



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Polihidroksialkanoatų gavimo iš įvairių bakterijų kultūrų optimizavimas

Baigiamasis magistro projektas

Rūta Minickaitė

Projekto autorė

doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2023



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Polihidroksialkanoatų gavimo iš įvairių bakterijų kultūrų optimizavimas

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Rūta Minickaitė

Projekto autorė

doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

doc. dr. Vilija Kederienė

Recenzentė

Kaunas, 2023



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Rūta Minickaitė

Polihidroksialkanoatų gavimo iš įvairių bakterijų kultūrų optimizavimas

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

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

Rūta Minickaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Minickaitė, Rūta. Polihidroksialkanoatų gavimo iš įvairių bakterijų kultūrų optimizavimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: polihidroksialkanoatai, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Cupriavidus necator*, anglies šaltinis.

Kaunas, 2023. 56 p.

Santrauka

Šio tyrimo metu siekta įvertinti įvairių anglies šaltinių įtaką polihidroksialkanoatų sintezei, išėigai ir savybėms. Polihidroksialkanoatų sintezė buvo vykdoma naudojant tris bakterijų kultūras – *Bacillus subtilis*, *Cupriavidus necator* ir *Escherichia coli*. Anglies šaltiniai, pasirinkti tyrimui buvo cukranendrių cukrus, gliukozė, melasa, apdorota melasa, sacharozė ir stevija. Įvykdžius polihidroksialkanoatų šių mikroorganizmų polihidroksialkanoatų biosintezę su kiekvienu anglies šaltiniu, buvo atliekami susintetintų junginių savybių tyrimai. Įvertinus visus polihidroksialkanoatų išėigos rezultatus, nustatyta, kad didžiausia polihidroksialkanoatų koncentracija gauta iš *Bacillus subtilis* kultūros po 48 valandų fermentacijos, kai anglies šaltinis fermentacijos terpėje buvo cukranendrių cukrus (8,03 g/l). Tyrimo metu pagamintų polihidroksialkanoatų struktūra buvo įvertinta atliekant FTIR spektroskopiją. Siekiant išsiaiškinti junginių antioksidacinį aktyvumą, buvo atlikti DPPH, FRAP, ABTS radikalų slopinimo tyrimai bei redukcinių savybių tyrimas. Nustatyta, kad didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo iš *Escherichia coli* pagaminti polihidroksialkanoatai, kurių anglies šaltinis buvo stevija (0,17 o. v.). Stipriausiomis redukcinėmis savybėmis pagal FRAP metodą pasižymėjo iš *Cupriavidus necator* gauti biopolimerai, kai anglies šaltinis buvo cukranendrių cukrus (0,0023 $\mu\text{mol/l}$). ABTS radikalą efektyviausiai slopino polihidroksialkanoatai, gauti iš *Bacillus subtilis* kultūros, kai anglies šaltinis buvo gliukozė (99,5 %).

Minickaitė, Rūta. Optimization of PHA Production From Various Bacteria Cultures. Master's Final Degree Project / supervisor Assoc. Prof. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: polyhydroxyalkanoates, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Cupriavidus necator*, carbon source.

Kaunas, 2023. 56.

Summary

The aim of this study was to evaluate the influence of different carbon sources on the synthesis, yield and properties of polyhydroxyalkanoates. The synthesis of polyhydroxyalkanoates was carried out using three bacterial cultures, *Bacillus subtilis*, *Cupriavidus necator* and *Escherichia coli*. The carbon sources chosen for the study were cane sugar, glucose, molasses, treated molasses, sucrose and stevia. After evaluation of all the yields of polyhydroxyalkanoates, it was found that the highest concentration of polyhydroxyalkanoates was obtained from the culture of *Bacillus subtilis* after a 48-hour fermentation with cane sugar as the carbon source in the fermentation medium (8,03 g/l). After the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates of these microorganisms with each carbon source, the properties of the synthesised compounds were investigated. The structure of the polyhydroxyalkanoates produced in the study was evaluated by FTIR spectroscopy. DPPH, FRAP, ABTS radical scavenging assays and reductive property assay were carried out in order to elucidate the antioxidant activity of the compounds. The polyhydroxyalkanoates produced from *Escherichia coli* with stevia as the carbon source (0.17 o.v.) were found to have the highest reductive properties. The biopolymers obtained from *Cupriavidus necator* with cane sugar as the carbon source had the highest reducing properties according to the FRAP method (0,0023 $\mu\text{mol/l}$). The most effective inhibitor of the ABTS radical was the polyhydroxyalkanoates obtained from *Bacillus subtilis* culture with glucose as the carbon source (99,5 %).

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	7
Įvadas	9
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. Bioplastikai	10
1.2. Polihidroksialkanoatų charakteristika	12
1.3. PHA biosintezė	14
1.4. Komeracinė gamyba	17
1.5. PHA panaudojimas.....	18
1.5.1. Panaudojimas maisto pakuočių gamyboje.....	18
1.5.2. Panaudojimas audinių inžinerijoje	19
1.5.3. Panaudojimas vaistų pernašoje	19
1.5.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	20
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	21
2.1. Tyrimo metu naudota įranga.....	21
2.2. Naudoti reagentai	21
2.3. Naudotos bakterijos.....	22
2.4. Naudoti anglies šaltiniai	22
2.5. Tyrimo eiga.....	23
2.5.1. Terpių paruošimas.....	23
2.5.2. Tyrime naudotų bakterijų paruošimas	24
2.5.3. Bakterijų kultūrų inokuliatų paruošimas ir fermentacija	25
2.5.4. PHA išskyrimas.....	26
2.5.5. Savybių tyrimas.....	27
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	31
3.1. PHA susidarymo iš skirtingų anglies šaltinių tyrimas, naudojant <i>Bacillus subtilis</i>	31
3.2. PHA susidarymo iš skirtingų anglies šaltinių tyrimas, naudojant <i>Cupriavidus necator</i>	35
3.3. PHA susidarymo iš skirtingų anglies šaltinių tyrimas, naudojant <i>Escherichia coli</i>	38
3.4. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu	41
3.5. Antioksidacinio (redukcinio) aktyvumo nustatymas.....	43
3.6. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu	45
3.7. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas FRAP metodu	45
3.8. FTIR tyrimo rezultatai.....	47
4. Rekomendacijų dalis	49
Išvados	51
Literatūros sąrašas	52
Informacijos šaltinių sąrašas	57

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninė rūgštis);

bio-PA – bio-poliamidai;

bio-PE – bio-polietilenas;

bio-PET – bio-polietilentereftalatas;

bio-PTT – bio-politrimetiltereftalatas;

CP – baltymas nešiklis (angl. *Carrier protein*)

DMSO – dimetilsulfoksidas;

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

DSMZ – Vokietijos mikroorganizmų ir ląstelių kultūrų kolekcija (vok. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*);

EBPO – Ekonominio bendradarbiavimo plėtros organizacija;

FRAP – geležies jonus redukuojantis potencialas (angl. *Ferric ion reducing antioxidant power*);

FTIR – Furjė transformacijos infraraudonojų spindulių spektroskopija;

GS-L – vynuogių sėklų ligninas (angl. *Grape seed lignin*)

KoA – kofermentas A;

LB – mitybinė terpė (angl. *Luria Broth*);

Lcl-PHA – ilgos grandinės polihidroksialkanoatai;

Mcl-PHA – vidutinio ilgio grandinės polihidroksialkanoatai;

OD – optinis tankis (angl. *Optical density*)

OTR – deguonies pernašos greitis;

P(3HB) – poli(3-hidroksibutiratas);

P(3HB-ko-3HHx) – poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoatas);

P(3HB-ko-3HV) – poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivaleratas);

P(3HB-ko-4HB) – poli(3-hidroksibutirat-ko-4-hidroksibutiratas);

P(3HB-ko-6HHx-ko-3HHx) – poli(3-hidroksibutirat-ko-6-hidroksiheksanoat-ko-3-hidroksiheksanoatas);

P(3HHx) – poli(3-hidroksiheksanoatas);

P(3HHx-ko-3HO) – poli(3-hidroksiheksanoat-ko-3-hidroksioktanoatas);

P(3HO) – poli(3-hidroksioktanoatas);

P(3HV) – poli(3-hidroksivaleratas);

P(4HB) – poli(4-hidroksibutanoatas);

PBAT – polibutileno adipato tereftalatas;

PBS – polibutilensukcinatas;

PGA – poliglikolidas;

PHA – polihidroksialkanotai;

PHB – polihidroksibutiratas;

PLA – polipieno rūgštis;

PLGA – poli(*D,L*-laktido-ko-glikolidas);

PP – polipropilenas;

Scl-PHA – trumpos grandinės polihidroksialkanoatai;

SDS – natrio dodecilsulfatas (angl. *Sodium dodecyl sulfate*)

TPS – termoplastinis krakmolos;

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

UV – ultravioletinis;

WVTR – vandens garų pernašos greitis.

Terminai:

phaC, *phaC1*, *phaC2* – polihidroksialkanoatų sintazės;

phaD – polihidroksialkanoatų transkripciją reguliuojantis baltymas;

phaF, *phaI* – polihidroksialkanoatų granulių formavimą reguliuojantys baltymai;

phaG – 3-hidroxiacil-KoA nešiklio transferazė;

phaZ – PHA depolimerazė.

Įvadas

Sintetiniai plastikai iš kitų polimerinių medžiagų išsiskiria tvirtumu, lengvumu ir ilgaamžiškumu, todėl net ir būdami biologiškai nesuyrantys, jie tapo pagrindine medžiaga, gerinančia žmonių gyvenimo kokybę ir pakeičiančia tokias medžiagas kaip stiklas ar popierius. Visgi naftos kilmės plastiko naudojimas tapo pasauline problema. Po vartojimo susidariusios plastiko atliekos kuria milžinišką atliekų srautą, kuris nėra efektyviai tvarkomas. Be to, susirūpinimas dėl spartaus iškastinio kuro išsekimo sukėlė naują susidomėjimą alternatyvių procesų kūrimu, siekiant gaminti biologinės kilmės polimerus, kurie patenkintų žmonių poreikius.

Iš įvairių biopolimerų grupių šiomis dienomis vieni plačiausiai nagrinėjamų yra polihidroksialkanoatai. Polihidroksilalkanoatai yra viduląsteliniai mikroorganizmų poliesteriai, kuriuos sintetina daugelis bakterijų rūšių, paprastai esant maistinių medžiagų apribojimui ir anglies šaltinio pertekliui, kaip atsarginę medžiagą gyvybinėms funkcijoms palaikyti. Dėl monomerų sudėties įvairovės, šie biopolimerai pasižymi dideliu biologiniu suderinamumu ir biologiniu skaidumu, todėl gali būti naudojami kompostuojant. Dėl didelio jų, kaip natūralių cheminių medžiagų, universalumo ir dėl to, kad nepažymi toksiškumu, polihidroksialkanoatai atkreipė dėmesį į įvairias taikymo sritis ir tapo perspektyvia alternatyva naftos chemijos polimerams [1].

Tyrimo tikslas – optimizuoti polihidroksialkanoatų gavimą iš įvairių bakterijų kultūrų.

Tyrimo uždaviniai:

1. ištirti anglies šaltinio įtaką bakterijų *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ir *Cupriavidus necator* kultūrų augimui;
2. įvertinti anglies šaltinio įtaką polihidroksialkanoatams susidaryti, naudojant *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ir *Cupriavidus necator* kultūras;
3. įvertinti gautų polihidroksialkanoatų antioksidacines savybes.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Bioplastikai

Šiomis dienomis plastikas yra tapęs viena pagrindinių žaliavų, naudojamų įvairiose pramonės šakose – nuo vienkartinų pakuočių, įrankių iki žaislų bei 3D spausdinių gamybos. Nors pramoniniu mastu plastikai pradėti gaminti tik XX amžiaus šeštajame dešimtmetyje, dėl puikių mechaninių savybių ir nedidelės kainos jie greitai tapo nepakeičiami tiek kasdieniame gyvenime, tiek įvairiose pramonės šakose [2]. EBPO duomenimis, nuo 2000 iki 2019 metų pasaulyje susidariusių plastiko atliekų kiekis išaugo daugiau nei dvigubai, iki 353 milijonų tonų. Beveik du trečdaliai atliekų susidaro iš plastiko, kurio gyvavimo trukmė yra trumpesnė nei penkeri metai, iš jų 40 % sudaro pakuotės, 12 % – plataus vartojimo prekės ir 11 % – drabužiai ir tekstilė. Taip pat yra žinoma, jog perdirbama tik 9 % plastiko atliekų, iš kurių 15 % surenkama perdirbimui, o 40 % išmetama kaip atliekos, dar 19 % sudeginama, 50 % patenka į sąvartynus, o 22 % išvengia atliekų tvarkymo sistemų ir patenka į nekontroliuojamus sąvartynus, yra deginamos arba patenka į sausumos ar vandens aplinką. Pagal turimus duomenis, 2019 metais į vandens aplinką pateko 6,1, o į vandenynus – 1,7 milijonų tonų plastiko atliekų. Šiuo metu jūrose ir vandenynuose yra apie 30 milijonų tonų plastiko atliekų, o dar 109 milijonų tonų yra susikaupusios upėse [3]. Dėl plastiko sancaupų upėse atliekų nuotėkis į vandenyną tęsis dar ne vieną dešimtmetį, net tuo atveju, jei netinkamai tvarkomų plastiko atliekų kiekį pavyktų gerokai sumažinti. Plastiką, kaip antropogeninę atlieką, kelia grėsmę vandenynų saugumui, vientisumui ir tvarumui, o tai yra susiję ne tik su klimato kaita, bet ir su vandenų ekosistemos gerbūviu bei žmonijos sveikata [4].

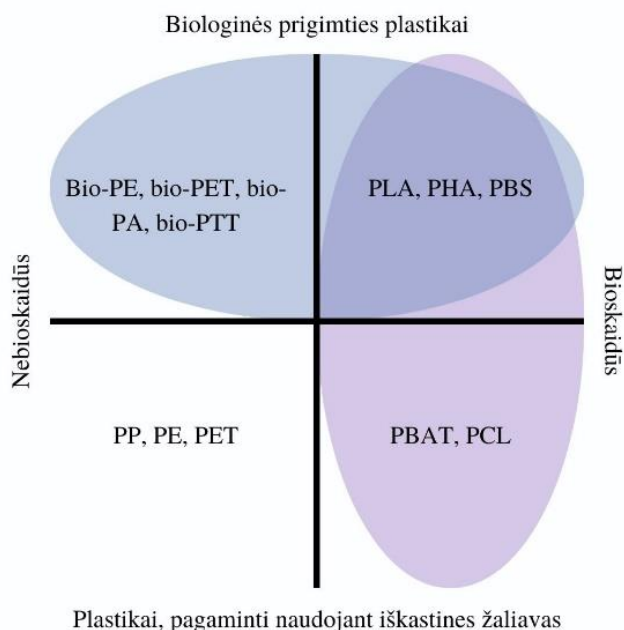
Plastiko gamyba daro reikšmingą poveikį visuotiniam atšilimui. Tai yra pagrindinis šiltnamio efektą sukeliančių dujų šaltinis. Taip yra todėl, kad plastikai paprastai gaminami iš iškastinio kuro, pavyzdžiui, naftos ir gamtinių dujų, kurias išgaunant ir perdirbant išsiskiria anglies dioksidas [5]. Plastiką taip pat gali daryti didelį poveikį aplinkai, jei yra netinkamai apdorojamas. Irdamas jis išskiria metaną – šiltnamio efektą sukeliančias dujas, kurios dėl savo potencialo didinti visuotinį atšilimą yra daug kenksmingesnės už anglies dioksidą. Panašus efektas pastebimas plastiką deginant, kuomet į atmosferą išsiskiria šiltnamio efektą sukeliančios dujos [6].

Plastikas yra susijęs su kenksmingu poveikiu sveikatai tiek gamybos metu, tiek naudojant jo gaminius. Plastiko gaminiuose gali būti įvairių toksiškų cheminių medžiagų, pavyzdžiui, bisfenolio A, ftalatų ir antipirenų. Šie cheminiai junginiai gali išsiskirti iš plastiko ir prasiskverbti į maistą ir gėrimus, o jų poveikis yra susijęs su įvairiais galimais padariniais sveikatai, įskaitant vystymosi ir reprodukcinis sutrikimus, vėžį ir endokrininės sistemos pakitimus [7]. Apie žalą žmonių sveikatai vis garsiau kalbama ir dėl mikroplastiko, mažesnių nei 5 mm dydžio plastiko dalelių, kadangi jų vis dažniau aptinkama aplinkoje, o žmonės jų gauna su maistu ir vandeniu. Nors mikroplastiko poveikis žmonių sveikatai nėra iki galo iširtas, kai kurie tyrimai rodo, kad jis gali turėti neigiamą poveikį imuninei sistemai ir sutrikdyti mikrobiomą [8].

Siekiant sumažinti plastiko keliamą taršą, naudojamas bioplastikas, kuris yra apibrėžiamas kaip biologiškai skaidus ir (arba) gaunamas iš atsinaujinančių išteklių. Biologiškai skaidų bioplastiką aplinkoje esantys mikroorganizmai paverčia vandeniu, anglies dioksidu ir organiniais irimo produktais. Naudojant bioplastiką, mažėja plastiko atliekų apimtis aplinkoje ir taip galima gerokai sumažinti anglies pėdsaką išteklių gavybos etape.

Plastikai pagal žaliavų kilmę ir biologinį skaidumą yra suskirstyti į keturias grupes. 1.1 pav. matoma horizontalioji matricos ašis žymi plastiko biologinį skaidumą, o vertikali – ar medžiaga gauta iš naftos chemijos žaliavų, ar iš atsinaujinančių medžiagų:

1. plastikas, kuris nėra biologiškai skaidus ir yra pagamintas iš iškastinio kuro – ši kategorija apima vadinamąjį klasikinį arba tradicinį plastiką,
2. bioplastikai, kurie pasižymi biologiniu skaidumu ir gaminami iš biomasės žaliavų,
3. bioplastikai, kurie yra biologiškai skaidūs, bet yra gaminami iš iškastinio kuro,
4. bioplastikai, pagaminti iš biomasės, tačiau nėra biologiškai skaidūs.



