/l koncentracijos mėsos ekstraktas.

YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,348$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis buvo $OD_{540} = 1,039$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,039 = 0,3$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,759 = 0,5$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,2211 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.27. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, λ_{540nm}
0	0,191
23,3	1,931
48,1	1,759

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.28. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0445	4,45
Izopropanolis	0,0357	3,57
Bioetanolis	0,0093	0,93

XV variantas

Pakeistas anglies šaltinis 12 g/l koncentracijos fruktoze bei azoto šaltinis 2,5 g/l koncentracijos peptonu iš mėsos. Naudotas 1,5 g/l koncentracijos mielių ekstraktas. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,396$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 0,955$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 0,955 = 0,27$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,701 = 0,48$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,2047 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

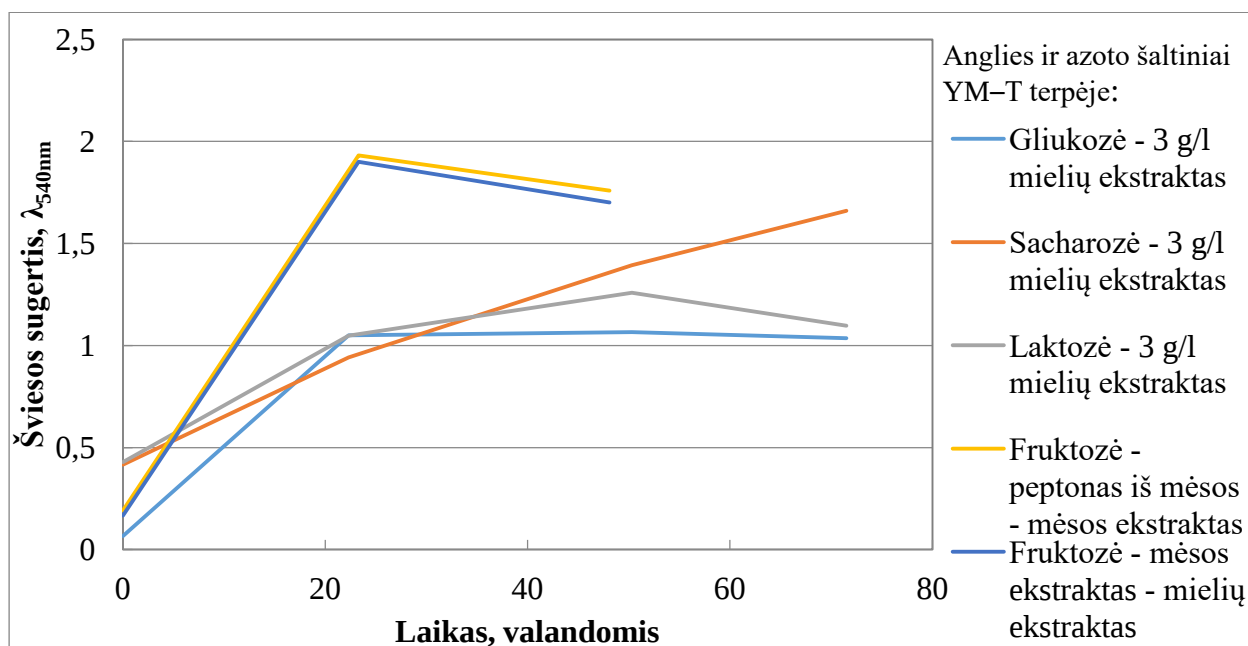
3.29. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, $\lambda_{540\text{nm}}$
0	0,166
23,3	1,901
48,1	1,701

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.30. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

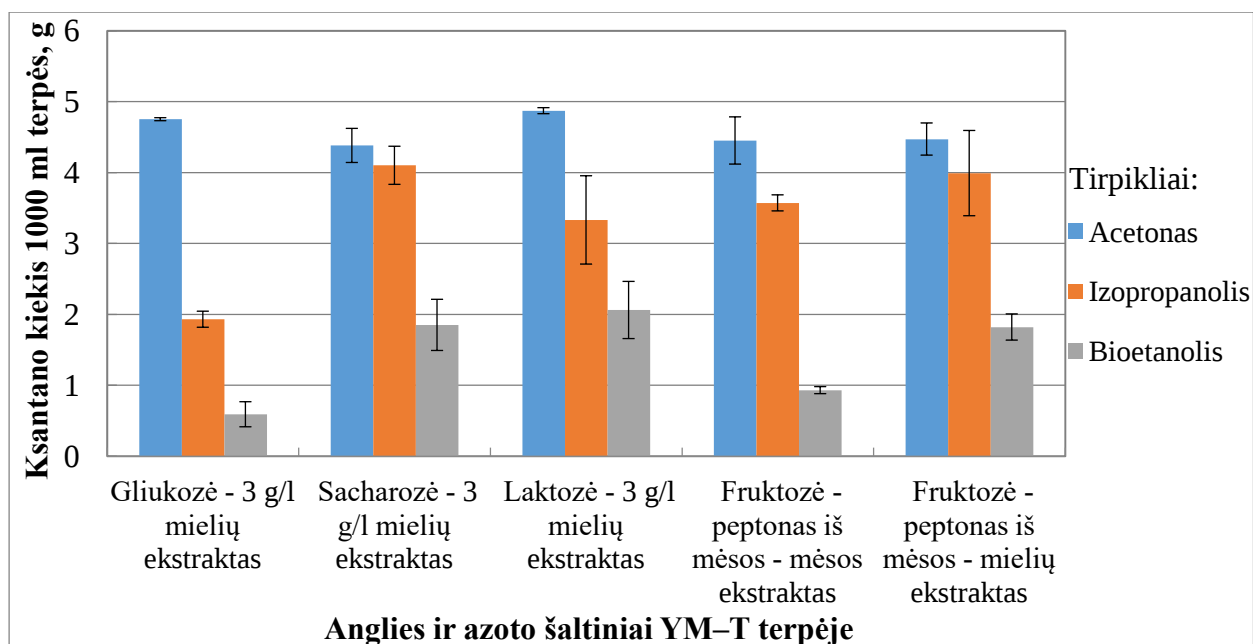
Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0447	4,47
Izopropanolis	0,0399	3,99
Bioetanolis	0,0182	1,82



3.5. pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko ir anglies bei azoto šaltinių YM-T terpėje

Atlikus tyrimus panaši bakterijų augimo nuo laiko priklausomybė pastebėta (3.5. pav.), kai YM-T terpėje buvo naudota fruktozės anglies šaltinis kartu su peptonu, gautu iš mėsos, ir vienu atveju pakeitus mielių ekstraktą mėsos ekstraktu. Naudojant mėsos ekstraktą po fermentacijos gautos biomasės koncentracija buvo 0,5 g/l, o naudojant mielių ekstraktą – 0,48 g/l. Fermentacija nutraukta po 48 valandų, nes bakterijų kiekis mažėjo. Nepaisant to, abiejais šiais atvejais gautos

didžiausios biomasės koncentracijos. Visos fermentacijos metu bakterijų kiekis didėjo tolygiai terpėje anglies šaltiniu panaudojus sacharozę ir padidinus azoto koncentraciją. Gauta biomasės koncentracija – 0,47 g/l. Anglies šaltiniu pasirinkus laktozę ir padidinus mielių ekstrakto koncentraciją, bakterijų kiekio mažėjimas pastebėtas po 50 valandų, gauta biomasės koncentracija po fermentacijos buvo 0,31 g/l. Mažiausiai bakterijų užaugo terpėje panaudojus gliukozę bei padidinus mielių ekstrakto koncentraciją. Biomasės kiekis po fermentacijos buvo 0,29 g/l.



3.6. pav. Ksantano kiekio priklausomybė nuo anglies bei azoto šaltinių YM–T terpėje ir išsodinimui naudoto tirpiklio

Gauti duomenys parodė, kad pakeitus pagrindinius mitybos elementus YM–T terpėje, daugiausiai ksantano (4,87 g) gauta, kai anglies šaltinis buvo laktozė, mielių koncentracija padidinta nuo 1,5 g/l iki 3 g/l, o nusodinimui naudotas acetonas (3.6. pav.). Mažiausiai ksantano nusodinta acetonu buvo iš terpės su sacharozę bei padidinta mielių koncentracija, fruktoze su peptonu iš mėsos ir mėsos ekstraktu, fruktoze su peptonu iš mėsos ir mielių ekstraktu, atitinkamai gauta 4,38 g, 4,45 g, 4,47 g. Šie rezultatai statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo daugiausiai izopropanoliu nusodinto ksantano kiekio panaudojus sacharozę su padidinta mielių koncentracija bei fruktozę su mėsos peptonu ir mielių ekstraktu, atitinkamai 4,1 g ir 3,99 g. Mažiausia izopropanoliu nusodinta biopolimero išeiga (1,93 g) panaudojus YM–T terpėje gliukozę ir padidinus mielių koncentraciją iki 3 g/l, reikšmingai nesiskyrė nuo produkto išeigų, gautų nusodinant bioetanoliu, o šaltiniais pasirinkus sacharozę ir laktozę bei padidinus mielių koncentraciją, taip pat fruktozę su mėsos peptonu bei mielių ekstraktu, atitinkamai 1,85 g, 2,06 g, 1,82 g. Atsižvelgiant į visų šių variantų rezultatus, mažiausiai galutinio produkto nusodinta

bioetanoliu iš terpės, kurioje anglies šaltiniu naudota gliukozė ir padidinta azoto šaltinio koncentracija nuo 1,5 g/l iki 3 g/l. Šiuo atveju gauta 0,59 g ksantano.

XVI variantas

Naudota įprasta YM–T terpės sudėtis, papildomai pridėta 2 g/l koncentracijos amonio citrato. Terpės sudėtyje kaip anglies šaltinis naudota 12 g/l koncentracijos gliukozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,852$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,431$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,431 = 0,41$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkeliame į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,725 = 0,49$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,2257 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.31. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, λ_{540nm}
0	0,264
26,3	1,584
48,1	1,877
70,5	1,725

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.32. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0437	4,37
Izopropanolis	0,039	3,9
Bioetanolis	0,0161	1,61

XVII variantas

Naudota įprasta YM–T terpės sudėtis, papildomai pridėta 1,5 g/l koncentracijos L-glutamato rūgšties. Terpės sudėtyje kaip anglies šaltinis naudota 12 g/l koncentracijos gliukozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,795$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,517$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,517 = 0,43$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis

perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija – $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,822 = 0,52$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,3005 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą.

3.33. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, λ_{540nm}
0	0,296
26,3	1,964
48,1	1,822

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

3.34. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,059	5,9
Izopropanolis	0,0415	4,15
Bioetanolis	0,0208	2,08

XVIII variantas

Naudota įprasta YM–T terpės sudėtis, papildomai pridėta 2 g/l koncentracijos amonio citrato ir 1,5 g/l koncentracijos L-glutamato rūgšties. Terpės sudėtyje kaip anglies šaltinis naudota 12 g/l koncentracijos gliukozė. YM terpėje užaugintų *Xanthomonas campestris* bakterijų sugertis buvo $OD_{600} = 0,612$. Perkėlus YM terpę su bakterijomis į YM–T terpę, sugertis – $OD_{540} = 1,389$. Prieš fermentaciją biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 1,389 = 0,4$ g/l. YM–T terpė su bakterijomis perkelta į produkcijos terpę. Po fermentacijos biomasės koncentracija buvo $c_{\beta} = 0,2845 \cdot OD_{540} = 0,2845 \cdot 2,39 = 0,7$ g/l. Sausos biomasės gautas kiekis – 0,4079 g. Vykstant fermentacijai šviesos sugertis matuota kas keletą valandų, taip stebint bakterijų augimo procesą

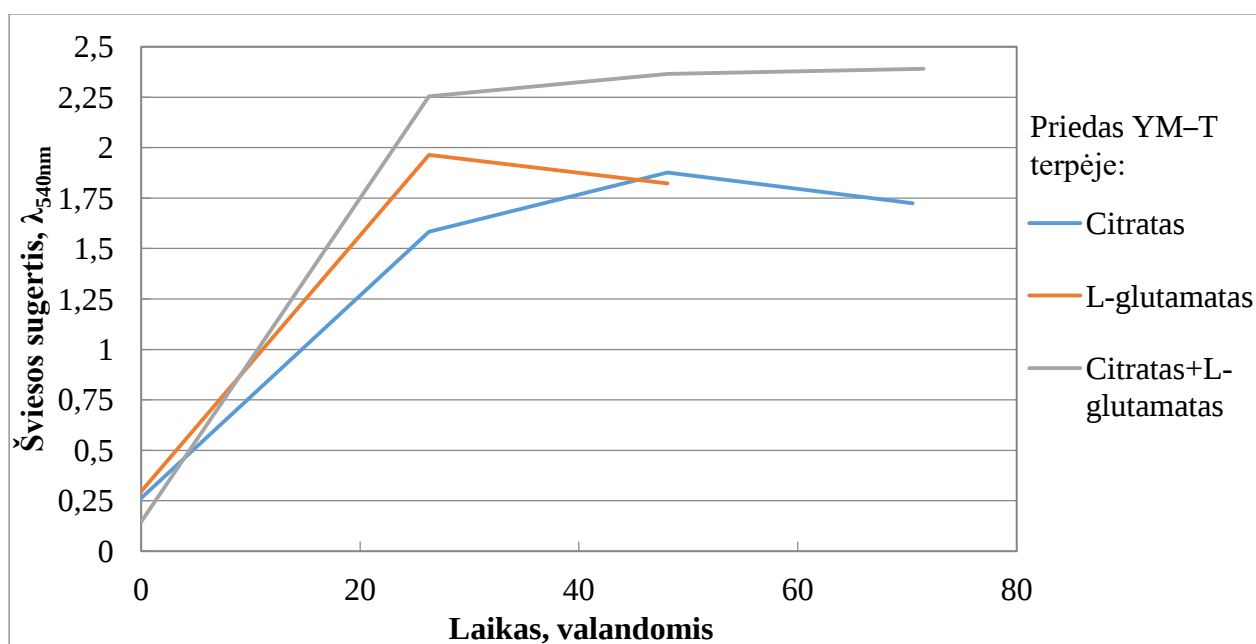
3.35. Lentelė. *Xanthomonas campestris* bakterijų šviesos sugertis fermentacijos metu

Laikas (val)	Šviesos sugertis, λ_{540nm}
0	0,146
26,3	2,254
48,1	2,365
71,5	2,39

Po fermentacijos ksantanas nusodintas iš produkcijos terpės acetono, izopropanolio bei bioetanolio tirpikliais, santykiu 1:3 atitinkamai.