1.1 pav. Bioplastikų skirstymo matrica

Tai reiškia, kad biologinio pagrindo plastikai nebūtinai yra biologiškai skaidūs, o kai kurie nebiologiniai plastikai, pavyzdžiui, PBAT, pasižymi bioskaidumu. Net iš kai kurių įprastinių plastikų, pavyzdžiui, mažos molekulinės masės poliolefinų, gali susidaryti mažos molekulinės masės produktai, kuriuos mikroorganizmai gali panaudoti abiotiniams procesams, tokiems kaip fotodegradacija ir terminis skilimas. Reikšmingas biologinis skaidymas vyksta, kai vidutinė molekulinė polimero masė neviršija 5000 Da. Sumažėjęs karbonilinių grupių skaičius skaidymo metu yra geras rodiklis, patvirtinantis mikroorganizmų augimą. Galutiniai šių mažesnių poliolefinų skilimo produktai yra vanduo ir anglies dioksidas. Į šiuos polimerus galima pridėti skaidymo priedų, kad pagreintų jų skilimo greitį, paprastai tai būna metalų druskos [9].

Bioplastikai pagal kilmę taip pat gali būti skirstomi ir į gamtinius polimerus, tokius kaip krakmolai, baltymai, ir bioskaidžius poliesterius, tokius kaip PHA, PLA. Polimerai, kurių sudėtyje yra natūralaus arba modifikuoto krakmolo dalių, priskiriami krakmolo polimerų kategorijai. Šiai grupei taip pat galima priskirti natūralių ar sintetinių plastikų mišinius su krakmolu ir polimerus, pagamintus fermentuojant krakmolą. Ši grupė apima apie 50 % pasaulinės bioplastikų rinkos ir sudaro daugelį šiuo metu naudojamų termoplastikų. Krakmolai laikomi puikia alternatyva įprastiniams plastikams, nes yra biologiškai skaidūs ir pasižymi pakankamu šiluminiu stabilumu jo apdorojimo metu. Tačiau kadangi tai yra hidrofiliškas molekulinis, dėl įprastinių plastikų hidrofobiškumo jis praranda mechanines savybes ir sukelia mažą sukibimą, todėl blogai formuojasi krakmolo ir polimero sąsajos [10]. Gryno

krakmolo naudojimas nėra perspektyvus, nes jis nėra atsparus drėgmei ir nepasižymi pakankamomis savybėmis lydymo procesui. Termoplastinio krakmolo sudėtyje yra krakmolo ir plastifikatoriaus, termomechaninė energija veikia polimerą, todėl tarp krakmolo ir plastifikatoriaus susidaro vandeniliniai ryšiai, taip nutrūksta vandeniliniai ryšiai tarp krakmolo hidroksilo grupių. Nepakankamas plastifikatorių kiekis trukdo susidaryti homogeniškam sluoksniui, todėl kai kurios krakmolo granulės gali likti nepakitusios. Termoplastinio krakmolo trūkumai yra mažas atsparumas vandeniui ir prastesnės mechaninės savybės [11].

Baltyminiai biopolimerai gaunami iš įvairių šaltinių, įskaitant gyvūninius subproduktus, pieną ir augalus. Baltymų pagrindu pagaminti biopolimerai gali būti perdirbami į įvairias formas, įskaitant plėveles, gelius, pluoštus ir dangas. Juos taip pat galima modifikuoti cheminiais ar fizikiniais metodais, kad pagerėtų jų savybės, pavyzdžiui, padidėtų atsparumas vandeniui ar biologinis suderinamumas [9]. Kazeino polimerų plėvelės gaminamos denatūruojant baltymus karščiu, todėl susidaro disulfidiniai ryšiai, kurie daro įtaką plėvelės struktūrai. Plastifikatorių, pavyzdžiui, glicerolio ar sorbitolio, pridėjimas gali užtikrinti plėvelės elastingumą. Kazeino plėvelės veikia kaip deguonies barjeras, todėl pastebėta, kad tokios savybės padeda prailginti maisto produktų, pavyzdžiui, sūrio, galiojimo laiką [12]. Pagrindinės kazeino, kaip biopolimero, naudojimo problemos yra susijusios su žaliavos gavyba, sudėtingais gamybos procesais ir prastu atsparumu drėgmei. Šiuo metu siekiant padidinti hidrofobiškumą ir sumažinti polimero tirpumą taikomi tokie metodai, kaip polimero apdorojimas aukšto slėgio anglies dioksidu [13].

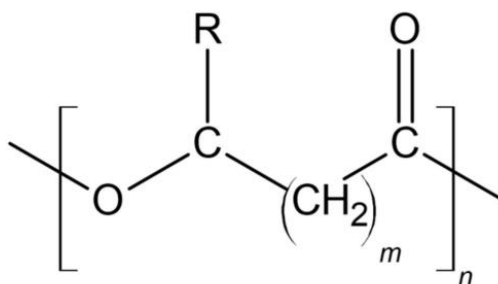
Bioplastikų potencialas sprendžiant plastiko atliekų problemą yra ribotas, jei po naudojimo jie nėra veiksmingai skaidomi. Polimerai gali suirti įvairiais būdais, įskaitant biologinį, cheminį, mechaninį irimą bei fotodegradaciją, tačiau bioskaidumas yra kompleksinis procesas, kurio metu veikia biologiniai, cheminiai ir fiziniai veiksniai. Biologiškai skaidžių polimerų atveju biologinis skaidymas vyksta dviem pagrindiniais etapais. Pirmajame etape polimerai suskaidomi į mažos molekulinės masės oligomerinius produktus tiesioginės hidrolizės, oksidacijos, pereinančios į hidrolizę, ir depolimerizacijos būdais. Kad reakcijos įvyktų, išsiskiria tiek intraląsteliniai, tiek ekstraląsteliniai fermentai, kurie polimerus depolimerizuoja už ląstelės ribų. Vėliau mikroorganizmai asimiliuoja susidariusius fragmentus, kad galėtų juos panaudoti kaip maisto medžiagas, paversdami jas į anglies dioksidą, vandenį, mineralines medžiagas ir biomasę per procesą, vadinamą mineralizacija [14,15].

1.2. Polihidroksialkanoatų charakteristika

Polihidroksialkanoatai (PHA) yra biopolimerai, kuriuos mikroorganizmai sintetina ir ląstelės viduje kaupia kaip granules maisto medžiagų rezervui. Prancūzų mokslininkas Lemoigne 1925 metais pirmą kartą atrado PHA *Bacillus megaterium* poli-3-hidroksibutirato (P(3HB)) pavidalu. Iki šių dienų oficialiai patvirtinta, jog egzistuoja virš 155 unikalių PHA monomerų variantų, nustatyta daugiau kaip 90 gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų genčių, sintetinančių PHA tiek aerobinėmis, tiek anaerobinėmis sąlygomis [16].

Bakterijas pagal PHA biosintezės ypatumus galima suskirstyti į dvi grupes. Pirmajai grupei priklausančios bakterijos tam, kad galėtų kaupti PHA, privalo turėti ribotą maistinių elementų, pavyzdžiui, fosforo, azoto, deguonies ar magnio, kiekį ir augimo fazėje PHA nekaupia. Antrosios grupės bakterijos kaupia PHA augimo fazės metu ir joms nereikia maistinių medžiagų apribojimo. Pavyzdžiui, bakterijos *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans* ir *Pseudomonas putida* priklauso pirmajai grupei, o rekombinantinė *Escherichia coli* – antrajai [1].

PHA molekulėse hidroksirūgščių monomerai yra sujungti esteriniais ryšiais. Šie ryšiai susidaro sujungiant vieno monomero karboksigrupę su kito hidroksigrupe. Bendra polimero struktūrinė formulė pavaizduota 1.2 pav. Priklausomai nuo anglies atomų skaičiaus monomero grandinėje, PHA skirstomi į dvi pagrindines grupes – trumpos grandinės PHA (scl-PHA) ir vidutinio ilgio PHA (mcl-PHA). Kai kuriuose šaltiniuose minimi ir ilgos grandinės PHA (lcl-PHA), tačiau iki šių dienų jie nėra išsamiai ištirti [17]. Scl-PHA molekulėje monomeras susideda iš 3 – 5 anglies atomų, tokius biopolimerus sintetina didelis skaičius bakterijų, tokių kaip *Cupriavidus necator*. Mcl-PHA susideda iš monomerų, turinčių 6 – 14 anglies atomus, tokio tipo biopolimerus akumuliuoja *Pseudomonas* rūšies bakterijos [1].



1.2 pav. PHA struktūrinė formulė, čia m – nuo 1 iki 3, n – polimerizacijos laipsnis, R - alkilo grupė, kurios grandinės ilgis ir struktūra gali skirtis

PHA struktūra priklauso nuo anglies šaltinio ir naudojamos bakterijų padermės. Šoninė grandinė gali būti sočioji arba nesočioji, ji gali turėti šakotų, aromatinių, halogenintų ar net epoksidintų monomerų [1]. Bakterijos geba sintetinti kopolimerus, naudojant skirtingus substratus. Pavyzdžiui, P. Basnett ir kt. darbe [18] minima, jog be homopolimerų P(3HB), *Bacillus* rūšies bakterijos gali sintetinti tokius kopolimerus kaip P(3HB-ko-3HV), P(3HB-ko-3HHx) ar P(3HB-ko-6HHx-ko-3HHx), kaip anglies šaltinį naudojant atitinkamai butirato, valerato ir heksanoato grupę turinčius junginius. Be to, Q. Wang tyrime [19] nustatyta, kad bakterijų fermentacijos proceso metu pakaitomis keičiant anglies šaltinius, mikroorganizmai sintetina PHA blokinius kopolimerus.

PHA fizikines savybes lemia anglies atomų skaičius monomero vienetė. P(3HB) ir P(3HB-ko-3HV) yra plačiausiai išnagrinėti scl-PHA šeimos nariai. Scl-PHA paprastai yra labai kristaliniai, standūs ir trapūs polimerai. Tačiau, didėjant anglies atomų skaičiui tarp esterinių jungčių, elastingumas didėja, o trapumas mažėja. Mcl-PHA, tokie kaip P(3HHx) ir P(3HO), yra pusiau kristaliniai polimerai, tačiau, priešingai nei scl-PHA, jie visi yra labai elastingi. Kaip matyti iš kai kurių 1.1 lentelėje pateiktų pavyzdžių, PHA molekulinės struktūros įvairovė suteikia polimerams platų mechaninių ir šiluminių savybių spektrą [20-22]. Palyginimui pateikta ir PP charakteristika, todėl galima pastebėti, jog PHA pasižymi panašiomis fizikinėmis savybėmis [23].

1.1 lentelė. PHA fizikinės savybės

Polimeras	Lydimosi temperatūra, °C	Tempimo jėga, MPa	Jungo modulis, GPa	Pailgėjimas iki nutrūkimo, %
P(3HB)	175	40	3,5	5 – 6
P(3HV)	106,2	6,6	0,39	3,5
P(4HB)	60	50	0,07	1000
P(3HB-ko-3HV)	137 – 170	20 – 25	0,7 – 2,9	50
P(3HB-ko-4HB)	152	26	0,3 – 3	444
P(3HHx-ko-3HO)	61	9	0,008	380
P(3HB-ko-3HHx)	97	4,5	0,135	107,7
PP	160 – 170	30 – 50	0,8 – 2,5	10 – 30

Norint pagerinti PHA polimerų fizikinės savybės bei optimizuoti panaudojimo ir perdirbimo galimybes, atliekamos biologinės, cheminės ar fizikinės modifikacijos. Šios modifikacijos gali pakeisti jų mechanines savybes, paviršiaus struktūrą, amfifilinį pobūdį ir skilimo greitį, kad atitiktų konkrečius jų naudojimo reikalavimus [24].

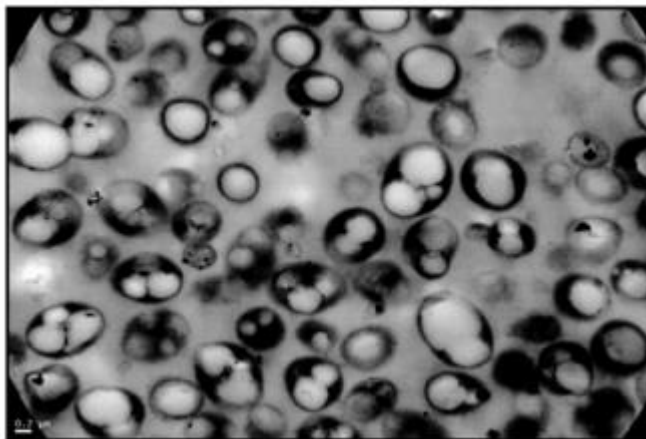
Cheminės modifikacijos leidžia į PHA įtraukti funkcines grupes, kurios yra sudėtingai gaunamos biologiniu būdu. Cheminių modifikacijų metodai gali būti įvairūs: epoksidinimas, karboksilinimas, chlorinimas, skiepijimas (katijoninis, fermentinis, radiacinis ir laisvųjų radikalų skiepijimas), maišymas, esterifikacija pagrįsta kopolimerizacija, funkcinių grupių įtraukimas į PHA terminio skilimo, metalizacijos ir tiolinimo būdu [25]. Z. Raza ir kt. [26] aprašytas PHB ir PHO chlorinimas buvo atliekamas pakaitų reakcijos būdu, per polimero tirpalą chloroforme leidžiant chloro dujas. Šio proceso metu įvyko hidrolizė, todėl pastebėtas polimerų molekulinės masės sumažėjimas. Chloruoto PHO stiklėjimo ir lydimosi temperatūros padidėjo, o PHB lydimosi temperatūra sumažėjo nuo 170 °C iki 148 °C, o jo stiklėjimo temperatūra pakito nuo -20 °C iki 10 °C.

Polimerų maišymas yra labai veiksmingas ir paprastas būdas gauti naują medžiagą, pasižyminčią patobulintomis savybėmis. Tai galima pasiekti parenkant tinkamus mišinio komponentus, optimizuojant jų sudėtį bei keičiant maišymo sąlygas. PHA galima maišyti tiek su sintetiniais biologiškai skaidžiais polimerais, tiek ir su natūraliomis žaliavomis [27]. P. Vostrejs ir kt. [28] tyrimo tikslas buvo ištirti vynuogių sėklų lignino įtaką PHA/PHB plėvelės fizikinėms savybėms. Šiuo tikslu buvo paruoštos polimerinės plėvelės, kurių pagrindą sudaro didelio kristalinio P(3HB) ir amorfinio PHA mišinys. P(3HB)/PHA plėvelės pasižymėjo 240 MPa Jungo moduliui, didžiausiu 6,6 MPa tempimo stipriu ir 95,2 % pailgėjimu iki nutrūkimo. PHB/PHA plėvelių fizikinės savybės buvo pakeistos pridėjus 1-10 % masės vynuogių sėklų lignino (GS-L). Tyrimai atskleidė, kad 5% lignino koncentracija pailgėjimo iki nutrūkimo vertę padidino nuo 8,4 iki 82 %, o tempimo jėgą sumažino nuo 2050 iki 200 MPa. Toksikologiniu požiūriu kompostai, gauti po PHA plėvelių biologinio skaidymo, įrodė PHB/PHA/GS-L medžiagų netoksiškumą, o jų skilimo produktai turėjo teigiamą poveikį baltųjų garstyčių (lot. *Sinapis alba* L.) sėklų dygimui.

1.3. PHA biosintezė

Polihidroksialkanoatai yra vandenyje netirpūs junginiai, kuriuos mikroorganizmai sintetina ir kaupia $0,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ skersmens granuliu pavidalu (1.3 pav.) nepalankiomis aplinkos sąlygomis, pavyzdžiui, esant anglies pertekliui ir ribotai pagrindinių augimo maistinių medžiagų, tokių kaip azoto ar fosfatų

koncentracijai. Esant anglies šaltinio trūkumui, sukaupti biopolimerai yra depolimerizuojami, o jų skilimo produktai gali būti naudojami kaip anglies ir energijos šaltinis [29]. Ataskaitose teigiama, jog bakterijų genčių, kaupiančių PHA kaip tarpląstelines granules, skaičius gali viršyti 75 [30]. PHA granulių polimero paviršiuje yra nemažai baltymų, o tai leidžia manyti, kad jos yra ne tik energijos šaltinis, bet ir supramolekuliniai kompleksai, atliekantys tam tikras funkcijas [31].



1.3 pav. Transmisijos elektroniniu mikroskopu padaryta *Cupriavidus necator* su PHA granulėmis nuotrauka

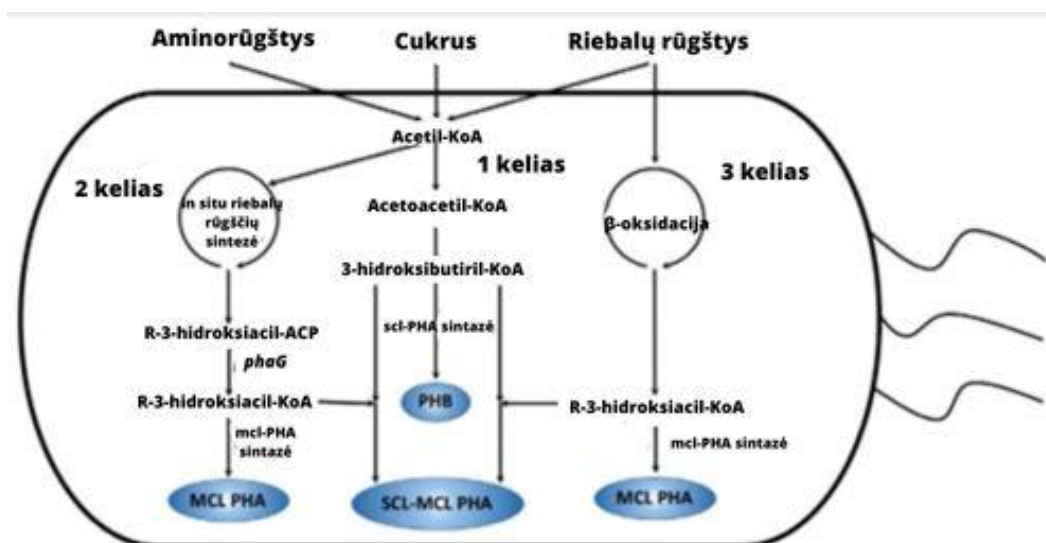
Anglies šaltiniai PHA biosintezėje yra skirstomi į PHA struktūriškai susijusius ir nesusijusius. Pavyzdžiui, riebalų rūgštys savo struktūra panašios į hidroksialkano rūgštis, todėl jos vadinamos struktūriškai susijusiomis, o gliukozė savo struktūra nėra panaši į PHA ir yra laikoma struktūriškai nesusijusiu anglies šaltiniu. Šiuo metu yra žinomi trys pagrindiniai PHA sintezės mechanizmai (1.4 pav.), kurie gali būti toliau plėtojami ir apimti mažiausiai 12 įvairių PHA sintezės būdų. Visi šie keliai yra sujungti su kitais vietiniais arba dirbtiniais medžiagų apykaitos keliais ir leidžia susidaryti įvairiems PHA [32].

Pirmasis būdas, dar vadinamas acetyl-KoA į 3-hidroksibutiril-KoA keliu, iliustruoja scl-PHA sintezę, kai du acetyl-KoA, susidarantys iš cukraus, riebalų rūgščių arba aminorūgščių, β -ketotiolazės ir acetoacetyl-KoA reduktazės paeiliui paverčiami hidroksibutiril-KoA ir scl-PHA sintezės polimerizuojami, kad susidarytų PHB. Šis kelias paprastai būdingas *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus necator* ir *Alcaligenes eutrophus*, kadangi šiuose mikroorganizmuose koduojamas genas *phaC*, lemiantis scl-PHA sintezės veikimą [32].

Antrasis būdas yra β -oksidacijos kelias, jo metu naudojami tarpiniai β -oksidacijos ciklo produktai mcl-PHA sintezei, naudojant riebalų rūgštis kaip anglies šaltinį. Riebalų rūgštys pirmiausia paverčiamos į enoil-KoA. Vėliau enoil-KoA R-3-hidroksiacyl-KoA hidratazė paverčia į R-3-hidroksiacyl-KoA, kuris yra mcl-PHA polimerizacijos, kurią katalizuoja mcl-PHA sintezė, pirmtakas. β -oksidacijos keliu PHA paprastai sintetina *Pseudomonas putida*, *P. oleovorans* ir *P. aeruginosa* [32].

Trečiasis kelias apima riebalų rūgščių sintezės *in situ* ciklą, kurio metu gaunamas R-3-hidroksiacyl-CP, skirtas PHA sintezei. Pagrindinis fermentas, 3-hidroksiacylacil-ACP transferazė (*phaG*), paverčia 3-hidroksiacyl-CP į 3-hidroksiacyl-KoA, skirtą PHA sintezei. Riebalų rūgščių sintezės *in situ* ir β -oksidacijos ciklai gali būti nepriklausomai aktyvūs ir tiekti pirmtakus PHA sintezei, todėl

Pseudomonas aeruginosa gali gaminti mcl-PHA atsitiktinius kopolimerus, kai mikroorganizmai auginami naudojant struktūriškai nesusijusius anglies šaltinius [32].



1.4 pav. PHA biosintezės mechanizmas [32]

Nors technologiniai PHA gamybos aspektai, įskaitant bakterinę fermentaciją, išskyrimą ir fizikinį bei cheminį polimero apibūdinimą, per pastaruosius kelis dešimtmečius buvo išsamiai ištirti, žinios apie reguliuojančius mechanizmus molekulinio lygmeniu yra gana ribotos, ypač mcl-PHA sintezės atveju. Molekulinio lygmeniu jau ištirti šeši baltymai, tiesiogiai dalyvaujantys mcl-PHAs biosintezėje ir skaidyme: dvi polimerazės – *phaC1* ir *phaC2*, depolimerazė – *phaZ*, du fazinai – *phaI* ir *phaF*, reguliaciniai baltymai – *phaD* ir *phaG* [1].

Vienas iš labiausiai ištirtų PHA sintetinančių mikroorganizmų yra *Bacillus* rūšies bakterijos. Vienas iš šių bakterijų naudojimo PHA gamyboje privalumų yra tai, kad jų išorinėje membranoje nėra endotoksinų ar lipopolisacharido, todėl atsiranda galimybė PHA naudoti biomedicininiais tikslais. Be to, *Bacillus* rūšys sintetina tokius fermentus kaip amilazė ir proteinazė, todėl gali naudoti nebrangius anglies šaltinius, pavyzdžiui, įvairias pramonines atliekas, o tai sumažina PHA gamybos proceso kainą. Be homopolimerų, tokių kaip P(3HB), *Bacillus* rūšys taip pat gamina kopolimerus, tokius kaip P(3HB-ko-3HV), P(3HB-ko-3HHx), taip pat P(3HB-ko-6HHx-ko-3HHx) terpolimerą, kai bakterijos kultivuojamos gamybos terpėje, kurioje yra anglies šaltinių, tokių kaip atitinkamai butiratas, valeratas, heksanoatas, oktanoatas, dekanooatas ir kaprolaktonas [33]. S. P. Valappil ir kt. [34] tyrė *Bacillus cereus* augimą ir PHA sintezę, naudojant įvairius anglies šaltinius ir pastebėjo, kad *Bacillus cereus*, auginamas nelyginio skaičiaus anglies atomų grandinės riebalų rūgštyse, pavyzdžiui, propionate ir heptanoate, gamina P(3HB-ko-3HV), o lyginio, pavyzdžiui, heksanoate ir dekanooate, gamina P(3HB).

Cupriavidus necator yra kita bakterijų rūšis, kuri yra plačiai ištirta PHA gamybai. Šie mikroorganizmai paprastai siejami su P(3HB) gamyba ir pasižymi plačiu naudojamų anglies šaltinių spektru, įskaitant cukrų ir augalinius aliejus. *Cupriavidus necator* gali sukaupti iki 10 % PHA sausos masės, kai auginama maistingų medžiagų turtingoje terpėje, ir iki 80 % PHA sausos masės, kai anglies šaltinių yra daug, o kitų maistingų medžiagų kiekis ribotas [29]. P. Basnett ir kt. straipsnyje [18] nurodoma, kad genetiškai modifikuota *Cupriavidus necator* kultūra galėjo gaminti 80 % sausos

masės P(3HB), kaip anglies substratą naudodamas gliukozę, o į PHA sintezės terpėje esančią gliukozę su pertraukomis pridėdant propiono rūgšties, buvo gaunamas P(HB-ko-HV).

1.4. Komercinė gamyba

Nepaisant biologinės kilmės plastikų privalumų prieš sintetinius, pagrindinė jų platus masto gamybos kliūtis yra didelė kaina. Šiuo metu tik 1 % kasmet pagaminamo plastiko sudaro bioplastikas [35]. 1.2 lentelėje pateikti duomenys, nurodantys PHA komercinius gamintojus bei jų gamybos charakteristiką [36].

1.2 lentelė. PHA komerciniai gamintojai [36]

Gamintojas	PHA ir prekinis pavadinimas	Naudojamas mikroorganizmas	Gamybos pajėgumas, tonomis per metus	Kilogramo kaina, eurai 2010-2017 metų laikotarpyje
Telles (JAV)	PHB Mirel™	<i>Ralstonia eutropha</i>	50000	1,50
P&G (JAV)	PHBH Nodax™	Nenurodytas	20000-50000	2,50
Tianan Biologic, Ningbo (Kinija)	PHBV, PHBV + Enmat®	<i>Ralstonia eutropha</i>	10000	3,26
Biomer (Vokietija)	PHBV, PHB Biomer®	<i>Alcaligenes latus</i>	50	3,00-5,00

Sintetinių polimerų, tokių kaip polipropilenas ir polietilenas, rinkos kaina yra 0,3 euro centų už kilogramą, o PHA kaina yra maždaug 3-4 kartus didesnė ir siekia 1,10 euro už kilogramą. Anglies šaltinio kaina yra pagrindinis veiksnys, sudarantis 50 % visų gamybos sąnaudų. Todėl visame pasaulyje daugiausia dėmesio skiriama moksliniams tyrimams mažinti gamybos sąnaudas naudojant įvairias atliekas kaip anglies šaltinį [37].

Kadangi gaminant, perdirbant ir vartojant maistą susidaro dideli kiekiai atliekų srautų, pasiūlytos technologijos, kaip maisto atliekas paversti PHA. Kiekviena maistinės kilmės žaliava yra sudėtinga ir jai reikalingi įvairūs pirminiai procesai, bakterijų padermės, kultivavimo aplinka ir pirminis apdorojimas. Maisto atliekose dažnai aptinkamos organinės medžiagos yra sudėtingos struktūros, kurių PHA gaminantys mikrobai negali tiesiogiai panaudoti. Tokiais atvejais reikia naudoti pirminio apdorojimo arba perdirbimo metodus, kad maisto atliekose esantys sudėtingi junginiai taptų PHA pirmtakais. Pirmtakų pavyzdžiai gali būti paprastieji cukrūs, tokie kaip, gliukozė ar laktozė, taip pat rūgštys, pavyzdžiui, acto ar propiono rūgštys. Daugelis paprastesnių maisto atliekų yra hidrolizuojamos, kad virstų tinkamomis pirmtakų molekulėmis, kurios vėliau patenka tiesiai į gryną tinkamos bakterijos kultūrą. Šiuo metu tiriamos galimybės gaminti PHA naudojant išrūgas, krakmolą, aliejų, lignoceliuliozines medžiagas, ankštinių augalų atliekas ir cukraus atliekas [38].

Viena iš dominančių maisto pramonės atliekų PHA gamybai yra pieno išrūgos. Jų sudėtyje yra laktozė, baltymai, lipidai, vandenyje tirpūs vitaminai, mineralinės druskos ir kiti mikrobu augimui būtini elementai. Nors išrūgos gali būti panaudotos laktozės, kazeino ir baltymų milteliams gaminti, daugiau nei 50 % jų patenka į nuotekų valymo įrenginius arba jomis šeriami gyvūnai [39]. Be to, M. Koller ir kt. tyrimo duomenimis, per metus pasaulyje susidaro nuo 1,15 iki 1,6 tonos išrūgų, o tai viršija poreikius išrūgų milteliams gaminti [40]. Kai išrūgos naudojamos tokiems baltymams kaip laktoferinas ar laktofericinas gaminti, daug laktozės turintis išrūgų retentatas lieka atliekomis, kurias reikia pašalinti. Išrūgos taip pat yra varškės, grietininio sūrio ir graikiško jogurto gamybos šalutinis

produktas. Nors išrūgos gali būti naudojamos kaip pašaras gyvūnams, dėl didelio rūgščių kiekio jas sunku perdirbti į tradicinius išrūgų baltymų koncentratų [41].

Buityje ir pramonėje panaudoti aliejai yra potencialūs anglies šaltiniai, iš kurių galima gaminti PHA. Šių aliejų paprastai nereikia iš anksto apdoroti ir jie gali būti tiesiogiai dedami į terpę kaip anglies substratas. S. Obruca ir kt. straipsnyje [42] aprašytas rapsų, palmių ir saulėgrąžų aliejų atliekų panaudojimas kaip anglies šaltinių PHA gamybai naudojant *Cupriavidus necator* H16. Tyrimas parodė, kad sausų ląstelių koncentracija (g/l^{-1}) ir PHB koncentracija (%) skirtingoms aliejaus rūšims buvo atitinkamai 10,8 ir 67,9 %, 11,9 ir 58,0 % bei 10,8 ir 52,4 %. W. N. Chaudhry ir kt. [43] naudojo kukurūzų aliejų ir nustatė, kad *Pseudomonas* padermė galėjo pasiekti $12,53 \text{ g/l}^{-1}$ sausųjų ląstelių masę, o mcl-PHA kiekis buvo 35,63 %. Atliktas tyrimas rodo, kad naudojant atliekinį aliejų kaip anglies šaltinį, ląstelės gali gaminti dideles PHA koncentracijas, palyginti su sausos ląstelės svoriu, esant mažam ląstelių titrui.

Melasa, susidaranti kaip pašalinis produktas cukraus pramonėje, yra svarbus anglies šaltinis PHA gamyboje. Nustatyta, jog per metus šios medžiagos susidaro apie 50 milijonų tonų. Melasa susideda iš sacharozės, gliukozės, fruktozės bei nedidelės vitaminų ir mikroelementų koncentracijos. Melasos cheminių sudedamųjų dalių koncentracija priklauso nuo cukraus gamybos šaltinio ir rafinavimo mechanizmo [44]. J. S. Kingsly ir kt. darbe [45] įrodyta, kad *Enterobacter cloacae* gali naudoti cukranendrių melasą kaip pigų anglies šaltinį PHA gamybai. Gautas PHA buvo apibūdintas ir patvirtintas FTIR spektroskopija. Nustatyta didžiausia PHA išeiga – 4,13-4,98 g/l arba 48-56 % – gauta vykdant periodinę fermentaciją, kai kultūros sąlygos buvo tokios: pH 7, melasos koncentracija 4 %, inokulato koncentracija 2 %. R. R. Dalsasso [46] gauti darbo rezultatai rodo, kad melasos mišiniai padėjo pasiekti didesnę specifinę augimo greitį eksponentinėje fazėje nei naudojant brangesnius anglies šaltinius, pavyzdžiui, gliukozę. Sudėtingas melasos ir kitų cukraus bei bioetanolio gamybos atliekų maistinių medžiagų mišinys lėmė dvi skirtingas eksponentinio augimo fazes, kurių vertės buvo 0,37 ir $0,1 \text{ h}^{-1}$. Be to, melasoje esant mažam azoto kiekiui, ląstelių augimas buvo ribotas ir skatino PHB susidarymą – jo susikaupė 56 %.

1.5. PHA panaudojimas

1.5.1. Panaudojimas maisto pakuočių gamyboje

PHA, priklausantis vienintelei biologiškai skaidžių ir biologinės kilmės biopolimerų grupei, dėl gerų biologinio skaidumo ir atsparumo deguonies pralaidumui savybių gali būti perdirbamas į butelius, maišelius ir plėveles, naudojant įpurškimo, pūtimo ir presavimo metodus [47]. V. Chea ir kt. straipsnyje [48] ištirta P(HB-ko-HV) plėvelės sorbcinė elgsena, mechaninės ir barjerinės savybės realiomis laikymo ir sąlyčio su maistu sąlygomis. Nustatyta, kad P(HB-ko-HV) plėvelė buvo labai stabili visuose tirtuose maisto skysčių imitatoriuose (vandenyje, acto rūgštyje 3 %, etanolyje 20 %, ir alyvuogių aliejuje).

B. Dalton ir kt. straipsnyje [49] aptartos kai kurių bioplastikų barjerinės savybės. Duomenys rodo, kad P(HB-ko-HV) pasižymi mažiausiomis deguonies dujų barjerinėmis (OTR) savybėmis, tai reiškia, jog maistas tokioje pakuotėje būtų ilgiausiai apsaugotas nuo aplinkos dujų poveikio. Taip pat pastebėta, kad PHA turi geresnes drėgmės ir dujų barjero savybes nei jo komerciniai analogai PLA ir PCL, pavyzdžiui, PHBV vandens garų barjerinės savybės (WVTR) yra beveik 6 kartus geresnės nei PCL ir daugiau nei 2 kartus geresnės nei PLA, deguonies prasiskverbimo greitis PCL ir PLA yra 2 kartus didesnis nei PHBV. Apibendrinti šaltinio duomenys pateikti 1.3 lentelėje.

1.3 lentelė. Bioplastikų barjerinės savybės [49]

Bioplastikas	WVTR (g/m ² /24h ⁻¹)	OTR (cm ³ m ⁻² /24h ⁻¹)
PCL plėvelė	800	500
PLA plėvelė	350	410
PHB plėvelė	300	425
P(HB-ko-HV)	138	218
PBS	84	737
Žirnių pagrindu pagamintas TPS	200	276
PBAT	540	1530
Celiuliozės acetatas	1090	650

1.5.2. Panaudojimas audinių inžinerijoje

PHA ir jo kompozitai pasižymi savybėmis, kuriomis rodo potencialą panaudojimui audinių inžinerijoje kaip biomedžiagos karkasams gaminti. Lyginant su kitais polimerais, pavyzdžiui, poli(*D,L*-laktido-ko-glikolidas) (PLGA), poliglikolio rūgšties (PGA) ir polipieno rūgšties (PLA), PHB karkasų vietinis pH skaidymo metu išlieka nepakitęs, todėl juos gerai toleruoja imuninė sistema. P(HB-ko-8%-HV)/hidroksiapatito (30 % masės) mišinio mechaninis gniuždymo stipris prilygsta žmogaus kaulų mechaniniam stiprumui (62 MPa), sukelia mažesnę uždegiminę reakciją ir didesnę mineralizaciją [50]. J. Zhang ir kt. [51] pastebėjo, kad lyginant su PLA ir PHB, P(HB-ko-HHx) geriausiai veikė triušių kaulų čiulpų ląstelių prisitvirtinimą ir proliferaciją, taigi ir kaulinio audinio regeneraciją. PHB, sumaišytas su hidroksiapatitu, pagerino gniuždymo tamprumo modulį, maksimalų įtempį ir osteoblastų reakcijas, įskaitant ląstelių augimą ir šarminės fosfatazės aktyvumą tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. Į PHB karkasus įterpus nano stiklo pluoštą, pagerėjo į osteoblastus panašių MG63 ląstelių proliferacija, palyginti su gryniais osteoblastais. Taip pat buvo atlikti tyrimai, įrodantys PHA įtaką kremzlinio audinio formavimuisi. Iš triušio sąnario kremzlės išskirtų chondrocitų trimačiam augimui buvo paruoštos P(HB-ko-HHx)/PHB akytos karkaso formos. Chondrocitai geriau dauginosi ant P(HB-ko-HHx)/PHB karkasų nei ant PHB karkasų. Taip pat pastebėta, kad kolageno kiekis visuose PHB-ko-HHx turinčiuose karkasuose didėjo su auginimo laiku, o tai rodo, kad P(HB-ko-HHx) buvimas PHB labai palankus sąnario kremzlės chondrocitų ekstraląstelinio matrikso gamybai tiek *in vitro*, tiek *in vivo*, todėl P(HB-ko-HHx) teigiamai veikia ekstraląstelinio matrikso gamybą.

1.5.3. Panaudojimas vaistų pernašoje

Pastaraisiais metais PHA vis dažniau naudojami kaip medžiagos, skirtos vaistams inkapsuliuoti ir pernešti. Pagrindinis PHA privalumas yra tas, kad juos gali sudaryti skirtingo ilgio anglies grandinės monomerų vienetai, sudarantys skirtingos cheminės struktūros polimerus. Keičiant PHA matricos parametrus, galima valdyti vaistų atpalaidavimo kinetiką. Trumpos grandinės ilgio PHA suyra dėl paviršiaus erozijos, todėl šio tipo PHA yra patraukliausi kandidatai būti naudojami kaip vaistų nešikliai. Pagrindiniai mikrodalelių, kurių pagrindą sudaro trumpos grandinės ilgio PHA, privalumai yra jų kristališkumas, hidrofobiškumas ir porų buvimas jų paviršiuje, o tai užtikrina veiksmingiausią vaisto išsiskyrimą iš skaidomos matricos [52].