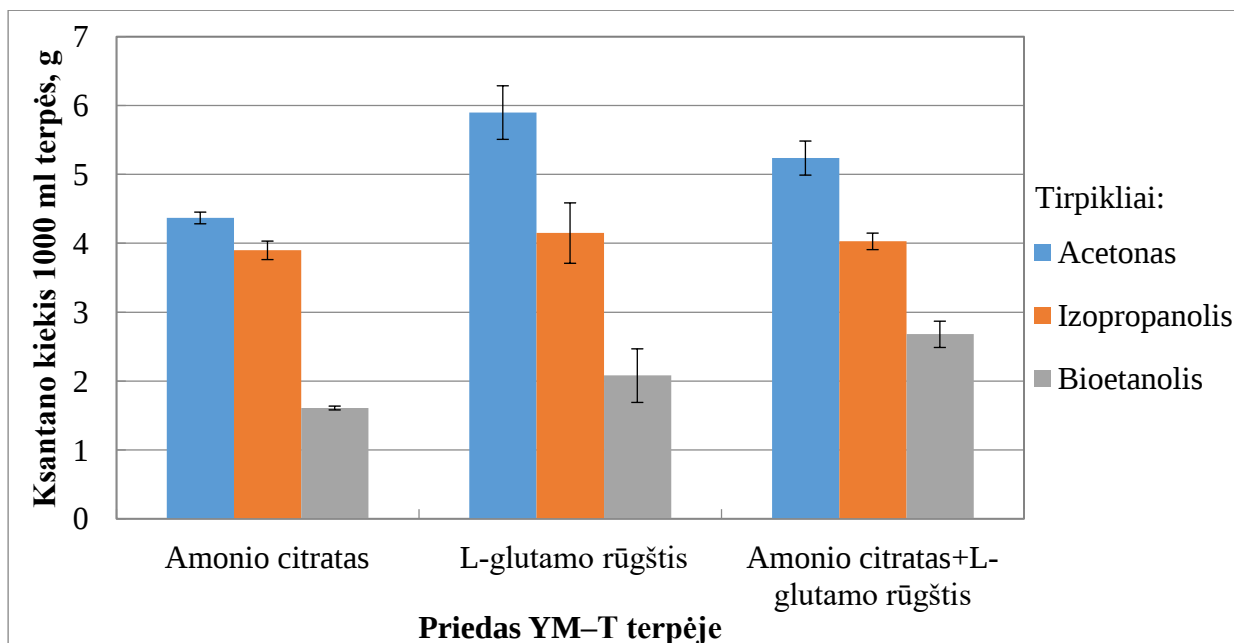
3.36. Lentelė. Skirtingais tirpikliais nusodinto ksantano kiekis

Tirpiklis 30 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 10 ml	Ksantano kiekis (g), kai produkcijos terpės 1000 ml
Acetonas	0,0524	5,24
Izopropanolis	0,0403	4,03
Bioetanolis	0,0268	2,68



3.7. pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko ir priedo YM-T terpėje

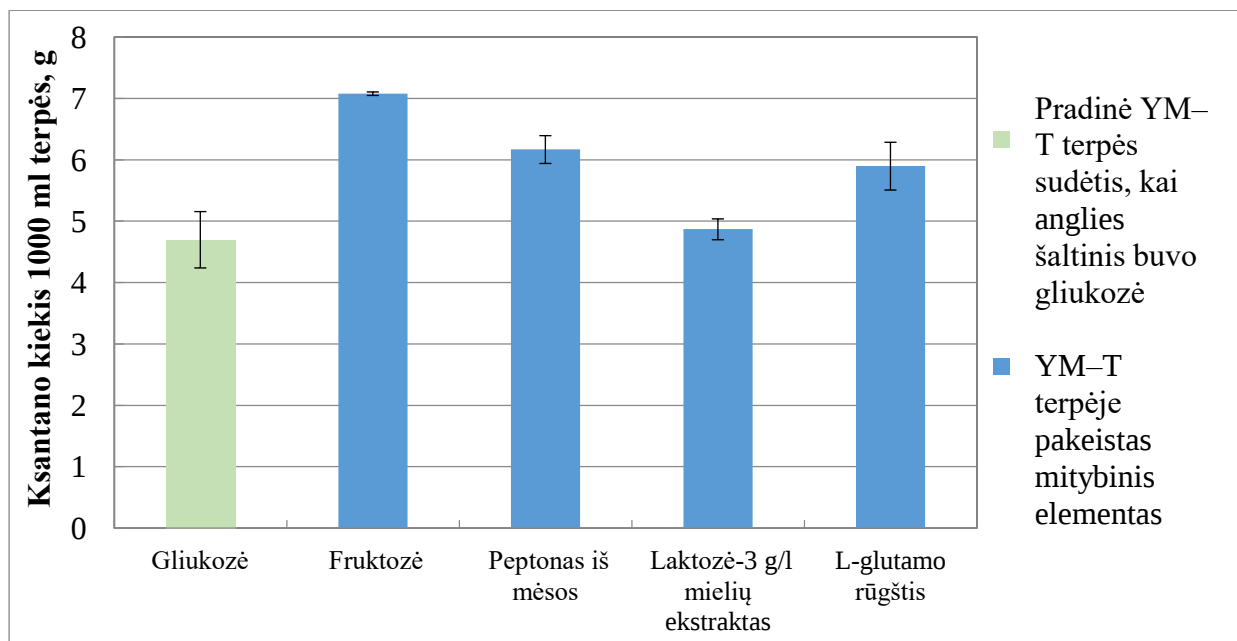
Į YM-T terpę pridėjus *L*-glutamato ir amonio citrato priedų, buvo gauta didžiausia biomasės koncentracija – 0,7 g/l (3.7. pav.). Panaudojus tik *L*-glutamato priedą, fermentacija sustabdyta po 48 valandų, nes bakterijų kiekis pradėjo mažėti. Gauta biomasės koncentracija buvo 0,52 g/l. Mažiausias bakterijų augimas pastebėtas, kai priedu naudotas amonio citratas. Po 48 valandų bakterijų kiekis ėmė mažėti, o fermentacijos pabaigoje biomasės koncentracija buvo 0,49 g/l.



3.8. pav. Ksantano kiekio priklausomybė nuo YM–T terpės priedų ir išsodinimui naudoto tirpiklio

Rezultatai parodė skirtingų terpės priedų įtaką galutinei ksantano išeigai (3.8. pav.). Nekeičiant pradinės YM–T terpės sudėties, daugiausiai ksantano gauta papildomai įdėjus *L*-glutamo rūgšties, o nusodinimui panaudojus acetoną, gauta 5,9 g biopolimero. Mažiausias ksantano kiekis (4,37 g) nusodintas acetonu su amonio citrato priedu terpėje. Visais trimis atvejais izopropanoliu biopolimero nusodinta labai panašūs kiekiai. Naudojant amonio citratą – 3,9 g, *L*-glutamo rūgštį – 4,15 g, amonio citrato ir *L*-glutamo rūgšties mišinį – 4,03 g. Mažiausias ksantano kiekis gautas panaudojus bioetanolį ir amonio citrato priedą, t.y. 1,61 g.