E. Elmowafy ir kt. straipsnyje [53] P(HB-ko-HV) ir PHB buvo tiriami vaistų molekulių, tokių kaip tetraciklinas, rifampicinas, sulbaktamo ir cefoperazono mišinys, gentamicinas, sulperazonas, rubomicinas, rodaminio B izotiocianatas, pernešimui. Šie polimerai buvo tiriami kaip pailgintos vaisto

tiekimosi sistemos skirtingais laikotarpiais – nuo 15 iki 60 dienų. Pastebėta, kad vaistų atpalaidavimo laikas buvo tiesiogiai susijęs su naudojamų polimerų molekuline mase. Tai reiškia, jog didėjant polimero molekulinei masei, atpalaidavimo mechanizmas lėtėja, o vaisto tiekimo greitis mažėja. Be to, vaisto tiekimo laikotarpio trukmė ir kumuliacinio atpalaidavimo lygis priklauso nuo HV procentinės dalies P(HB-ko-HV) kopolimeruose, didėjant HV monomero procentinei daliai, didėja vaisto išsiskyrimo greitis. Polimerinių matricų vaisto atpalaidavimo greičio tyrimai atlikti ne su visomis giminingomis PHA šeimomis, tačiau iš tirtų polimerų klasių P(3HB-ko-4HB) polimeras pasižymi savybėmis, kurios pageidaujamos medžiagoms, skirtoms vaistų molekulių pernašai.

1.5.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Atsižvelgiant į sintetinių plastikų keliamą plataus masto aplinkosauginę problemą, siekiama juos pakeisti biopolimerais. PHA dėl biologinio skaidumo bei terminių ir mechaninių savybių yra potenciali alternatyva pakeisti sintetinius plastikus, taip pat PHA yra biopolimeras, kurį galima gaminti, naudojant įvairias pramonės atliekas kaip anglies šaltinį, todėl jo pramoninė gamyba įgauna vis didesnę reikšmę. Šie biopolimerai plačiai naudojami medicinos, farmacijos srityse, įvairiose pramonės šakose. Tačiau didelės gamybos sąnaudos vis dar yra didelė kliūtis PHA plataus masto naudojimui. Reikalingi tolimesni tyrimai tam, kad būtų galima sumažinti gamybos sąnaudas ir gauti veiksmingus PHA regeneravimo ir tolesnio perdirbimo metodus, tokiu būdu pagerinant jų komercializavimą.

Šio tyrimo metu įvertinta įvairių bakterijų kultūrų ir anglies šaltinių įtaka PHA sintezei ir savybėms. Darbo tikslas – optimizuoti PHA gamybą ir rekomenduoti jo gavimo aparatūrinę schemą.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimo metu naudota įranga

2.1 lentelė. Tiriamojo darbo metu naudota įranga

Įranga	Gamintojas, modelis
Autoklavas	Certoclav CV – EL
Magnetinė maišyklė	Heidolph Mr Hei – Tec
Laminaras	Telstar BV 100
Centrifuga	Universal 320 R
Termostatas	Binder BD23
pH metras	Winlab
Termostatuojamas kratytuvas	Biosan ES – 20
Mėgintuvėlių purtyklė	Biosan BioVortex V1
Spektrofotometras	Shimadzu UV – 1280
Svarstyklės	Shimadzu ATX 8400

2.2. Naudoti reagentai

2.2 lentelė. Tyrimo metu naudoti reagentai

Reagentas, cheminė formulė	Gamintojas
ABTS	Sigma-Aldrich
Acetatinis buferinis tirpalas, CH ₃ COOH + CH ₃ COONa	Eurochemicals
Acetonas, C ₃ H ₆ O	Eurochemicals
Agaras	Sigma-Aldrich
Askorbo rūgštis, C ₆ H ₈ O ₆	Eurochemicals
Kalcio chloridas dihidratas, CaCl ₂ · 2H ₂ O	Eurochemicals
Chloroformas, CHCl ₃	Eurochemicals
Kobalto chloridas dihidratas, CoCl ₂ · 6H ₂ O	Eurochemicals
Kalio persulfatas, K ₂ S ₂ O ₈	Eurochemicals
Vario chloridas dihidratas, CuCl ₂ · 2H ₂ O	Eurochemicals
Cukranendrių cukrus	Pirkta prekybos centre
2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH), C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	Sigma - Aldrich
Geležies trichloridas, FeCl ₃	Eurochemicals
Geležies sulfatas heptahidratas, FeSO ₄ · 7H ₂ O	Eurochemicals
Fosfatinis buferinis tirpalas, Na ₂ HPO ₄ + H ₃ PO ₄	Eurochemicals
Geležies amonio citratas, (NH ₄) ₅ [Fe(C ₆ H ₄ O ₇) ₂]	Eurochemicals
Gliukozė, C ₆ H ₁₂ O ₆	Eurochemicals
Sieros rūgštis, H ₂ SO ₄	Eurochemicals
Boro rūgštis, H ₃ BO ₃	Eurochemicals
Druskos rūgštis, HCl	Eurochemicals
Trikalio heksacianoferatas, K ₃ [Fe(CN) ₆]	Eurochemicals

2.2 lentelės tęsinys

Kalio bromidas, KBr	Eurochemicals
Kalio dihidrofosfatas, KH_2PO_4	Eurochemicals
Melasa	Pirkta prekybos centre
Metanolis, $\text{C}_3\text{H}_2\text{O}$	Eurochemicals
Magio sulfatas heptahidratas, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Eurochemicals
Mielių ekstraktas	Fluka Analytical
Mangano chloridas tetrahidratas, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Eurochemicals
Dinatrio hidrofosfatas dihidratas, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Eurochemicals
Dinatrio molibdatos dihidratas, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Eurochemicals
Natrio hipochloritas, NaClO	Eurochemicals
Natrio hidrokarbonatas, NaHCO_3	Eurochemicals
Natrio hidroksidas, NaOH	Labochema
Natrio chloridas, NaCl	Eurochemicals
Amonio chloridas, NH_4Cl	Eurochemicals
Nikelio chloridas heksahidratas, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Eurochemicals
Peptonas	Reachem
Sacharozė, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Eurochemicals
Stevija	Pirkta prekybos centre
2,4,6-tripiridil-s-tiazinas (TPTZ), $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}$	Sigma-Aldrich
Trichloracto rūgštis, $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$	Sigma-Aldrich
Cinko sulfatas heptahidratas, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Eurochemicals

2.3. Naudotos bakterijos

Tyrime naudotos *Bacillus subtilis*, *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli* bakterijų kultūros.

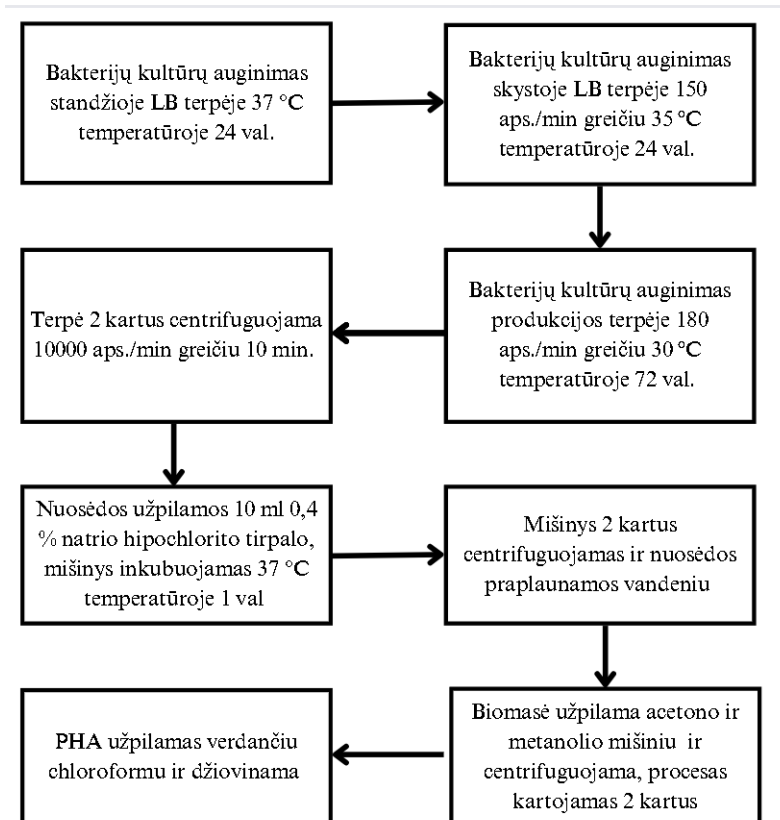
2.4. Naudoti anglies šaltiniai

1. Cukranendrių cukrus – tai natūralus sacharidas, gaunamas iš cukranendrių. Nuo sacharozės skiriasi tuo, kad yra neapdorotas, todėl jo sudėtyje yra melasos ir kitų priemaišų.
2. Gliukozė – monosacharidas, kurio sudėtyje šešis anglies atomai ir aldehido grupė. Tai saldi, gerai tirpstanti vandenyje kristalinė medžiaga. Cheminė formulė $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.
3. Melasa – rudos arba juodos spalvos klampus skystis, gaunamas perdirbant cukranendres ar cukrinius runkelius į cukrų.
4. Apdorota melasa – apdorojimas atliktas pagal E. Zakaria Gomaa straipsnyje [33] pateiktą metodą. Melasa sumaišoma su 0,1 N H_2SO_4 ir pH sumažinamas iki 3. Gautas mišinys paliktas kambario temperatūroje, o praėjus 1,5 val, centrifuguojamas 3000 apsisukimų per minutę greičiu 15 min. Supernatantas laikomas 4 °C temperatūroje tolesniam naudojimui.
5. Sacharozė – disacharidas, kurio molekulinė formulė $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. Sacharozė sudaryta iš α -gliukozės ir β -fruktozės.

6. Stevija – natūralus saldiklis, gaunamas iš Paragvajuje ir Brazilijoje augančių *Stevia rebaudiana* rūšies augalų lapų. Veikliosios medžiagos yra steviolio glikozidai (daugiausia steviozidas ir rebaudiozidas), kurių saldumas yra maždaug 50-300 kartų didesnis nei cukraus. Žmogaus organizme steviolio glikozidai nėra metabolizuojami.

2.5. Tyrimo eiga

Polihidroksialkanoatų gamybos schema pateikta 2.1 pav.



2.1 pav. Polihidroksialkanoatų gamybos schema

2.5.1. Terpių paruošimas

Bakterijų kultūroms inokuliuoti naudota standi LB terpė, kurios sudėtis pateikta 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. LB standžios terpės sudėtis.

Terpės sudedamoji dalis	Koncentracija, g/l
Peptonas	10
Mielių ekstraktas	5
Natrio chloridas	5
Agaras	15

Terpės pH 7 vertei palaikyti naudota 1 N NaOH, 0,1 N NaOH, 0,03 N NaOH bei 1 N H₂SO₄ ir 0,1 N H₂SO₄ tirpalai. Terpės autoklavuotos 15 min 120 °C temperatūroje, 0,75–1 atm slėgyje.

2.5.2. Tyrime naudotų bakterijų paruošimas

Tyrimui naudotos dehidratuotos bakterijos gautos iš Vokietijos mikroorganizmų ir ląstelių kultūrų kolekcijos (DSMZ). Šios bakterijų kultūros patalpintos ampulėje, kurioje buvo sudarytas vakuumas. Ampulės atidarymo ir bakterijų rehidratavimo instrukcija:

1. Ampulės galiukas pakaitinamas liepsnoje.



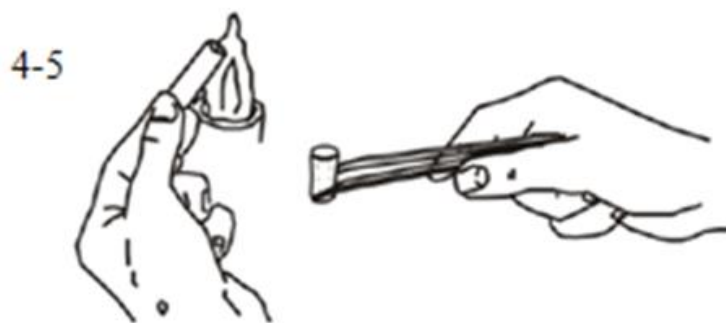
2. Užlašinami 2-3 lašai vandens.



3. Atsargiai pincetu ar skalpeliu nulaužiamas ampulės galiukas.

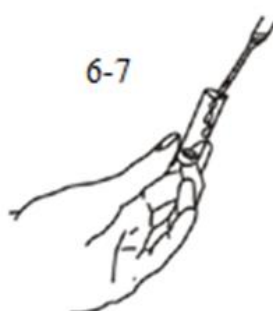


4. Žnyplėmis pašalinama izoliacinė medžiaga ir išimama vidinė kapsulė.
5. Žnyplėmis ištraukiamas medvilninis kamštis, o viršutinė vidinės kapsulės dalis nudeginama liepsnoje.



6. Į kapsulę įpilama 0,5 ml terpės, uždengiama kamščiu ir paliekama 30 min.

7. Naudojant mikrobiologinę kilpelę kapsulės turinys sumaišomas.



8. Gautas mišinys perkeliamas į mėgintuvėlį su 5 ml rekomenduojamos skystosios terpės, iš kurios bakterijos gali būti sėjamos giluminiu ar paviršiniu būdu į kietąsias agarą terpes ar į skystąsias terpes [54].

2.5.3. Bakterijų kultūrų inokuliatų paruošimas ir fermentacija

Bakterijų kultūros augintos *Petri* lėkštelėse su paruošta standžia LB terpe. Lėkštelė inkubuota 37 °C temperatūroje 24 val. Užaugusios kolonijos paimtos steriliomis kilpelėmis, perkeltos į 100 ml mitybinės terpės ir inkubuotos 150 apsisukimų per minutę greičiu 35 °C temperatūroje 24 val. Tuomet gautos suspensijos centrifuguotos 10000 apsisukimų per minutę greičiu 15 minučių, esant 4 °C temperatūrai, aseptiškai nuplaautos steriliu distiliuotu vandeniu ir perkeltos į 400 ml produkcijos terpės, kurios sudėtis pateikta 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Produkcijos terpės sudėtis.

Sudedamoji dalis	Koncentracija, g/l
NH ₄ Cl	1
NaHCO ₃	0,5
KH ₂ PO ₄	2
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,01
Geležies amonio citratas	0,05
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,08

2.4 lentelės tęsinys

MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,03
H ₃ BO ₃	0,3
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,2
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,01
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,02
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,03

Tyrimo metu naudoti skirtingi anglies šaltiniai, kurie yra nurodyti 2.4 dalyje. Jų koncentracija produkcijos terpėje lygi 2 %. Inokuliatas inkubuotas 72 val. 180 apsisukimų per minutę greičiu 30 °C temperatūroje. Terpės pH vertė 7 palaikoma pridėdant 10 % NaOH arba 10 % HCl. Tam, kad būtų stebimas bakterijų prieaugis, kas 24 val buvo imami mėginiai ir matuojama jų šviesos sugertis prie 600 nm bangos ilgio. Biosintezės progresui stebėti taip pat matuota sausos biomasės koncentracija. Tai buvo atliekama kas 24 val paimant 1 ml mėginio, kuris yra perkeliamas į iš anksto pasvertą mėgintuvėlį ir išsodinamas centrifuguojant. Supernatantas nupiltas, nuosėdos perplautos distiliuotu vandeniu ir dar kartą centrifuguotos. Dar kartą nupiltas supernatantas, o mėgintuvėlis su nuosėdomis buvo džiovinamas 24 val 50 °C temperatūroje. Praėjus nustatytam laikui mėgintuvėlis su išdžiuvusia biomase buvo pasveriamas, iš gautos reikšmės atimamas tuščio mėgintuvėlio svoris ir gaunama reikšmė perskaičiuojama į PHA koncentraciją gramais litre fermentacijos terpės.

2.5.4. PHA išskyrimas

Siekiant optimizuoti PHA išskyrimą, buvo tiriami penki būdai:

1. į išdžiovintas biomasės granules įpilta 10 ml 0,4 % natrio hipochlorito tirpalo ir gerai išmaišyta. Mišiniai inkubuoti 37 °C temperatūroje 1 val. Gautos nuosėdos 15 min. Buvo centrifuguojamos 10000 apsisukimų per minutę greičiu ir nuplautos 10 ml acetono. Tada turinys centrifuguotas, nuplautos 10 ml distiliuoto vandens ir dar kartą centrifuguotas, kad būtų gautos PHA granulės. Tada į granules buvo įpilta 10 ml chloroformo ir 12 val. džiovinta 50 °C temperatūroje, po to 48 val. džiovinta 105 °C temperatūroje [33];
2. fermentacijos mišinys 30 min. centrifuguotas 7000 apsisukimų per minutę greičiu 4 °C temperatūroje. Atskirta biomasė sumaišyta su natrio hipochlorito tirpalu santykiu 1 g biomasės 3,5 ml natrio hipochlorito tirpalo (1:2 natrio hipochlorito ir chloroformo) ir mišinys paliktas kambario temperatūroje 24 val. Tuomet mišinys buvo centrifuguojamas, plaunamas distiliuotu vandeniu, ant gautų PHA granuliu buvo pilamas šaltas acetonas. Galiausiai gautas biopolimeras buvo džiovinamas 50°C temperatūroje [55];
3. po fermentacijos terpė buvo centrifuguojama 10 minučių 10000 apsisukimų per minutę greičiu, nuosėdos praplautos distiliuotu vandeniu ir centrifugavimas pakartojamas. Tuomet nuosėdos įdedamos į termostatą ir džiovintos 50 °C temperatūroje 24 val. Nustačius sausų ląstelių svorį, į išdžiovintą biomasę buvo įpilama 10 ml 0,4 % natrio hipochlorito tirpalo, mišinys inkubuojamas 37 °C temperatūroje 1 val, tuomet du kartus centrifuguojama ir praplaunama 10 ml vandens. Nucentrifuguota biomasė užpilta 5 ml acetono ir metanolio mišiniu (santykis 1:1), nucentrifuguota, šis procesas pakartotas. Nuosėdos užpiltos 5 ml verdančio chloroformo ir buvo džiovinamos 50 °C temperatūroje [33];

4. fermentacijos mišinys sumaišomas su 10 ml 1 % SDS tirpalo, terpės pH 10, mišinys buvo laikomas 60 minučių 37 °C temperatūroje. Tuomet mišinys buvo centrifuguojamas 15 minučių. Nuosėdos užpildos 1 ml NaClO tirpalu, mišinys praskiestas distiliuotu vandeniu iki 5 ml. Mišinys centrifuguota, du kartus plautas distiliuotu vandeniu, o gautos PHA granules buvo džiovinamos 50 °C temperatūroje [56];
5. biomasė apdorota 20 ml 6 % natrio hipochlorito ir 20 ml chloroformo mišiniu. Mišinys buvo inkubuojamas 1 val. 37 °C temperatūroje, tada centrifuguotas 10 min. 4000 apsisukimų per minutę greičiu. Gautos trys atskiros fazės: viršutinė fazė – natrio hipochlorito tirpalas, vidurinėje fazėje buvo keletas nesuardytų ląstelių, o apatinė fazė buvo chloroformo fazė su PHA. Dvi viršutinės fazės pašalintos, naudojant plastikines pipetes. PHA nusodintas, naudojant šaltą metanolį, kurio turi būti keturis kartus didesnis kiekis. Nusodintas polimeras plautas distiliuotu vandeniu ir išdžiovintas eksikatoriuje [57].

Dėl didžiausio efektyvumo ir metodo paprastumo, pasirinktas 3 būdas. Išdžiovintas PHA kiekybiškai įvertintas ir panaudotas tolimesniems savybių tyrimams.

2.5.5. Savybių tyrimas

2.5.5.1. Tirpumas

Tiriamas PHA tirpumas vandenyje ir DMSO. 10 mg sauso PHA tirpinta 10 ml tirpiklio ir mėgintuvėliai buvo šildomi 100 °C temperatūros vandens vonelėje. Buvo atliekamas vizualus vertinamas siekiant nustatyti, ar PHA ištirpo.

2.5.5.2. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu

Laisvojo DPPH radikalo tirpalas yra tamsiai violetinės spalvos. Reakcijoje su antioksidaciniu junginiu nesuporuotas DPPH azoto elektronas prisijungia vandenilio atomą, susidaro stabilus junginys ir tirpalas nusidažo šviesiai gelsva spalva (2.2 pav.). Spalvos pokytis nustatomas spektrofotometriniu būdu, matuojant šviesos sugertį 517 nm bangos ilgyje.



2.2 pav. DPPH radikalo slopinimo reakcija [57]

Paruoštas 50 ml 0,1 mM koncentracijos DPPH tirpalas. Paruošti tiriamieji 1 mg/ml koncentracijos tirpalai iš skirtingų anglies šaltinių, gautus PHA ištirpinant DMSO. Kaip kontrolinis tirpalas tyrime naudotas 1mg/ml koncentracijos askorbo rūgšties tirpalas. Paruoštas kontrolinis tirpalas: 1 ml DPPH ir 1 ml DMSO. 1 ml DPPH tirpalo buvo įpilama į 1 ml tiriamųjų tirpalų. Kiekvienam bandiniui buvo atliekami 3 pakartojimai. Tirpalai palikti tamsoje 20 minučių ir išmatuota šviesos sugertis 600 nm bangos ilgyje spektrofotometru.

DPPH slopinimas apskaičiuotas pagal (2.1) formulę:

$$\text{slopinimas (\%)} = \left(\frac{A_B - A_A}{A_B} \right) \cdot 100 \quad (2.1)$$

čia A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugertis, A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis [58].

2.5.5.3. Antioksidacinio (redukcinio) aktyvumo nustatymas

Metodas paremtas bioaktyvaus junginio geba redukuoti $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_3$ į $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$. Prie redukuoto produkto pridėjus laisvo Fe^{3+} , susidaro tamsiai mėlynos spalvos geležies kompleksinis junginys $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, dar vadinamas Prūsų mėlynuoju:

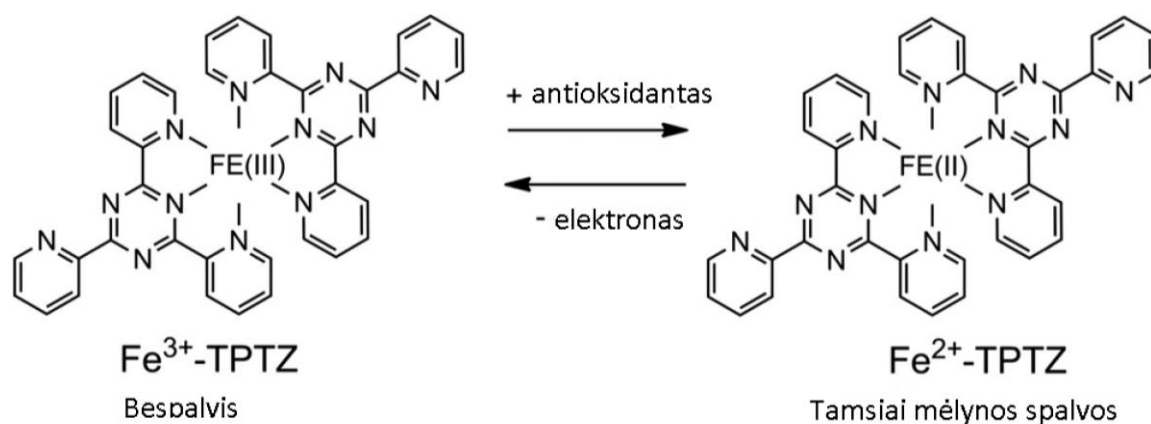


Prūsų mėlynasis pasižymi stipria šviesos sugertimi 700 nm bangos ilgyje. Reakcijos mišinio absorbcijos padidėjimas reiškia, kad tiriamasis junginys pasižymi redukuojamąja geba, o kuo didesnė absorbcijos vertė, tuo stipresnis antioksidacinis poveikis.

Į 0,5 ml 1 mg/ml koncentracijos tiriamojo PHA tirpalo įpilta 1,25 ml fosfatinio buferio ir 1,25 ml 1 % $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tirpalo. Kontrolinis tirpalas gautas 1,25 ml fosfatinio buferio sumaišant su 1,25 ml 1 % $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tirpalo. Bandiniai inkubuoti 50 °C temperatūroje 20 minučių, vėliau į juos įpilta 1,5 ml trichloracto rūgšties tirpalo ir išmaišyta. Tuomet 1,25 ml bandomųjų ir kontrolinio tirpalų sumaišyta su 1,25 ml distiliuoto vandens ir 0,5 ml 0,1 % FeCl_3 tirpalo. Spektrofotometru išmatuota tirpalo šviesos sugertis 700 nm bangos ilgyje [59].

2.5.5.4. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas FRAP metodu

Metodas yra pagrįstas Fe^{3+} – TPTZ komplekso redukavimu iki intensyviai mėlynos spalvos geležies Fe^{2+} komplekso dėl antioksidacinio tiriamojo junginio poveikio rūgštinėje terpėje (2.3 pav.). Antioksidacinis aktyvumas nustatomas kaip absorbcijos padidėjimas, kai bangos ilgis 593 nm, o rezultatai išreiškiami mikromoliniais Fe^{2+} ekvivalentais [60].



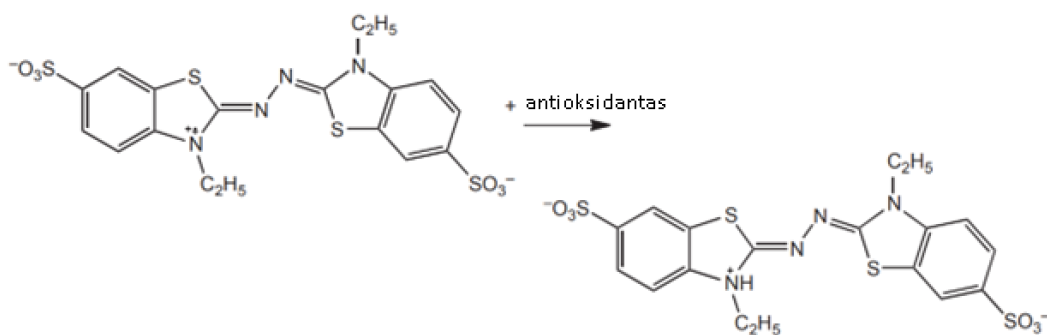
2.3 pav. FRAP radikalo slopinimo reakcija [59]

Paruoštas FRAP reagentas: sumaišyta 25 ml 300 mM acetato buferio, 2,5 ml 10 mmol TPTZ ir 2,5 ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mmol/l). Mėginiai (20 μL mėginio ir 80 μL metanolio) sumaišyti su 3 ml FRAP

reagento. Tuščias mėginys – 100 µL metanolio ir 3 ml FRAP reagento mišinys. Išmatuota reakcijos mišinio šviesos sugertis 593 nm bangos ilgyje. Kalibracinė kreivė buvo ruošta FeSO₄ · 7H₂O (5, 10, 15, 20; 25 µmol/l). Reikšmė apskaičiuota pagal kalibracinę kreivę µmol/l Fe(II)/l. Tuščias kalibracinės kreivės mėginys buvo iš 3 ml FRAP ir 7 ml vandens [58].

2.5.5.5. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu

ABTS metodas pagrįstas antioksidanto gebėjimu stabilizuoti ABTS katijono radikalą, kuris susidaro ABTS reaguojant su kalio persulfatu. ABTS radikalas turi mėlynai žalią spalvą. Reakcijos, kuri pavaizduota 2.4 pav., metu vyksta elektronų pernaša iš antioksidanto į ABTS ir šio proceso požymis yra spalvos pokytis, kuris matuojamas spektrofotometru 734 nm bangos ilgyje, o antioksidacinį poveikį nusako spalvos pokyčio skirtumas.



2.4 pav. ABTS radikalo slopinimo reakcija [60]

ABTS tirpalas praskiestas tiek, kad šviesos sugertis 734 nm bangos ilgyje būtų 1,5-1,7. Į 0,5 ml tiriamojo tirpalo įpilta 1,7 ml fosfato buferio (20 mM) ir 0,3 ml praskiesto ABTS tirpalo. Nustatyta ABTS šviesos sugertis 734 nm bangos ilgyje. ABTS slopinimas apskaičiuotas pagal 2.4 formulę:

$$\text{slopinimas (\%)} = \left(\frac{A_B - A_A}{A_B} \right) \cdot 100 \quad (2.4)$$

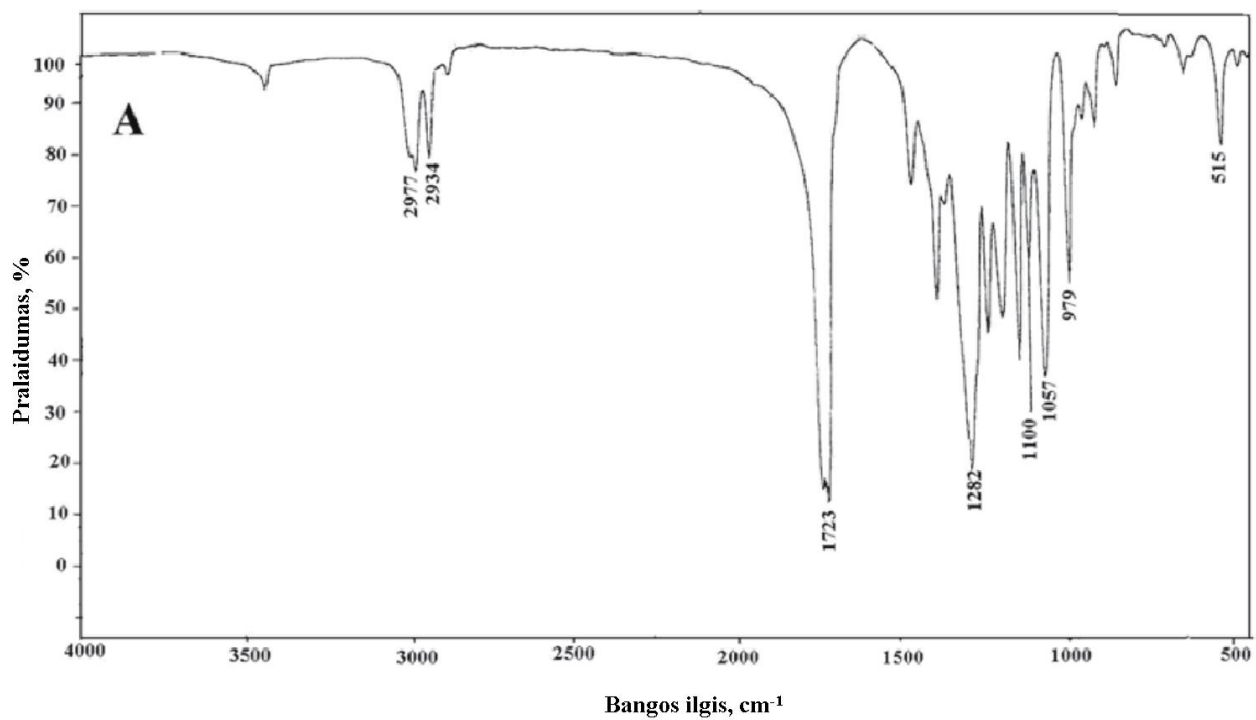
čia: A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugertis, A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis [61].

2.5.5.6. FTIR analizė

Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija (FTIR) principas pagrįstas infraraudonųjų spindulių sąveika su mėginio molekuliniais virpesiais. FTIR spektroskopijos metu infraraudonųjų spindulių pluoštas praleidžiamas pro mėginį, o praėjusi spinduliuotė surenkama ir išmatuojama. Infraraudonoji spinduliuotė sąveikauja su mėginio molekuliniais virpesiais, todėl mėginyje esantys atomai virpa tam tikrais dažniais. Mėginio sugerta energija matuojama kaip infraraudonosios spinduliuotės dažnio funkcija. Gautas spektras vadinamas infraraudonųjų spindulių spektru arba IR spektru. Spektro viršūnės atitinka konkrečius mėginyje esančių funkcinių grupių molekulinis virpesius. Surinktoms interferogramoms konvertuoti į dažnių srities spektrus naudojama Furjė transformacija. Gautame spektre pateikiama informacija apie mėginyje esančius cheminius ryšius ir funkcines grupes, todėl galima identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti mėginyje esančius komponentus [62]. 2.5 pav. pateiktas PHB FTIR spektras [63].

Atsverta 200 ±10 mg KBr ir 2±0,5 mg tiriamo junginio, supilta į agato grūstuvą. Abi medžiagos sumaišomos tarpusavyje ir gautas mišinys buvo vakuuojamas 2 minutes. Gauta suslėgta tabletė

patalpinta į spektrometro bandinių talpyklą ir buvo atliekama analizė, užrašomas junginio spektras [63].

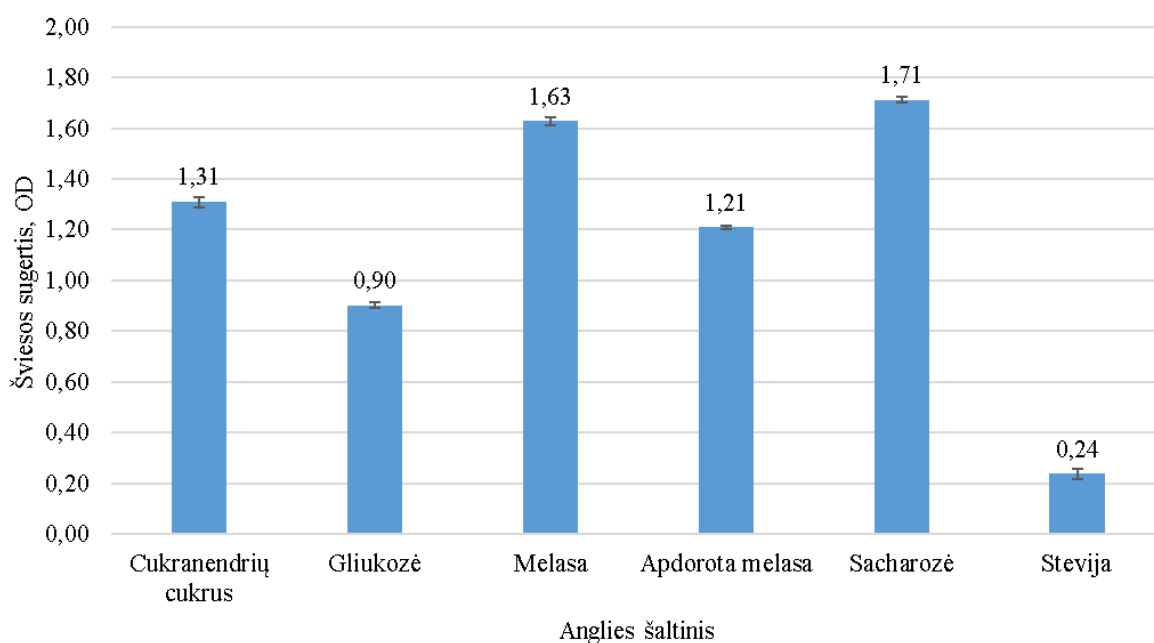


2.5 pav. PHB FTIR spektras [63]

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

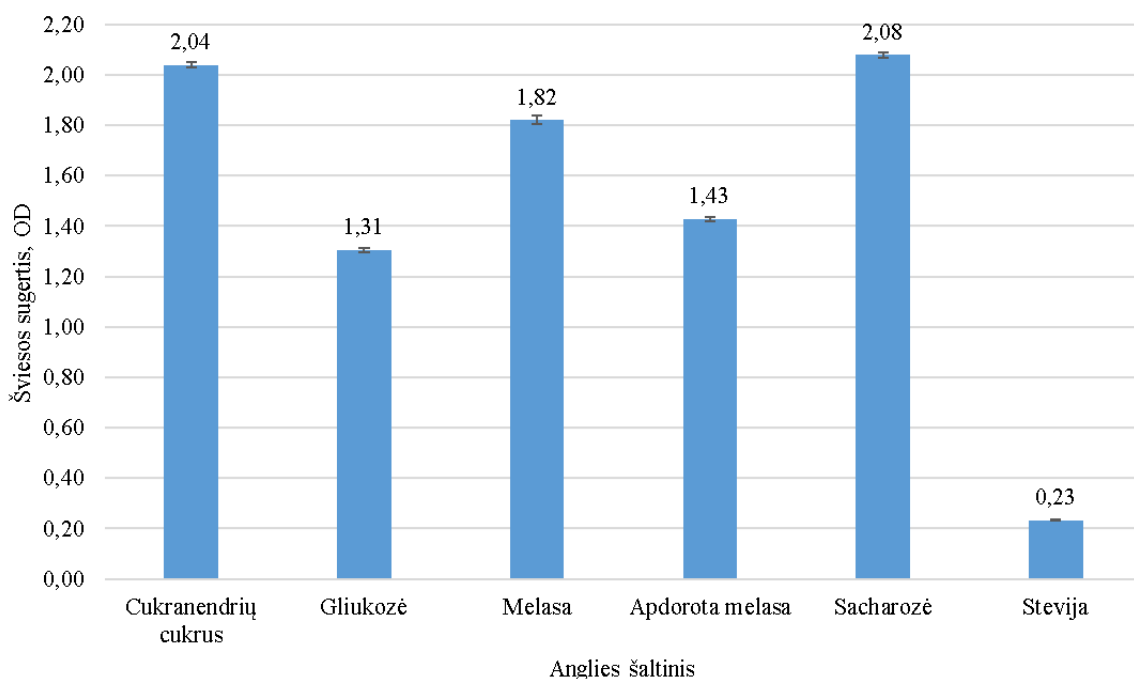
Tyrime naudotos *Bacillus subtilis*, *Cupriavidus necator* ir *Escherichia coli* bakterijų kultūros. Pasirinkti anglies šaltiniai buvo cukranendrių cukrus, gliukozė, melasa, apdorota melasa, sacharozė bei stevija. Fermentacija buvo vykdoma 72 valandas, po to susidaręs PHA buvo išskirinėjamas ir džiovinamas. Siekiant ištirti bakterijų prieaugį, kas 24 valandas buvo imami mėginiai šviesos sugerčiai išmatuoti. Kas 24 valandas buvo sekama ir PHA koncentracija, perskaičiuota iš susidariusio biomasės kiekio. Pagamintam PHA buvo atliekami antioksidaciniai tyrimai FRAP, DPPH, ABTS metodais bei redukcinių savybių nustatymas.