Taigi, įvertinus visų variantų rezultatus pastebėta, kad didžiausia biomasės koncentracija po fermentacijos buvo, kai į YM–T terpę buvo įdėtas amonio citrato ir *L*-glutamo rūgšties priedai, o mažiausia – anglies šaltiniu pasirinkus gliukozę ir padidinus azoto šaltinio koncentraciją iki 3 g/l.



3.9. pav. Ksantano, nusodinto acetonu, kiekio priklausomybė nuo mitybinio elemento YM–T terpėje

Tyrimas parodė, kad geriausias tirpiklis buvo acetonas. Todėl buvo palyginti geriausi acetonu nusodinti rezultatai iš kiekvienos grupės su pagal metodinius nurodymus naudotos pradinės YM–T terpės sudėties, nusodinant ksantaną, rezultatais. Nors mokslininkų Krishna Leela ir Sharma atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad daugiausiai ksantano gauta panaudojus gliukozės anglies šaltinį [58], o Souw ir Demain mokslininkų teigimu, daugiausiai ksantano gaunama mitybos elementu pasirinkus sacharozę [59], šio tyrimo metu daugiausiai ksantano gauta YM-T terpėje pakeitus anglies šaltinį fruktoze. Palyginus šį rezultatą su pradine ksantano išeiga, gauta, kai YM–T terpėje anglies šaltinis buvo gliukozė, pastebėtas statistiškai reikšmingas skirtumas. Pakeitus mitybinėje terpėje azoto šaltinį peptonu iš mėsos, o kitu atveju pridėjus L-glutamato rūgšties priedo į terpę, tarp gautų rezultatų didelio skirtumo nepastebėta. Tačiau jų išeiga buvo statistiškai patikimai didesnė už išeigą, gautą pradiniu ksantano gavimo būdu nekeičiant terpės sudėties. Nors YM–T terpėje pakeitus anglies šaltinį laktoze bei padidinus mielių ekstrakto koncentraciją, gauta ksantano išeiga buvo didesnė už išeigą, gautą neikeitus mitybinės terpės sudėties, t.y. anglies šaltiniu panaudojus gliukozę, tarp šių rezultatų statistiškai reikšmingo skirtumo nepastebėta.

Mažiausias ksantano kiekis gautas pakeitus terpėje anglies šaltinį laktoze ir nusodinus bioetanoliu, gauta 0,36 g biopolimero. Kitų mokslininkų atlikti palyginimai parodė tą patį [58].

3.2. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimo DPPH metodu rezultatai

3.37. lentelė. Antioksidacinio aktyvumo tyrimo DPPH metodu palyginamieji tirpalai

Palyginamasis tirpalas	Šviesos sugertis, $\lambda_{515\text{nm}}$
1	1,012
2	1,038
3	0,998
4	1,019
5	1,235
6	1,074

3.38. lentelė. Antioksidacinis aktyvumas DPPH radikalą slopinant ksantanu priklausomai nuo anglies šaltinio YM–T terpėje bei išsodinimui naudoto tirpiklio

Anglies šaltinis YM–T terpėje	Tirpiklis	Palygi- namasis tirpalas	Sugertis po 10 min, $\lambda_{515\text{nm}}$	Sugertis po 60 min, $\lambda_{515\text{nm}}$	Sugertis po 240 min, $\lambda_{515\text{nm}}$
Gliukozė	Acetonas	3	0,882	0,861	0,834
DPPH slopinimas (%)			11,62	13,73	16,43
Gliukozė	Izopropanolis	2	0,871	0,851	0,842
DPPH slopinimas (%)			16,09	18,02	18,88
Gliukozė	Bioetanolis	6	0,995	0,991	0,951
DPPH slopinimas (%)			7,36	7,73	11,45
Laktozė	Acetonas	3	0,873	0,818	0,744
DPPH slopinimas (%)			12,53	18,04	25,45
Fruktozė	Acetonas	4	0,800	0,746	0,717
DPPH slopinimas (%)			21,49	26,79	29,64
Fruktozė	Izopropanolis	1	0,888	0,797	0,862
DPPH slopinimas (%)			12,25	21,25	14,82
Fruktozė	Bioetanolis	6	0,951	0,905	0,874
DPPH slopinimas (%)			11,45	15,74	18,62
Manozė	Acetonas	1	0,817	0,753	0,774
DPPH slopinimas (%)			19,27	25,59	23,52
Manozė	Izopropanolis	2	0,822	0,771	0,739
DPPH slopinimas (%)			20,81	25,72	28,81
Ksilozė	Izopropanolis	3	0,859	0,799	0,769
DPPH slopinimas (%)			13,92	19,94	22,95

Atsižvelgiant į anglies šaltinį YM–T terpėje, nusodinimui panaudotą tirpiklį ir slopinimo laiką, didžiausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo ksantanas, nusodintas acetonu, o anglies šaltiniu panaudojus fruktozę. Šiuo atveju DPPH slopinimas po 240 minučių buvo 29,64 %. Mažiausias slopinimas stebimas, kai terpėje anglies šaltinis buvo gliukozė, o ksantanas nusodintas bioetanoliu. 7,36 % slopinimas stebimas po 10 min.

3.39. lentelė. Antioksidacinis aktyvumas DPPH radikalą slopinant ksantanu priklausomai nuo azoto šaltinio YM–T terpėje bei išsodinimui naudoto tirpiklio

Azoto šaltinis YM–T terpėje	Tirpiklis	Palygi- namasis tirpalas	Sugertis po 10 min, λ_{515nm}	Sugertis po 60 min, λ_{515nm}	Sugertis po 240 min, λ_{515nm}
Peptonas iš mėsos	Acetonas	5	0,934	0,914	0,888
DPPH slopinimas (%)			24,37	25,99	28,1
Peptonas iš mėsos	Izopropanolis	5	1,010	0,956	0,862
DPPH slopinimas (%)			18,22	22,59	30,2
Peptonas iš sojos	Acetonas	3	0,878	0,837	0,807
DPPH slopinimas (%)			12,02	16,13	19,14
Peptonas iš sojos	Izopropanolis	4	0,954	0,902	0,862
DPPH slopinimas (%)			6,38	11,48	15,41
Triptonas	Acetonas	5	1,013	0,991	0,929
DPPH slopinimas (%)			17,98	19,76	24,78
Triptonas	Izopropanolis	3	0,825	0,800	0,787
DPPH slopinimas (%)			17,33	19,84	21,14

Pakeitus YM–T terpėje azoto šaltinį peptonu, išskirtu iš mėsos, ir nusodinus ksantaną izopropanoliu, gautas didžiausias (30,2 %) DPPH radikalo slopinimas, kuris buvo stebimas po 240 minučių. Mažiausiai antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo ksantanas, nusodintas izopropanoliu, o terpėje azoto šaltiniu panaudojus peptoną iš sojos. Slopinimas po 10 minučių siekė 6,38 %.

3.40. Lentelė. Antioksidacinis aktyvumas DPPH radikalą slopinant ksantanu priklausomai nuo anglies ir azoto šaltinių YM–T terpėje bei išsodinimui naudoto tirpiklio

Anglies ir azoto šaltinis YM–T terpėje	Tirpiklis	Palyginamasis tirpalas	Sugertis po 10 min, $\lambda_{515\text{nm}}$	Sugertis po 60 min, $\lambda_{515\text{nm}}$	Sugertis po 240 min, $\lambda_{515\text{nm}}$
Gliukozė–3g/l mielių ekstrakto	Izopropanolis	5	1,013	0,969	0,900
DPPH slopinimas (%)			17,98	21,54	27,13
Sacharozė–3g/l mielių ekstrakto	Acetonas	4	0,868	0,791	0,748
DPPH slopinimas (%)			14,82	22,37	26,59
Sacharozė–3g/l mielių ekstrakto	Izopropanolis	2	0,859	0,825	0,766
DPPH slopinimas (%)			17,24	20,52	26,2
Laktozė–3g/l mielių ekstrakto	Acetonas	4	0,849	0,796	0,766
DPPH slopinimas (%)			16,68	21,88	24,83
Laktozė–3g/l mielių ekstrakto	Izopropanolis	1	0,858	0,768	0,790
DPPH slopinimas (%)			15,22	24,11	21,94
Fruktozė–peptonas iš mėsos–mėsos ekstraktas	Izopropanolis	3	0,881	0,864	0,792
DPPH slopinimas (%)			11,72	13,43	20,64
Fruktozė–peptonas iš mėsos–mielių ekstraktas	Bioetanolis	6	0,926	0,904	0,882
DPPH slopinimas (%)			13,78	15,83	17,88

Keičiant anglies ir azoto šaltinius, didžiausias 27,13 % slopinimas gautas, kai mielių koncentracija buvo padidinta iki 3 g/l, anglies šaltiniu terpėje naudota gliukozė, o nusodinimas vykdomas izopropanoliu. Šis slopinimas stebėtas po 240 minučių. Mažiausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo ksantanas, nusodintas izopropanoliu. DPPH radikalo slopinimas po 10 minučių buvo 11,72 %, kai anglies šaltinis terpėje buvo fruktozė, azoto – peptonas iš mėsos bei mėsos ekstraktas.

3.41. lentelė. Antioksidacinis aktyvumas DPPH radikalą slopinant ksantanu priklausomai nuo priedo YM–T terpėje bei išsodinimui naudoto tirpiklio

YM–T terpės priedas	Tirpiklis	Palyginamasis tirpalas	Sugertis po 10 min, $\lambda_{515\text{nm}}$	Sugertis po 60 min, $\lambda_{515\text{nm}}$	Sugertis po 240 min, $\lambda_{515\text{nm}}$
Amonio citratas	Acetonas	1	0,935	0,829	0,849
DPPH slopinimas (%)			7,61	18,08	16,11
Amonio citratas	Izopropanolis	2	1,004	0,940	0,919
DPPH slopinimas (%)			3,28	9,44	11,46
Amonio citratas	Bioetanolis	4	0,870	0,817	0,796
DPPH slopinimas (%)			14,62	19,82	21,88
<i>L</i> -glutamo rūgštis	Acetonas	2	0,924	0,868	0,856
DPPH slopinimas (%)			10,98	16,38	17,53
Amonio citratas + <i>L</i> -glutamo rūgštis	Acetonas	1	0,841	0,754	0,749
DPPH slopinimas (%)			16,9	25,49	25,99
Amonio citratas + <i>L</i> -glutamo rūgštis	Izopropanolis	6	0,929	0,896	0,864
DPPH slopinimas (%)			13,5	16,57	19,55

Keičiant YM–T terpės priedus, geriausias rezultatus slopinant DPPH radikalą parodė ksantanas, nusodintas acetonu terpėje, kurioje buvo amonio citrato ir *L*-glutamo rūgšties mišinio. Slopinimas po 240 minučių buvo 25,99 %. 3,28 % slopinimas po 10 minučių buvo mažiausias, šiuo atveju nusodinimas buvo vykdomas izopropanoliu, o terpės priedas buvo amonio citratas.

Taigi, atlikus tyrimus pastebėta, kad laikui bėgant ksantano antioksidacinis aktyvumas didėja. Didžiausias ksantano antioksidacinis poveikis pastebėtas pakeitus YM–T terpėje azoto šaltinį peptonu, išskirtu iš mėsos ir nusodinus ksantaną izopropanoliu. Mažiausias slopinimas stebimas YM–T terpėje pridėjus amonio citrato priedo.

3.3. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimo pagal linolo rūgštį rezultatai

3.42. lentelė. Ksantano koncentracijos įtaka antioksidaciniam aktyvumui

Šviesos sugertis esant skirtingoms ksantano koncentracijoms, $\lambda_{234\text{nm}}$		
0,2 g/l	0,4 g/l	0,6 g/l
0,738	0,224	0,189

Gauti rezultatai rodo, jog didėjant ksantano koncentracijai linolo rūgšties sistemoje, šviesos sugertis mažėja, o tai reiškia, kad antioksidacinis aktyvumas didėja. Kishk ir Al-Sayed atliktos studijos rodo tokį patį rezultatą, didėjant ksantano koncentracijai, didėja antioksidacinis aktyvumas [57].

3.43. lentelė. pH įtaka antioksidaciniam aktyvumui

Koncentracija g/l	Šviesos sugertis esant skirtingimies pH, λ_{234nm}				
	3	5	7	9	11
0,2	0,217	0,138	0,738	0,121	0,115
0,4	0,210	0,153	0,224	0,247	0,207
0,6	0,419	0,525	0,189	0,171	0,391

3.44. lentelė. Temperatūros įtaka antioksidaciniam aktyvumui

Koncentracija g/l	Šviesos sugertis esant skirtingoms temperatūroms, λ_{234nm}				
	30 °C	40 °C	50 °C	70 °C	90 °C
0,2	0,202	0,226	0,255	0,454	0,239
0,4	0,307	0,225	0,335	0,168	0,359
0,6	0,199	0,354	0,466	0,204	0,412

Tiriant pH ir temperatūros įtaką antioksidaciniam ksantano aktyvumui mažėjančios ar didėjančios tendencijos keičiant šiuos parametrus nepastebėta. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo tiriamasis tirpalas, kurio koncentracija buvo 0,2 g/l, o pH=11, mažiausiu – kai koncentracija buvo 0,6 g/l, o pH=7. Tiriant temperatūros įtaką didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo inkubuojant 0,4 g/l koncentracijos tirpalą 70 °C temperatūroje, o mažiausias – inkubuojant 0,6 g/l koncentracijos tirpalą 50 °C temperatūroje. Kishk ir Al-Sayed atliko tyrimus, kai ksantano koncentracija buvo 0,2 g/l, ir jie nustatė, kad didėjant pH, didėja antioksidacinis aktyvumas, o didėjant temperatūrai, aktyvumas mažėja [57].

3.4. Ksantano antioksidacinių savybių tyrimo slopinant vandenilio peroksidą rezultatai

Teigiamų rezultatų nepastebėta. Po 30 minučių palyginamojo tirpalo šviesos sugertis buvo mažesnė nei tiriamojo.

3.5. Ksantano oksidacinių savybių tyrimo nustatant peroksido vertę rezultatai

Teigiamų rezultatų nepastebėta. Skirtumo tarp sunaudoto $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ kiekio titruojant palyginamąjį ir tiriamąjį mėginius nebuvo.

4. REKOMENDACIJŲ DALIS

Norint padidinti ksantano gamybos išeigą, rekomenduojama laikytis sudarytos principinės aparatūrinės schemos.