3.1. PHA susidarymo iš skirtingų anglies šaltinių tyrimas, naudojant *Bacillus subtilis*



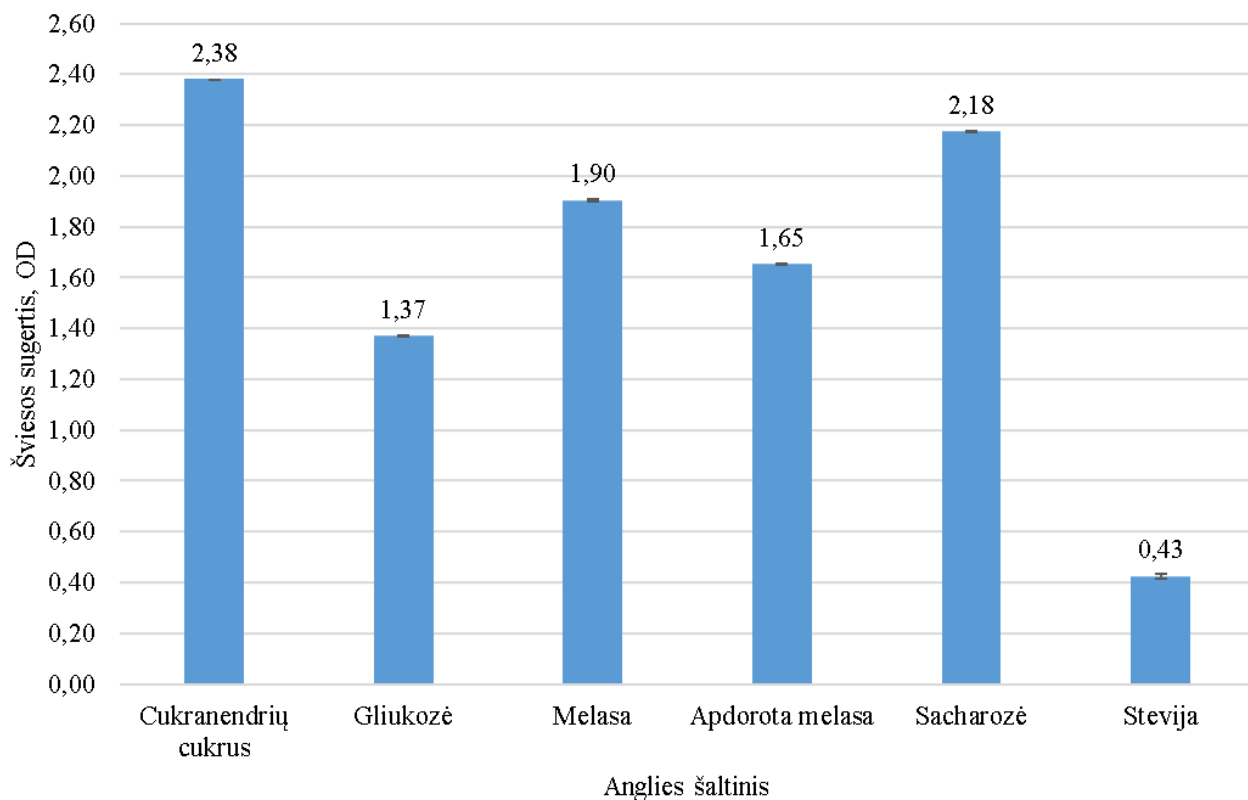
3.1 pav. Fermentacijos terpės šviesos sugertis po 24 valandų

Iš rezultatų matyti, kad po 24 valandų fermentacijos (3.1 pav.) didžiausias *Bacillus subtilis* bakterijų augimas pastebėtas, kai anglies šaltinis mitybinėje terpėje buvo sacharozė (šviesos sugertis 1,71 o. v.), o mažiausias – su stevija (šviesos sugertis 0,24 o. v.).



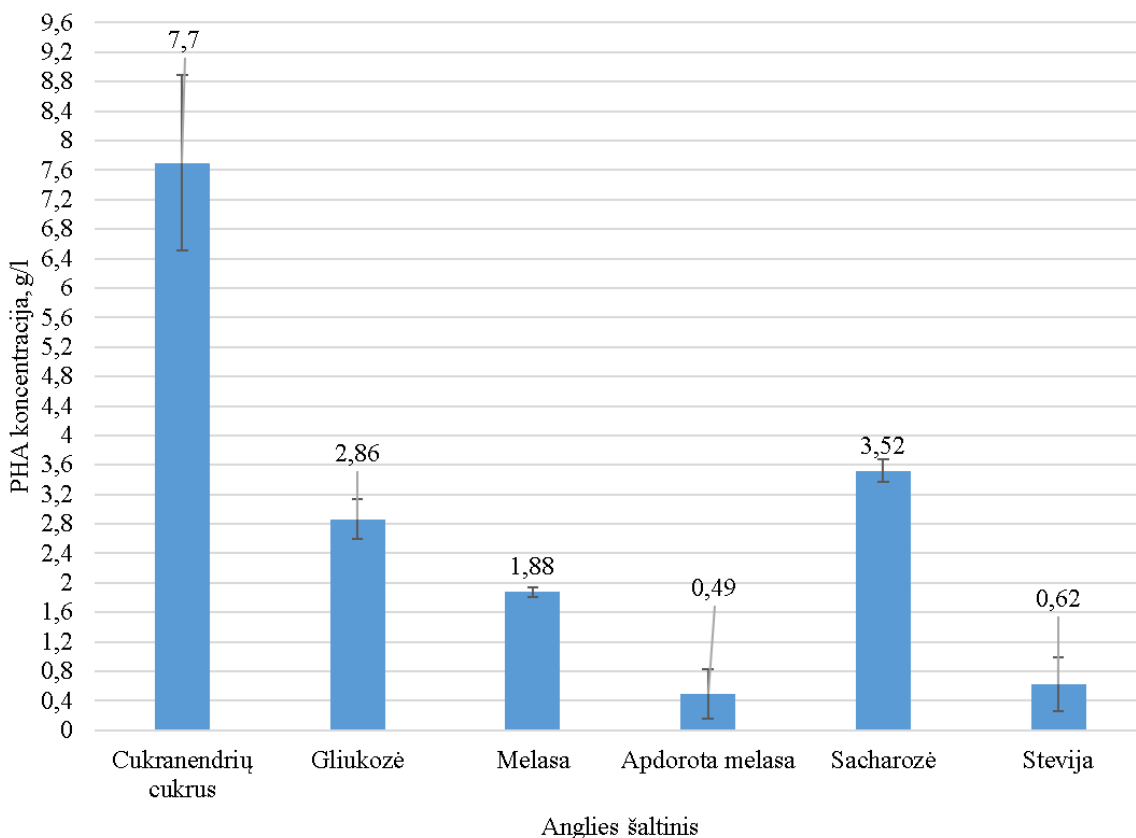
3.2 pav. Fermentacijos terpės šviesos sugertis po 48 valandų

Po 48 valandų (3.2 pav.) didžiausias šviesos sugerties pokytis išmatuotas, kai fermentacijos terpėje anglies šaltinis buvo cukranendrių cukrus ir sacharozė, jų rezultatai didžiausi (atitinkamai 2,04 ir 2,08 o. v.), o mažiausia išmatuota šviesos sugertis buvo fermentacijos terpėje, kurioje anglies šaltinis buvo stevija (0,23 o. v.).



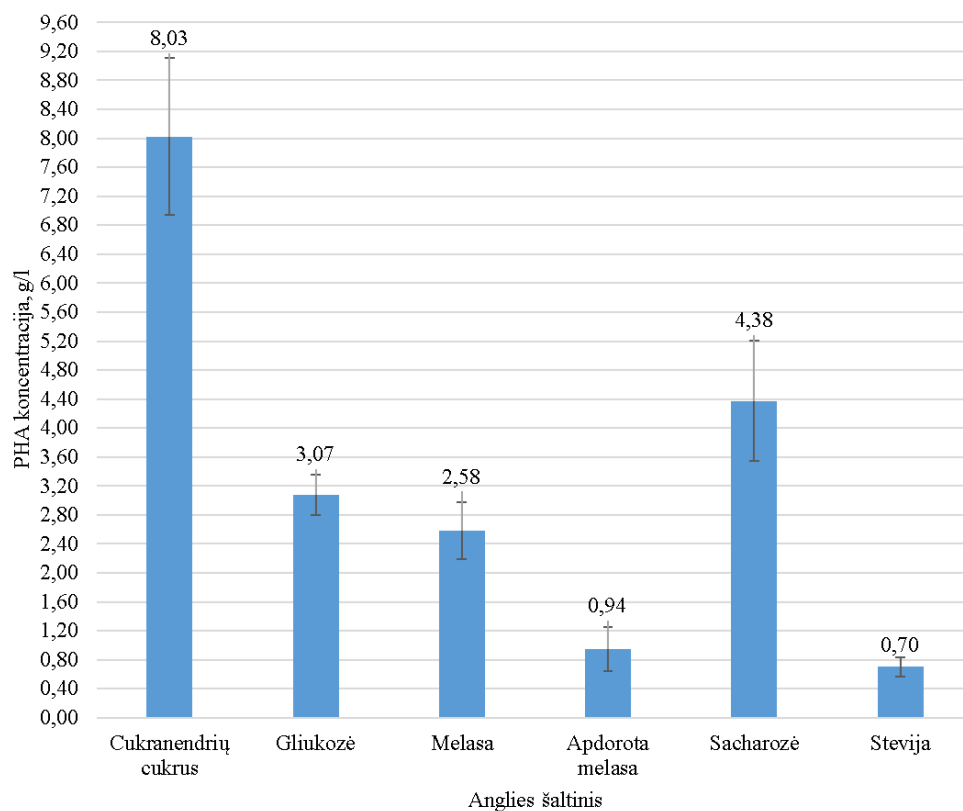
3.3 pav. Fermentacijos terpės šviesos sugertis po 72 valandų

Po 72 valandų (3.3 pav.) didžiausia šviesos sugertis išmatuota terpėse, kuriose anglies šaltiniai buvo cukranendrių cukrus (2,38 o. v.) ir sacharozė (2,18 o. v.), o mažiausia – stevija (0,43 o. v.). Taip pat svarbu pažymėti, kad nors melasos šviesos sugertis po 24 valandų fermentacijos buvo didžiausia po terpės su sacharozė (1,63 o. v.), po 72 valandų šviesos sugerties pokytis nebuvo didelis, kadangi šviesos sugerties vertė lygi 1,90 o. v.



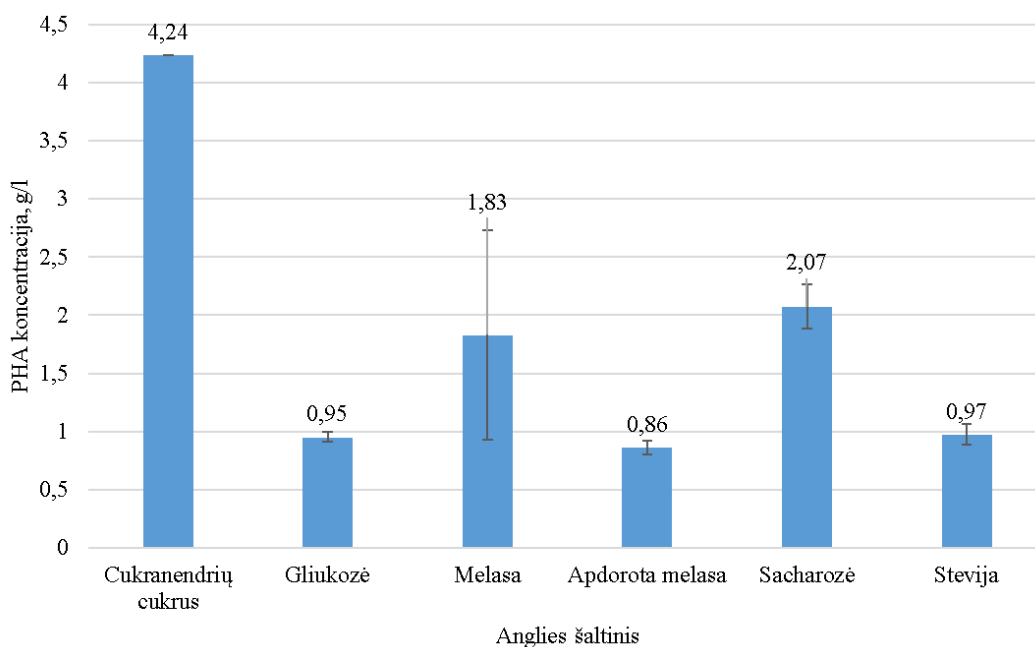
3.4 pav. PHA koncentracija fermentacijos terpėje po 24 valandų

Po 24 valandų fermentacijos (3.4 pav.) didžiausia PHA koncentracija gauta terpėje, kurioje anglies šaltinis buvo cukranendrių cukrus (7,70 g/l), o mažiausia – apdorota melasa (0,49 g/l).



3.5 pav. PHA koncentracija fermentacijos terpėje po 48 valandų

Po 48 valandų (3.5 pav.) visuose PHA mėginiuose koncentracija padidėjo. Terpėje su cukranendrių cukrumi PHA koncentracija buvo didžiausia (8,03 g/l), o su stevija – mažiausia (0,70 g/l).

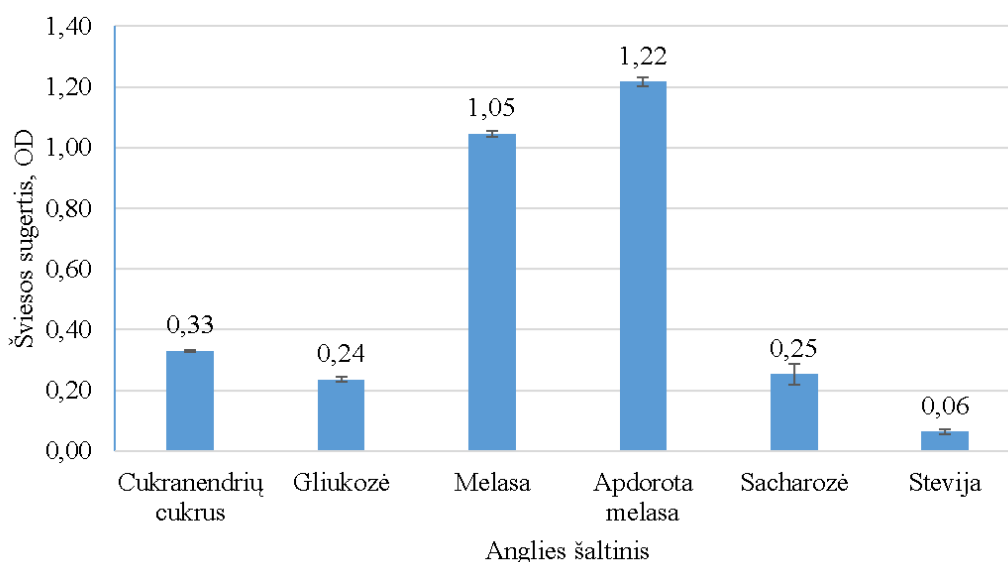


3.6 pav. PHA koncentracija fermentacijos terpėje po 72 valandų

Po 72 valandų (3.6 pav.) visuose mėginiuose, išskyrus PHA mėginį, pagamintą naudojant steviją, nustatytas PHA koncentracijos sumažėjimas. Didžiausia PHA koncentracija buvo terpėje su cukranendrių cukrumi (4,24 g/l).

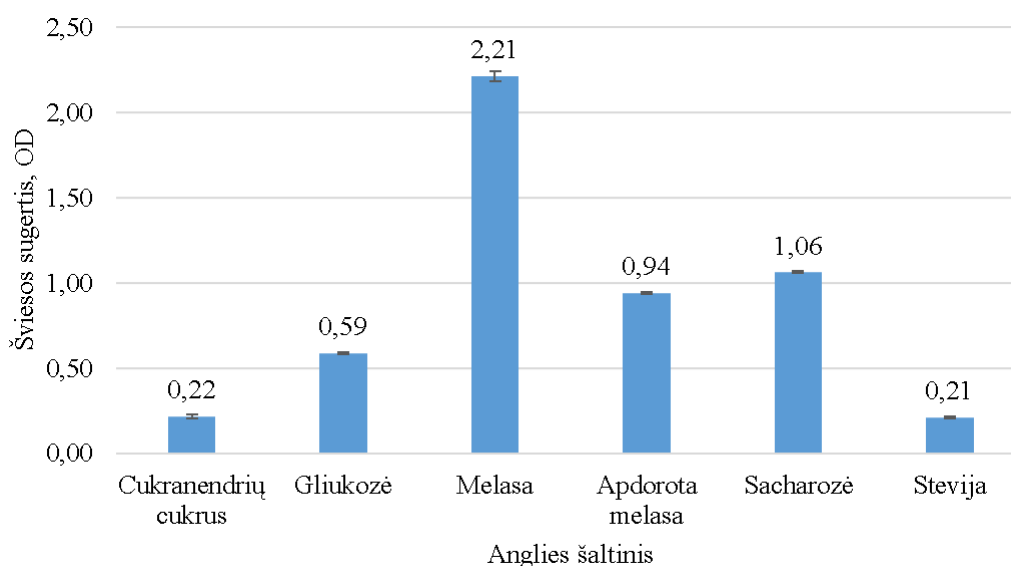
Tyrimo metu pastebėta, kad PHA biosintezės iš *Bacillus subtilis* metu didžiausia PHA koncentracija gauta fermentacijos terpėje, kurioje anglies šaltinis buvo cukranendrių cukrus, o mažiausia – apdorota melasa. Taip pat nustatyta, kad naudojant cukranendrių cukrų gaunama didesnė PHA koncentracija nei naudojant sacharozę, o naudojant apdorotą melasą gaunama mažesnė PHA koncentracija nei neapdorotą.