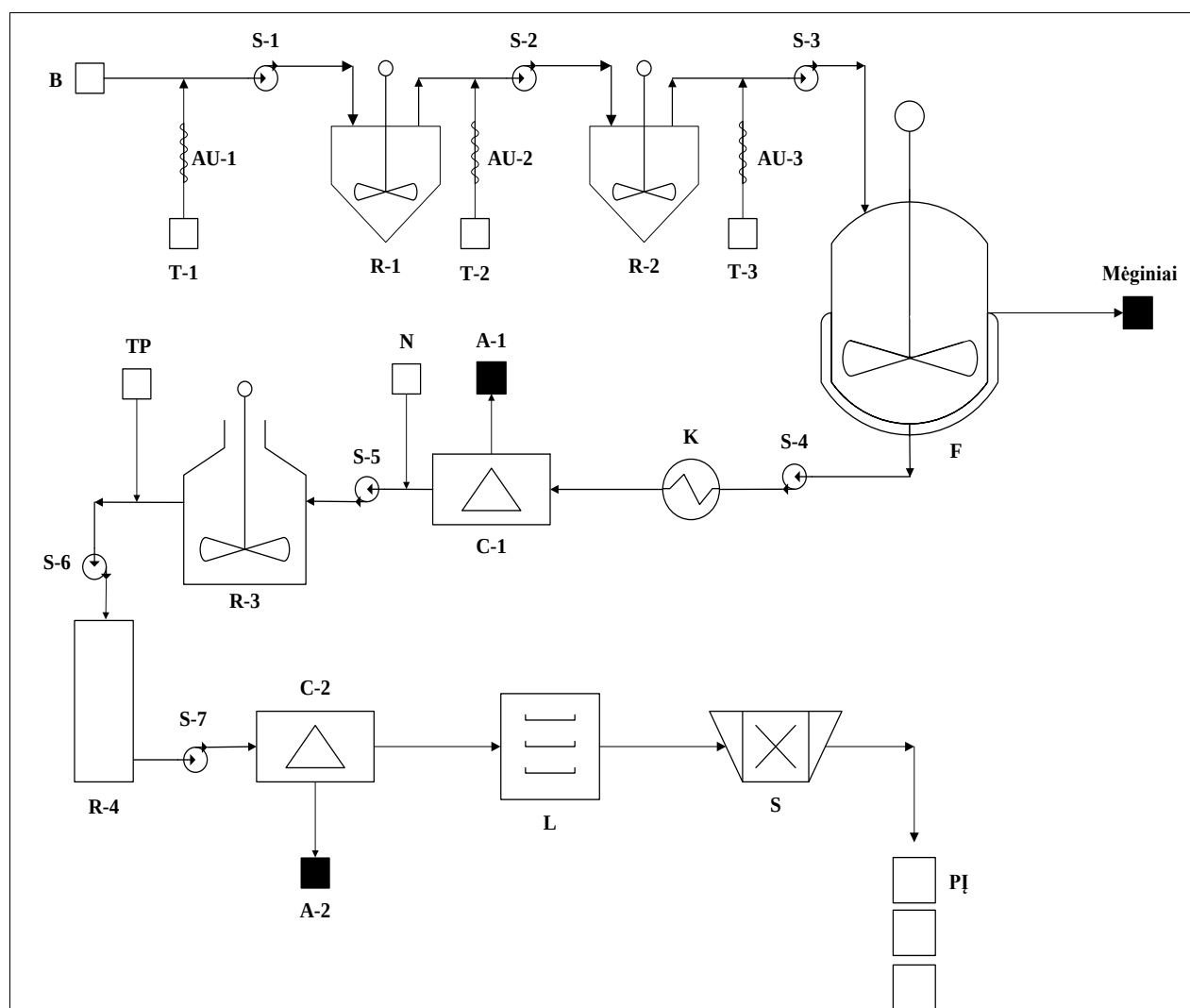
Į rezervuarą **R-1** išcentrinio siurbliu **S-1** tiekama YM terpė (**T-1**), kuri prieš tai sterilinama autoklave **AU-1**, kartu su *Xanthomonas campestris* bakterijų kolonijomis (**B**). **R-1** rezervuare rekomenduojama palaikyti 28 °C temperatūrą. **R-1** rezervuaro mišinys išcentrinio siurbliu **S-2** transportuojamas į **R-2** rezervuarą. Lygiagrečiai į rezervuarą **R-2** yra tiekama YM-T terpė (**T-2**), kuri prieš tai sterilinama autoklave **AU-2**. **T-2** terpėje rekomenduojama naudoti fruktozės anglies šaltinį, peptono, išskirto iš mėsos, azoto šaltinį arba į terpę pridėti *L*-glutamo rūgšties. **R-2** rezervuare turėtų būti palaikoma 28 °C temperatūra. **R-2** rezervuaro mišinys kartu su produkcijos terpe (**T-3**), kuri prieš tai sterilinama autoklave **AU-3**, išcentrinio siurbliu **S-3** tiekiami į fermentatorių **F**, kuriame rekomenduojama palaikyti 28 °C temperatūrą. Norint nustatyti ir stebėti biomasės koncentraciją, periodiškai imami mėginiai. Po fermentacijos mišinys yra kaitinamas kaitintuvu **K** tam, kad padidėtų ksantano tirpumas, sumažėtų terpės klampa, degraduotų *X. campestris* ląstelės ir fermentai, galintys paveikti biopolimerą. Toliau mišinys transportuojamas į centrifugą **C-1**, kur pašalinamos bakterijų ląstelės ir kitos priemaišos. Susidariusios nuosėdos yra pašalinamos kaip atliekos **A-1**. Norint sužinoti sausos biomasės kiekį, rekomenduojama atliekas **A-1** išdžiovinti ir pasverti. Supernatantas kartu su NaCl (**N**) išcentrinio siurbliu **S-5** tiekiamas į rezervuarą **R-3**. Ksantanas iš supernatanto nusodinamas tirpikliu **TP** rezervuare **R-4**. Kaip tirpiklį rekomenduojama naudoti acetoną. Mišinys išcentrinio siurbliu **S-6** transportuojamas į centrifugą **C-2**. Tirpiklis pašalinamas kaip atliekos **A-2**, o gautos ksantano nuosėdos išdžiovinamos liofilizatoriuje **L**. Ksantanas susmulkinamas smulkintuvu **S** ir supakuojamas pakavimo įrenginiu **PĮ**.