3.2. PHA susidarymo iš skirtingų anglies šaltinių tyrimas, naudojant *Cupriavidus necator*



3.7 pav. Fermentacijos terpės šviesos sugertis po 24 valandų

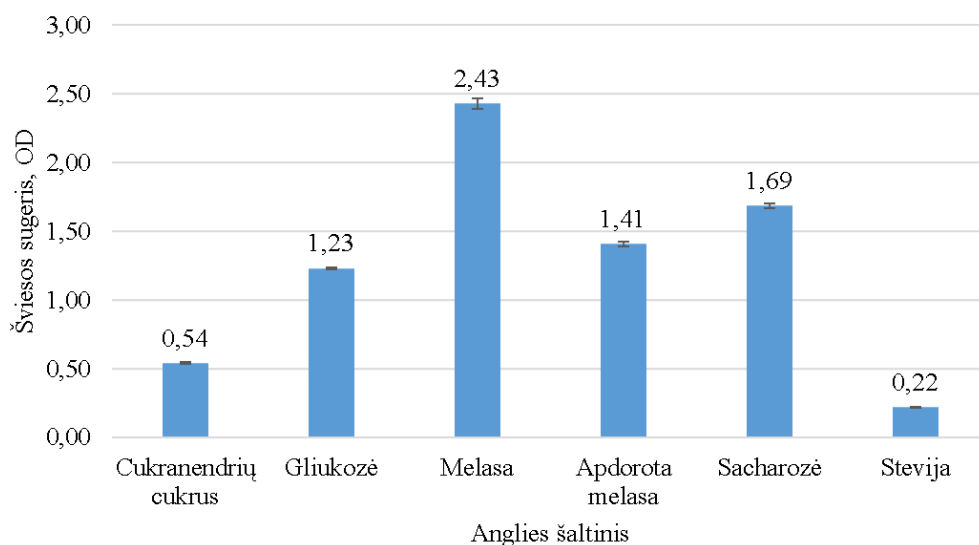
Po 24 valandų fermentacijos (3.7 pav.) didžiausia šviesos sugertis išmatuota terpėje, kurios anglies šaltinis yra apdorota melasa (1,22 o. v.), o mažiausia, kurios anglies šaltinis yra stevija (0,06 o. v.).



3.8 pav. Fermentacijos terpės šviesos sugertis po 48 valandų

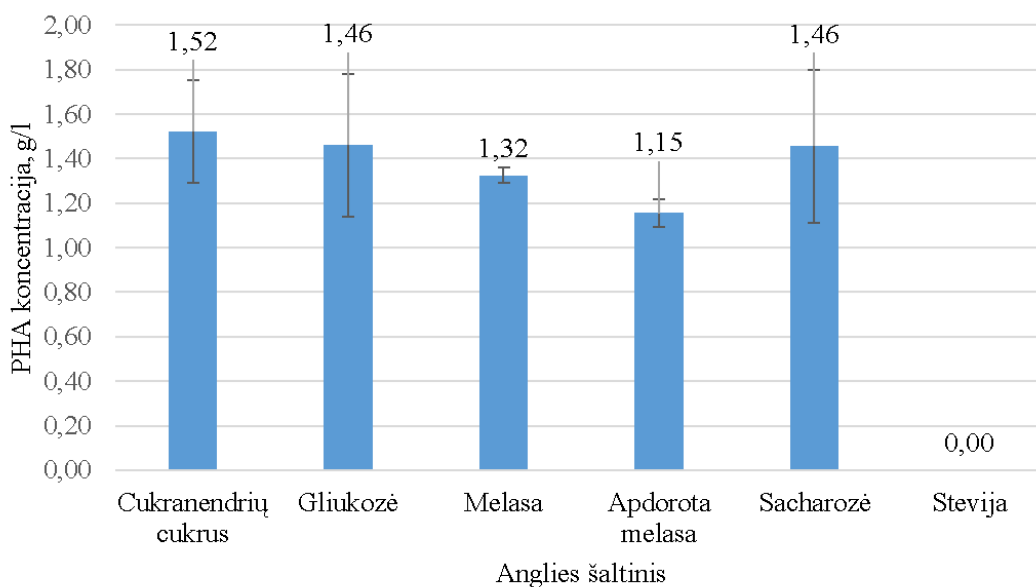
Po 48 valandų (3.8 pav.) išmatuota, kad terpės, kurioje anglies šaltinis buvo apdorota melasa, šviesos sugerties vertė sumažėjo iki 0,94 o. v., o terpės su melasa šviesos sugerties vertė pakilo nuo 1,05 o. v.

iki 2,21 o. v. Terpės su cukranendrių cukrumi šviesos sugertis sumažėjo nuo 0,33 o. v. iki 0,22 o. v. Mažiausia šviesos sugertis išmatuota terpėje su stevija (0,21 o. v.).



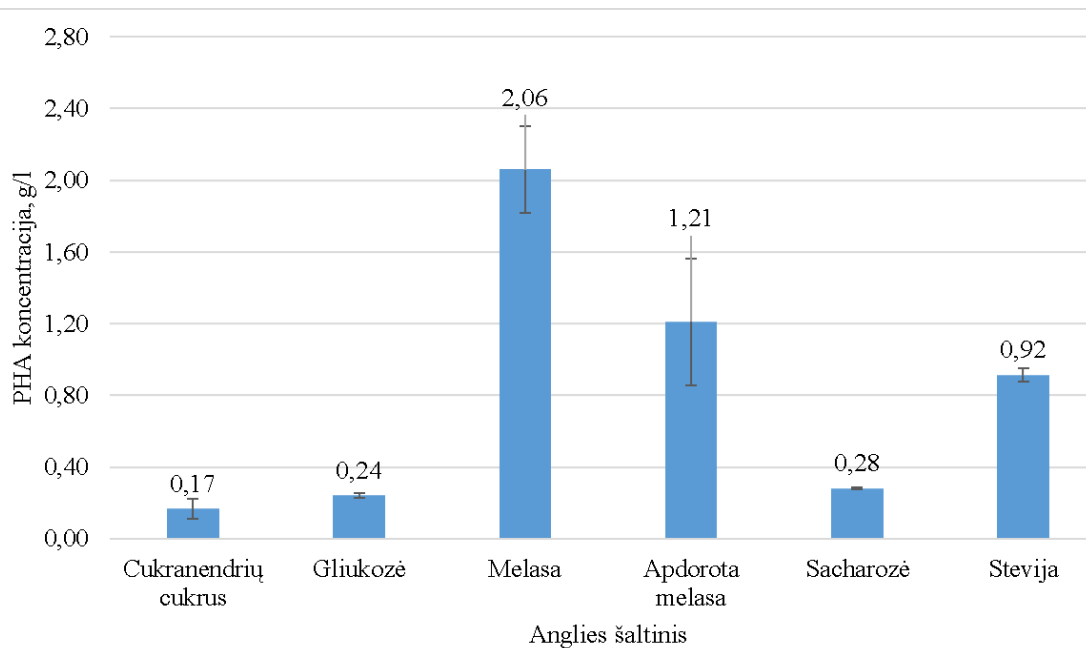
3.9 pav. Fermentacijos terpės šviesos sugertis po 72 valandų

Po 72 valandų (3.9 pav.) visų mėginių šviesos sugerties vertės padidėjo. Išmatuota didžiausia šviesos sugertis terpėje, kurioje anglies šaltinis buvo melasa (2,43 o. v.), o mažiausia – stevija (0,22 o. v.).



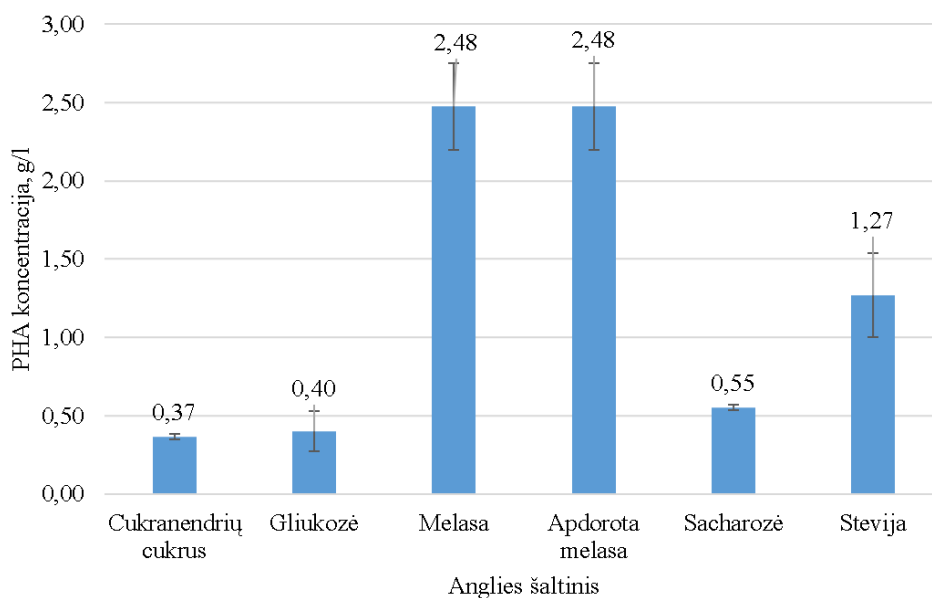
3.10 pav. PHA koncentracija fermentacijos terpėje po 24 valandų

Po 24 valandų fermentacijos (3.10 pav.) didžiausia koncentracija išmatuota PHA mėginyje, kurio anglies šaltinis buvo cukranendrių cukrus (1,52 g/l). PHA, pagamintiems naudojant gliukozę ir sacharozę kaip anglies šaltinius, apskaičiuota vienoda PHA koncentracija (1,46 g/l), o mėginyje, kuriame PHA buvo biosintetinas naudojant steviją, susidariusio PHA neaptikta.



3.11 pav. PHA koncentracija fermentacijos terpėje po 48 valandų

Po 48 valandų (3.11 pav.) didžiausia PHA koncentracija užfiksuota mėginyje su melasa (2,06 g/l). Nustatyta, kad terpėse su cukranendrių cukrumi, gliukoze ir sacharoze PHA koncentracija sumažėjo atitinkamai nuo 1,52 g/l iki 0,17 g/l, nuo 1,46 g/l iki 0,24 g/l ir nuo 1,46 g/l iki 0,28 g/l.



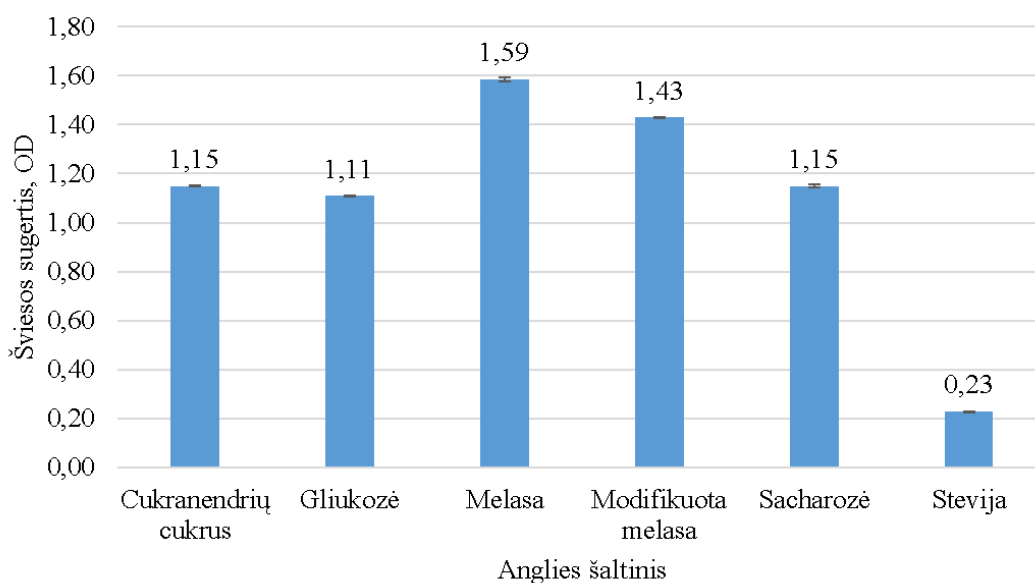
3.12 pav. PHA koncentracija fermentacijos terpėje po 72 valandų

Po 72 valandų (3.12 pav.) nustatytas PHA koncentracijos padidėjimas visuose mėginiuose, o PHA, kurių gamyboje kaip anglies šaltiniai naudoti melasa ir apdorota melasa, koncentracijos yra didžiausios ir yra lygios 2,48 g/l. Mažiausia PHA koncentracija užfiksuota mėginyje su cukranendrių cukrumi (0,37 g/l).

Ištyrus PHA biosintezę iš *Cupriavidus necator* gauti rezultatai rodo, kad didžiausia PHA koncentracija gauta, kaip anglies šaltinį biosintezėje naudojant melasą ir apdorotą melasą, o mažiausia naudojant cukranendrių cukrų. Taip pat pastebėta, kad naudojant cukranendrių cukrų,

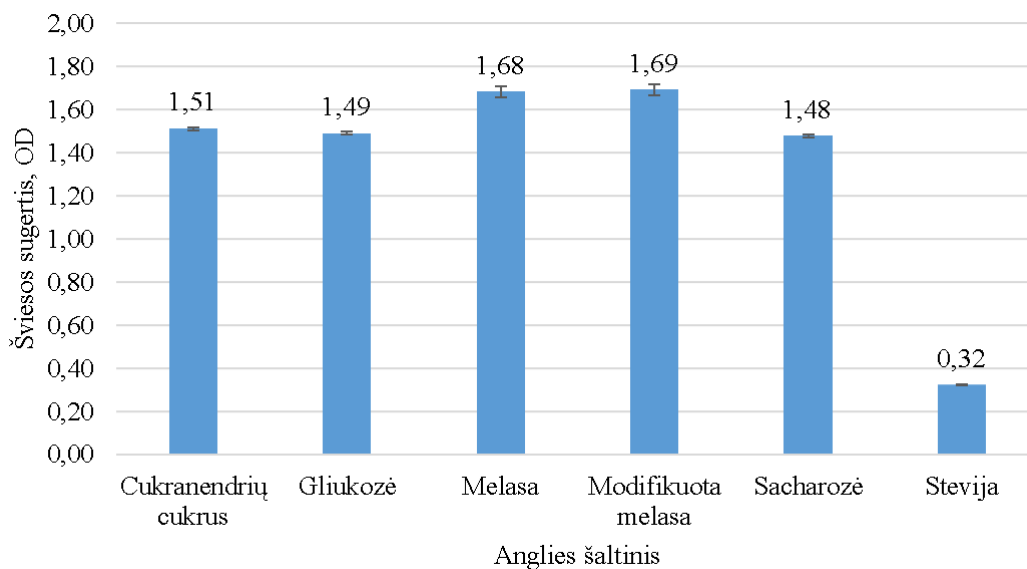
gliukozę bei sacharozę, fermentacijos proceso eigoje gaunamas ženklus PHA koncentracijos sumažėjimas.

3.3. PHA susidarymo iš skirtingų anglies šaltinių tyrimas, naudojant *Escherichia coli*



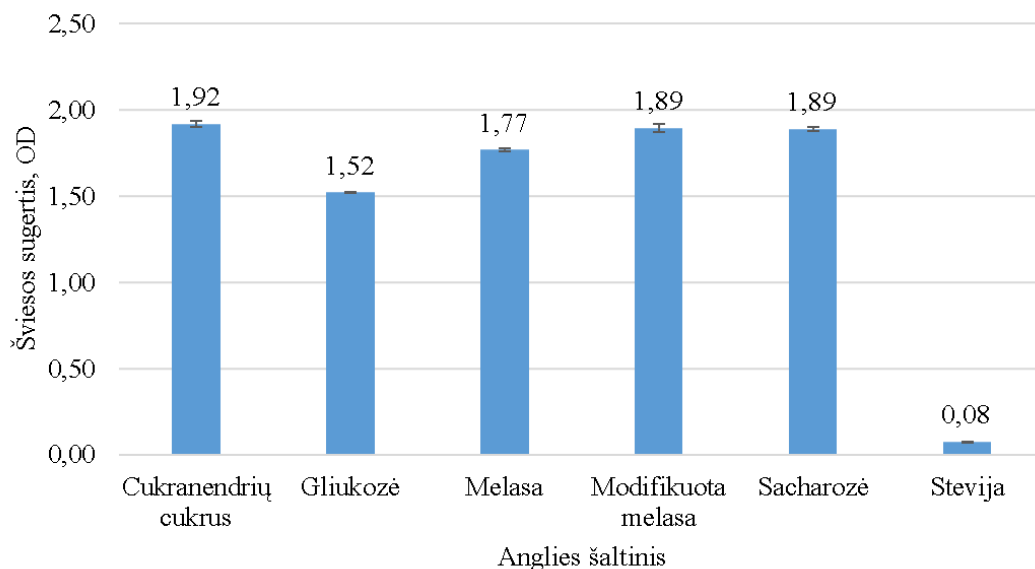
3.13 pav. Fermetacijos terpės šviesos sugertis po 24 valandų

Po 24 valandų fermentacijos (3.13 pav.) nustatyta, kad fermentacijos terpės, kurioje anglies šaltinis buvo melasa, šviesos sugerties vertė didžiausia (1,59 o. v.), o stevija – mažiausia (0,23 o. v.).