4.1. lentelė. Ksantano gamybos principinės aparatūrinės schemos medžiagų/terpių žymėjimas

Žymėjimas	Medžiaga/terpė
A-1	Biomasės atliekos
A-2	Tirpiklio atliekos
B	<i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų kolonijos
N	Natrio chloridas
T-1	YM terpė
T-2	YM-T terpė
T-3	Produkcijos terpė
TP	Tirpiklis

4.2. lentelė. Ksantano gamybos principinės aparatūrinės schemos įrenginių žymėjimas

Žymėjimas	Įrenginys
AU-1, AU-2, AU-3	Autoklavas
C-1, C-2	Centrifuga
F	Fermentatorius
K	Kaitintuvas
L	Liofilizatorius
PĮ	Pakavimo įrenginys
R-1, R-2, R-3	Rezervuaras su maišykle
R-4	Rezervuaras
S-1, S-2, S-3, S-4, S-5, S-6, S-7	Išcentrinis siurblys



4.1. pav. Ksantano gamybos principinė aparatūrinė schema

IŠVADOS

1. Atlikus ksantano gamybos optimizavimo tyrimus ir palyginus įvairių *Xanthomonas campestris* mitybinės terpės anglies šaltinių įtaką ksantano išeigai, rezultatai parodė, kad geriausiai tam tinkantis buvo fruktozės anglies šaltinis, kai biopolimeras nusodintas acetonu.
2. Optimizavus gamybos procesą keičiant *Xanthomonas campestris* mitybinės terpės azoto šaltinį, didžiausia ksantano išeiga gauta, kai azoto šaltinis buvo peptonas iš mėsos, o nusodinimui naudotas acetonas.
3. Įvertinus optimalią išeigą, gautą keičiant *Xanthomonas campestris* mitybinės terpės anglies ir azoto šaltinius, duomenys parodė, kad didžiausia ksantano išeiga gauta terpėje panaudojus laktozę bei padidinus mielių koncentraciją nuo 1,5 g/l iki 3 g/l, o biopolimerą nusodinus acetonu.
4. Palyginus skirtingų *Xanthomonas campestris* mitybinės terpės priedų poveikį ksantano gamybos procesui, gauta, kad daugiausiai biopolimero nusodinta acetonu į terpę pridėjus *L*-glutamo rūgšties.
5. Įvertinus ksantano antioksidacinį aktyvumą pagal linolo rūgštį nustatyta, kad didėjant biopolimero koncentracijai tirpale, antioksidacinis aktyvumas didėja. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pagal linolo rūgštį pasižymėjo ksantano tirpalai, kurių koncentracija buvo 0,2 g/l, o pH=11, bei 0,4 g/l koncentracijos tirpalai 70 °C temperatūroje. Didžiausias ksantano antioksidacinis poveikis slopinant DPPH radikalą pasireiškė po 240 minučių, kai biopolimero gamybos procese buvo naudotas peptono iš mėsos azoto šaltinis, o nusodinimui naudotas izopropanolis.
6. Ištyrus tirpiklių poveikį ksantano nusodinimui, geriausius išeigos rezultatus parodė atvejai, kai buvo naudotas acetonas.
7. Atsižvelgus į atrinktas optimalias sąlygas sudaryta ksantano gamybos aparatūrinė schema

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. NIKNEZHAD SV, ASADOLLAHI MA, ZAMANI A, BIRIA D. Production of xanthan gum by free and immobilized cells of *Xanthomonas campestris* and *Xanthomonas pelargonii*. Int J Biol Macromol. 2016, 82, 751–756. ISSN: 0141–8130.
2. 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.
3. PALANIRAJ A, JAYARAMAN V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. J Food Eng. 2011, 106(1), 1–12. ISSN: 0260–8774.
4. BEN SALAH R, CHAARI K, BESBES S, KTARI N, BLECKER C, DEROANNE C, ATTIA H. Optimisation of xanthan gum production by palm date (*Phoenix dactylifera* L.) juice by-products using response surface methodology. Food Chem. 2010, 121(2), 627–633. ISSN: 0308–8146
5. GARCÍA-OCHOA F, SANTOS V., CASAS J., GÓMEZ E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnol Adv. 2000, 18(7), 549–579. ISSN: 0734–9750.
6. SAVVIDES AL, KATSIFAS EA, HATZINIKOLAOU DG, KARAGOUNI AD. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium. World J Microbiol Biotechnol. 2012, 28(8), 2759–2764. ISSN: 0959–3993.
7. PSOMAS SK, LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M, KYRIAKIDIS DA. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. Biochem Eng J. 2007, 35(3), 273–280. ISSN: 1369–703X.
8. MARTÍNEZ-SALAZAR JM, PALACIOS AN, SÁNCHEZ R, CARO AD, SOBERÓN-CHAVEZ G. Genetic stability and xanthan gum production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B1459. Mol Microbiol. 1993, 8(6), 1053–1061. ISSN: 1365–2958.
9. VICENTE JG, HOLUB EB. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol Plant Pathol. 2013, 14(1), 2–18. ISSN: 1464–6722.
10. 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
11. ROSALAM S, ENGLAND R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestis* sp. Enzyme Microb Technol. 2006, 39(2), 197–207. ISSN: 0141–0229.
12. BECKER A, KATZEN F, PÜHLER A, IELPI L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical /genetic perspective. Appl Microbiol Biotechnol. 1998, 50(2), 145–152. ISSN: 0175–7598.
13. SHARMA BR, NARESH L, DHULDHOYA NC, MERCHANT SU, MERCHANT UC. Xanthan Gum - A Boon to Food Industry. Food Promot Chron. 2006, 1(5), 27–30.

14. WHITFIELD C, VALVANO MA. Biosynthesis and Expression of Cell-Surface Polysaccharides in Gram-Negative Bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. Elsevier, 1993. 135–246. ISBN: 9780120277353.
15. HSU C-H, LO YM. Characterization of xanthan gum biosynthesis in a centrifugal, packed-bed reactor using metabolic flux analysis. *Process Biochem*. 2003, 38(11), 1617–1625. ISSN: 1359–5113.
16. TORRESTIANA B, FUCIKOVSKY L, GALINDO E. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. *Lett Appl Microbiol*. 1990, 10(2), 81–83. ISSN: 0266–8254.
17. PAPAGIANNI M, 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.
18. CARIGNATTO CRR, OLIVEIRA KSM, DE LIMA VMG, DE OLIVA NETO P. New Culture Medium to Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Indian J Microbiol*. 2011, 51(3), 283–288. ISSN: 0046–8991.
19. CADMUS MC, KNUTSON CA, LAGODA AA, PITTSLEY JE, BURTON KA. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. *Biotechnol Bioeng*. 1978, 20(7), 1003–1014. ISSN: 0006–3592.
20. GARCÍA-OCHOA F, SANTOS VE, FRITSCH AP. Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. *Enzyme Microb Technol*. 1992, 14(12), 991–996. ISSN: 0141–0229.
21. SILVA MF, FORNARI RCG, MAZUTTI MA, DE OLIVEIRA D, PADILHA FF, CICHOSKI AJ, CANSIAN RL, DI LUCCIO M, TREICHEL H. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *J Food Eng*. 2009, 90(1), 119–123. ISSN: 0260–8774.
22. BORGES CD, MOREIRA ADS, VENDRUSCOLO CT, AYUB MAZ. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101. *Rev Argent Microbiol*. 2008, 40, 81–85.
23. SHU C-H, YANG S-T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol Bioeng*. 1990, 35(5), 454–468. ISSN: 0006–3592.
24. GARCÍA-OCHOA F, SANTOS VE, ALCÓN A. Simulation of xanthan gum production by a chemically structured kinetic model. *Math Comput Simul*. 1996, 42(2–3), 187–195. ISSN: 0378–4754.
25. FREITAS F, ALVES VD, REIS MAM. *Bacterial Polysaccharides: Production and Applications in Cosmetic Industry*. Ramawat KG, Mérillon J-M, sudarytojai. Polysaccharides. Cham: Springer International Publishing, 2015. ISBN: 9783319162973.
26. LI P, LI T, ZENG Y, LI X, JIANG X, WANG Y, XIE T, ZHANG Y. Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* LRELP-1 using kitchen waste as the sole substrate. *Carbohydr Polym*. 2016, 151, 684–691. ISSN: 0144–8617.

27. CHEN Q, SHAO X, LING P, LIU F, HAN G, WANG F. Recent advances in polysaccharides for osteoarthritis therapy. *Eur J Med Chem.* 2017, 139, 926–935. ISSN: 0223–5234.
28. MOHAMMADI M, SADEGHNIA N, AZIZI M-H, NEYESTANI T-R, MORTAZAVIAN AM. Development of gluten-free flat bread using hydrocolloids: Xanthan and CMC. *J Ind Eng Chem.* 2014, 20(4), 1812–1818. ISSN: 1226–086X.
29. KATZBAUER B. Properties and applications of xanthan gum. *Polym Degrad Stab.* 1998, 59(1–3), 81–84. ISSN: 0141–3910.
30. LANE NE, CORR M. Osteoarthritis in 2016: Anti-NGF treatments for pain — two steps forward, one step back? *Nat Rev Rheumatol.* 2017, 13(2), 76–78. ISSN: 1759–4790.
31. HAN G, CHEN Q, LIU F, CUI Z, SHAO H, LIU F, MA A, LIAO J, GUO B, GUO Y, WANG F, LING P, MEI X. Low molecular weight xanthan gum for treating osteoarthritis. *Carbohydr Polym.* 2017, 164, 386–395. ISSN: 0144–8617.
32. SHAO H, HAN G, LING P, ZHU X, WANG F, ZHAO L, LIU F, LIU X, WANG G, YING Y, ZHANG T. Intra-articular injection of xanthan gum reduces pain and cartilage damage in a rat osteoarthritis model. *Carbohydr Polym.* 2013, 92(2), 1850–1857. ISSN: 0144–8617.
33. 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.
34. JIAN H, ZHU L, ZHANG W, SUN D, JIANG J. Galactomannan (from *Gleditsia sinensis* Lam.) and xanthan gum matrix tablets for controlled delivery of theophylline: In vitro drug release and swelling behavior. *Carbohydr Polym.* 2012, 87(3), 2176–2182. ISSN: 0144–8617.
35. DESPLANQUES S, RENOU F, GRISEL M, MALHIAC C. Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 2012, 27(2), 401–410. ISSN: 0268–005X.
36. FAN G, CANG L, QIN W, ZHOU C, GOMES HI, ZHOU D. Surfactants-enhanced electrokinetic transport of xanthan gum stabilized nanoPd/Fe for the remediation of PCBs contaminated soils. *Sep Purif Technol.* 2013, 114, 64–72. ISSN: 1383–5866.
37. ALMEIDA JPM, FIGUEROA ER, DREZEK RA. Gold nanoparticle mediated cancer immunotherapy. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2014, 10(3), 503–514. ISSN: 1549–9634.
38. XUE D, SETHI R. Viscoelastic gels of guar and xanthan gum mixtures provide long-term stabilization of iron micro- and nanoparticles. *J Nanoparticle Res.* 2012, 14(11). ISSN: 1388–0764
39. GU Y-J, CHENG J, MAN CW-Y, WONG W-T, CHENG SH. Gold-doxorubicin nanoconjugates for overcoming multidrug resistance. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2012, 8(2), 204–211. ISSN: 1549–9634.
40. LAGINHA KM. Determination of Doxorubicin Levels in Whole Tumor and Tumor Nuclei in Murine Breast Cancer Tumors. *Clin Cancer Res.* 2005, 11(19), 6944–6949. ISSN: 1078–0432.

41. KANG KS, PETTITT DJ. Xanthan, gellan, welan, and rhaman. Industrial Gums. Elsevier, 1993. ISBN: 9780080926544
42. TAKO M, NAKAMURA S. Rheological Properties of Deacetylated Xanthan in Aqueous Media. Agric Biol Chem. 1984, 48(12), 2987–2993. ISSN: 0002–1369.
43. MILAS M, RINAUDO M, TINLAND B. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. Polym Bull. 1985, 14(2), 157–164. ISSN: 0170–0839.
44. SMITH IH, PACE GW. Recovery of microbial polysaccharides. J Chem Technol Biotechnol. 2007; 32(1); 119–129. ISSN: 0142–0356.
45. GARCÍA-OCHO A F, CASAS JA. Apparent yield stress in xanthan gum solutions at low concentrations. Chem Eng J Biochem Eng J. 1994, 53(3), B41–B46. ISSN: 0923–0467.
46. HIGIRO J, HERALD TJ, ALAVI S, BEAN S. Rheological study of xanthan and locust bean gum interaction in dilute solution: Effect of salt. Food Res Int. 2007, 40(4), 435–447. ISSN: 0963–9969.
47. UÇKUN KIRAN E, TRZCINSKI AP, LIU Y. Enhancing the hydrolysis and methane production potential of mixed food waste by an effective enzymatic pretreatment. Bioresour Technol. 2015, 183, 47–52. ISSN: 0960–8524.
48. LI Y, JIN Y. Effects of thermal pretreatment on acidification phase during two-phase batch anaerobic digestion of kitchen waste. Renew Energy. 2015, 77, 550–557. ISSN: 0960–1481.
49. NISHIO N, NAKASHIMADA Y. Recent development of anaerobic digestion processes for energy recovery from wastes. J Biosci Bioeng. 2007, 103(2), 105–112. ISSN: 1389–1723.
50. MELIKOGLU M, LIN C, WEBB C. Analysing global food waste problem: pinpointing the facts and estimating the energy content. 2013, 3(2). ISSN: 2391–5439.
51. WANG Q, WANG X, WANG X, MA H, REN N. Bioconversion of Kitchen Garbage to Lactic Acid by Two Wild Strains of *Lactobacillus* Species. J Environ Sci Health Part A. 2005, 40(10), 1951–1962. ISSN: 1093–4529.
52. NATH K, DAS D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. Appl Microbiol Biotechnol. 2004; 65(5). ISSN: 0175–7598.
53. KIM JH, LEE JC, PAK D. Feasibility of producing ethanol from food waste. Waste Manag. 2011, 31(9–10), 2121–2125. ISSN: 0956–053X.
54. BAJIĆ BŽ, VUČUROVIĆ DG, DODIĆ SN, GRAHOVAC JA, DODIĆ JM. Process model economics of xanthan production from confectionery industry wastewaters. J Environ Manage. 2017, 203, 999–1004. ISSN: 0301–4797.
55. CHELLAPANDI P. Laboratory Manual in Industry Biotechnology. Jaipur: Pointer Publications; 2007. ISBN: 9788171324880.
56. CASAS J., SANTOS V., GARCÍA-OCHOA F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. Enzyme Microb Technol. 2000, 26(2–4), 282–291. ISSN: 0141–0229.

57. KISHK YFM, AL-SAYED HMA. Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. *LWT - Food Sci Technol.* 2007, 40(2), 270–277. ISSN: 0023–6438.
58. KRISHNA LEELA J, SHARMA G. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Eng.* 2000, 23(6), 687–689. ISSN: 1615–7591.
59. SOUW P, DEMAINE AL. Nutritional Studies on Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. *Appl Environ Microbiol.* 1979, 37(6), 1186–1192. ISSN: 0099–2240.