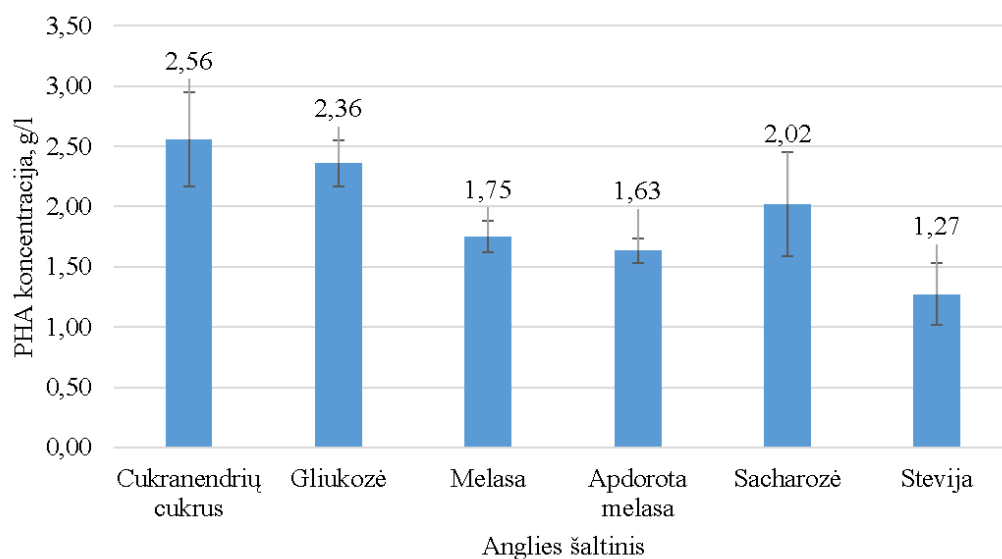
3.14 pav. Fermetacijos terpės šviesos sugertis po 48 valandų

Po 48 valandų (3.14 pav.) visų mėginių šviesos sugerčių vertės buvo didesnės nei po 24 valandų. Terpės, kurioje anglies šaltinis buvo modifikuota melasa, šviesos sugerties vertė buvo didžiausia (1,69 o. v.), o stevija – mažiausia (0,32 o. v.).



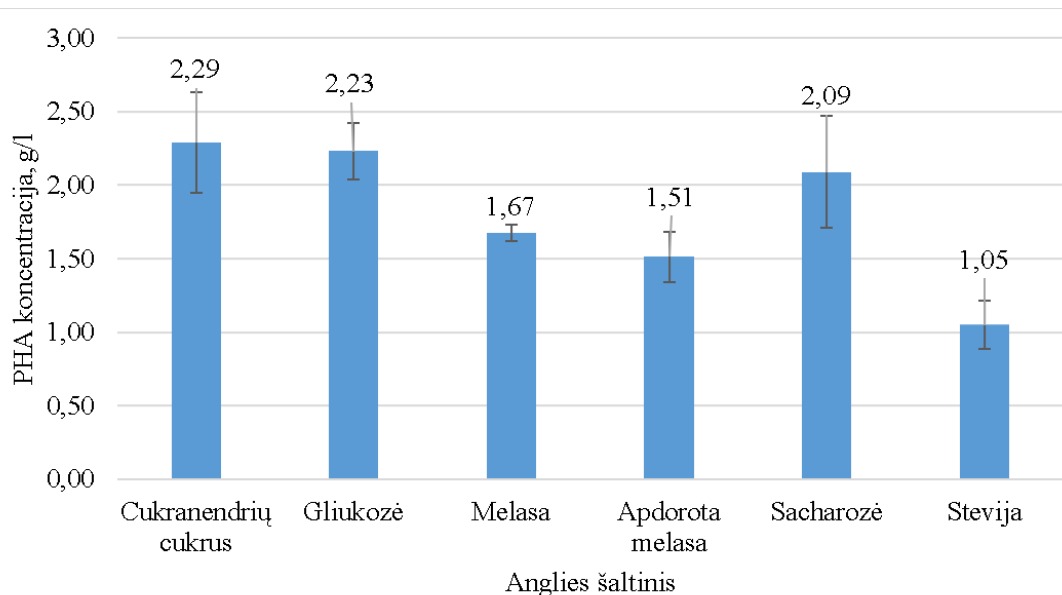
3.15 pav. Fermentacijos terpės šviesos sugertis po 72 valandų

Po 72 valandų (3.15 pav.) terpės su cukranendrių cukrumi išmatuota šviesos sugerties vertė buvo didžiausia (1,92 o. v.), o terpės su stevija šviesos sugerties vertė sumažėjo iki 0,08 o. v. ir buvo mažiausia.



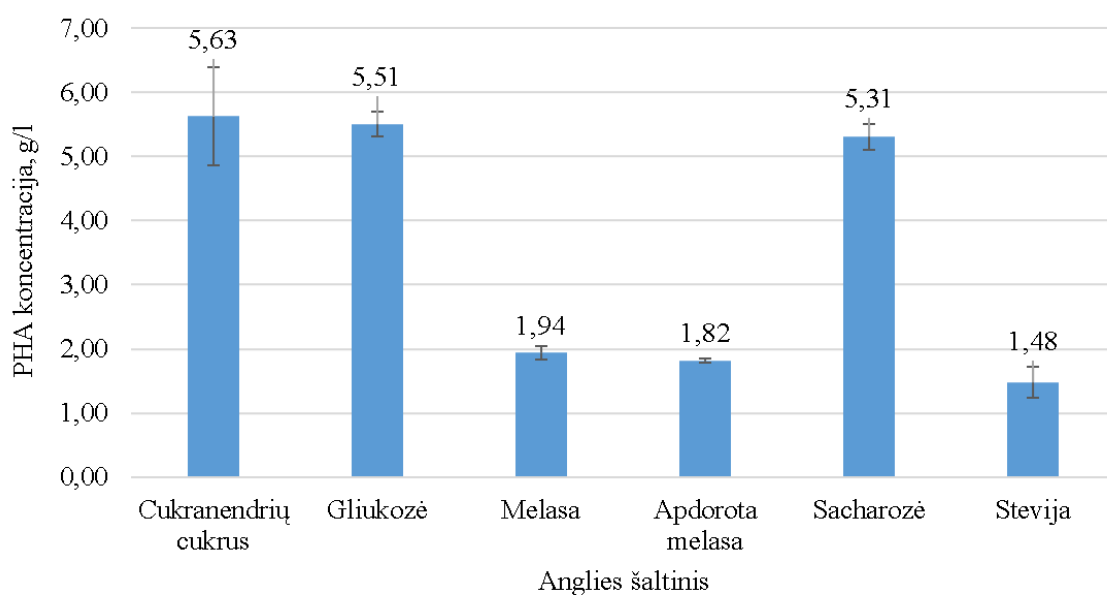
3.16 pav. PHA koncentracija fermentacijos terpėje po 24 valandų

Po 24 valandų fermentacijos (3.16 pav.) nustatyta, kad didžiausia PHA koncentracija susidarė mėginyje, kurio anglies šaltinis buvo cukranendrių cukrus (2,56 g/l), o mažiausia – stevija (1,27 g/l).



3.17 pav. PHA koncentracija fermentacijos terpėje po 48 valandų

Po 48 valandų (3.17 pav.) visuose mėginiuose, išskyrus tame, kurio anglies šaltinis buvo sacharozė, PHA koncentracijų vertės sumažėjo. Didžiausia PHA koncentracija nustatyta mėginyje, kuris gautas, kai anglies šaltinis buvo cukranendrių cukrus (2,29 g/l), o mažiausia – stevija (1,05 g/l).



3.18 pav. PHA koncentracija fermentacijos terpėje po 72 valandų

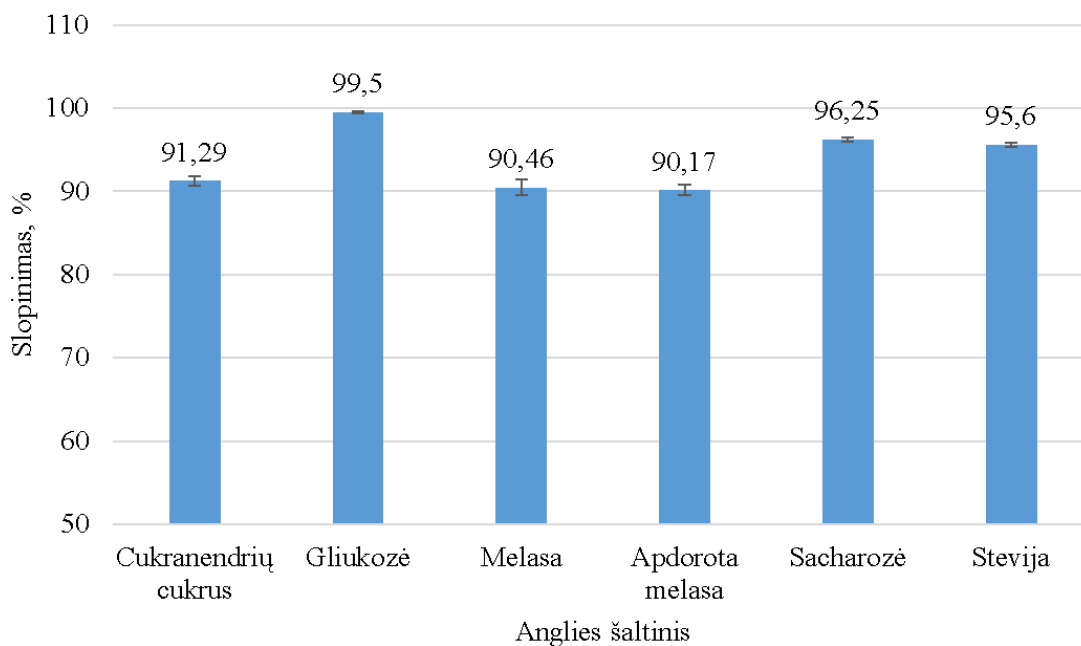
Po 72 valandų (3.18 pav.) nustatyta, kad visuose mėginiuose pakilo PHA koncentracija, o PHA, gauto naudojant cukranendrių cukrų, gliukozę ir sacharozę, ženkliai pakilo (atitinkamai nuo 2,29 g/l iki 5,63 g/l, nuo 2,23 iki 5,51 g/l ir nuo 2,09 iki 5,31 g/l).

Pagal surinktus duomenis galima teigti, jog PHA biosintezės iš *Escherichia coli* metu didžiausias PHA kiekis yra gaunamas, kai anglies šaltinis fermentacinėje terpėje yra cukranendrių cukrus, o mažiausias – stevija. Taip pat pastebėta, kad melasa pagal susidariusį PHA kiekį yra efektyvesnis anglies šaltinis nei apdorota melasa.

3.4. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu

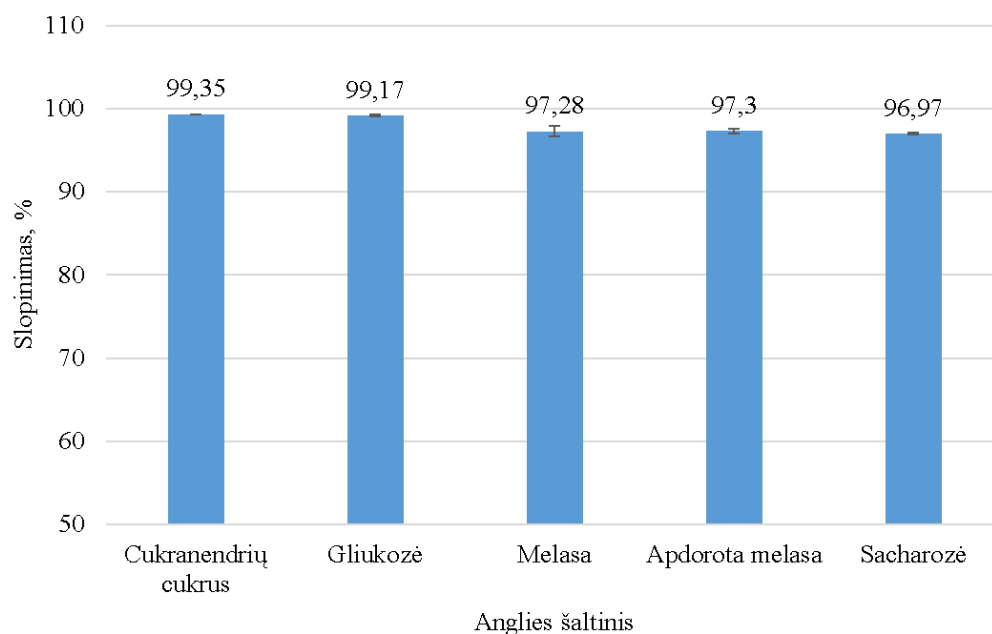
ABTS radikalo slopinimo tyrime dėl tiriamosios medžiagos trūkumo nebuvo tirti PHA, gauti iš *Cupriavidus necator*, kai anglies šaltinis buvo stevija ir *Eschericia coli*, kai anglies šaltinis buvo sacharozė.

Atlikus antioksidacinio aktyvumo tyrimą su ABTS radikalu, gauti rezultatai, naudojant visas bakterijų kultūras ir anglies šaltinius, viršijo 85 %, tai parodo, kad PHA mėginiai pasižymi aukšta antioksidacinio aktyvumo ABTS radikalui geba. Palyginimui, šį tyrimą atlikus su askorbo rūgštimi, gauta slopinimo vertė siekė 99,59 %.



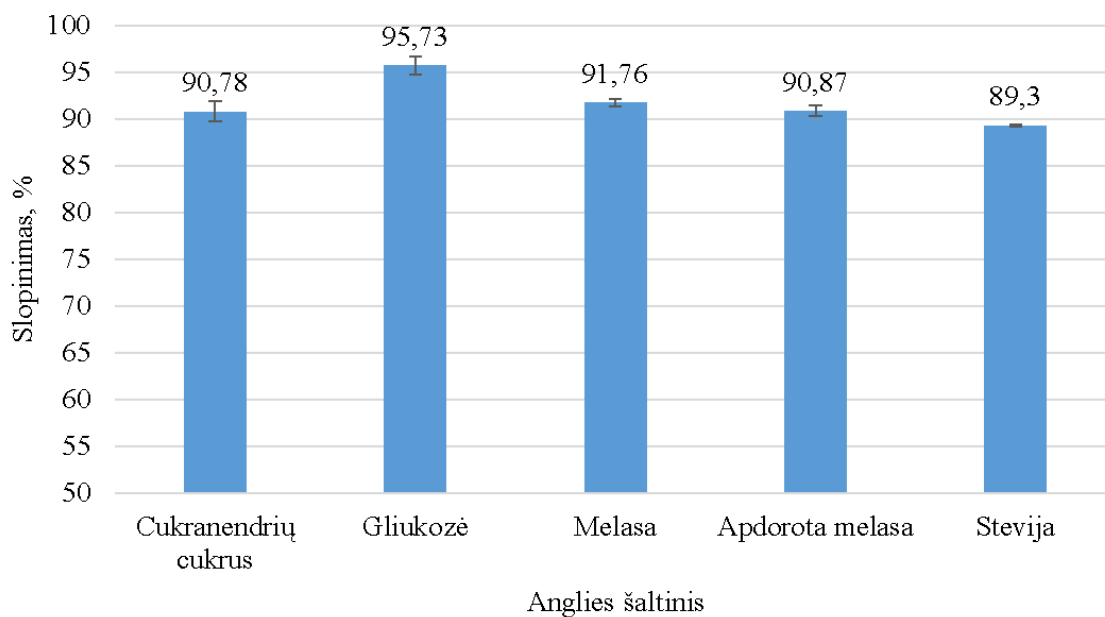
3.19 pav. ABTS slopinimo tyrimo rezultatai iš *Bacillus subtilis* pagamintų PHA

Iš *Bacillus subtilis* kultūros susintetintų PHA (3.19 pav.) gautas didžiausias slopinimo rezultatas, kai fermentacijos terpės anglies šaltinis buvo gliukozė (99,50 %), mažiausias – kai apdorota melasa (90,17 %).



3.20 pav. ABTS slopinimo tyrimo rezultatai iš *Cupriavidus necator* pagamintų PHA

Iš *Cupriavidus necator* kultūros susintetintų PHA (3.20 pav.) stipriausiu slopinimu pasižymėjo biopolimeras, gautas fermentacijos terpėje kaip anglies šaltinį naudojant cukranendrių cukrų (99,35 %), o silpniausiu – sacharozę (96,97 %).



3.21 pav. ABTS slopinimo tyrimo rezultatai iš *Escherichia coli* pagamintų PHA

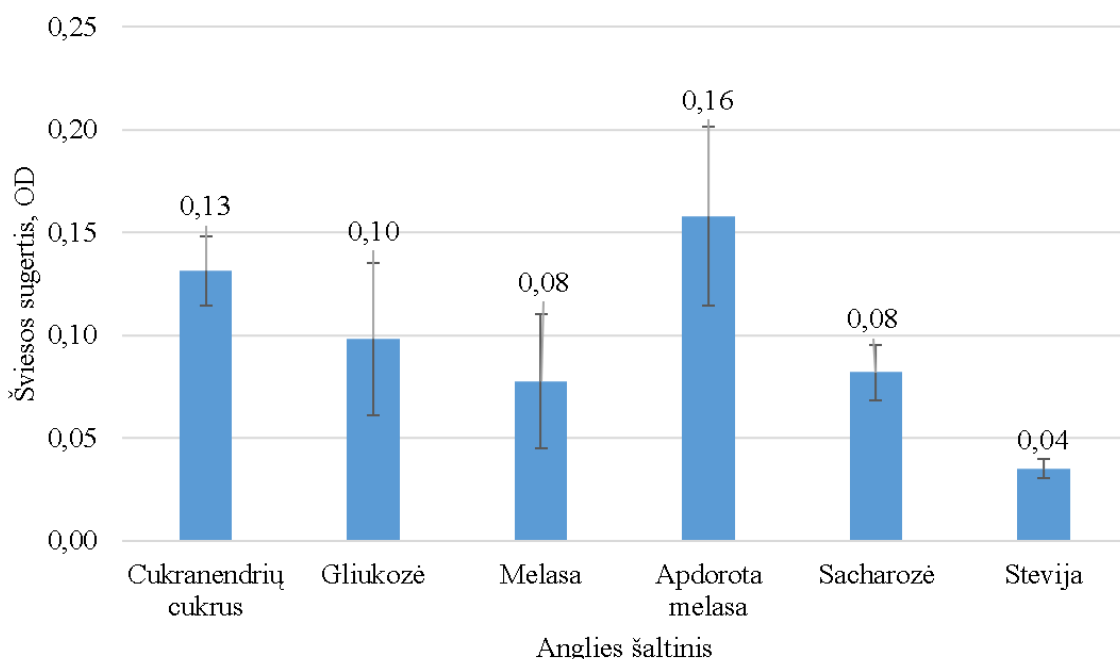
Iš *Escherichia coli* kultūros susintetintų PHA (3.21 pav.) didžiausiu ABTS slopinimo poveikiu pasižymėjo PHA, biosintetintas naudojant gliukozę (95,73 %), o mažiausiu – steviją (89,30 %).

Iš visų rezultatų didžiausiu slopinimu pasižymėjo PHA, gautas iš *Bacillus subtilis* kultūros, naudojant gliukozę (99,50 %), o silpniausiu slopinimu – susintetintas iš *Escherichia coli*, naudojant steviją (89,30 %).

3.5. Antioksidacinio (redukcinio) aktyvumo nustatymas

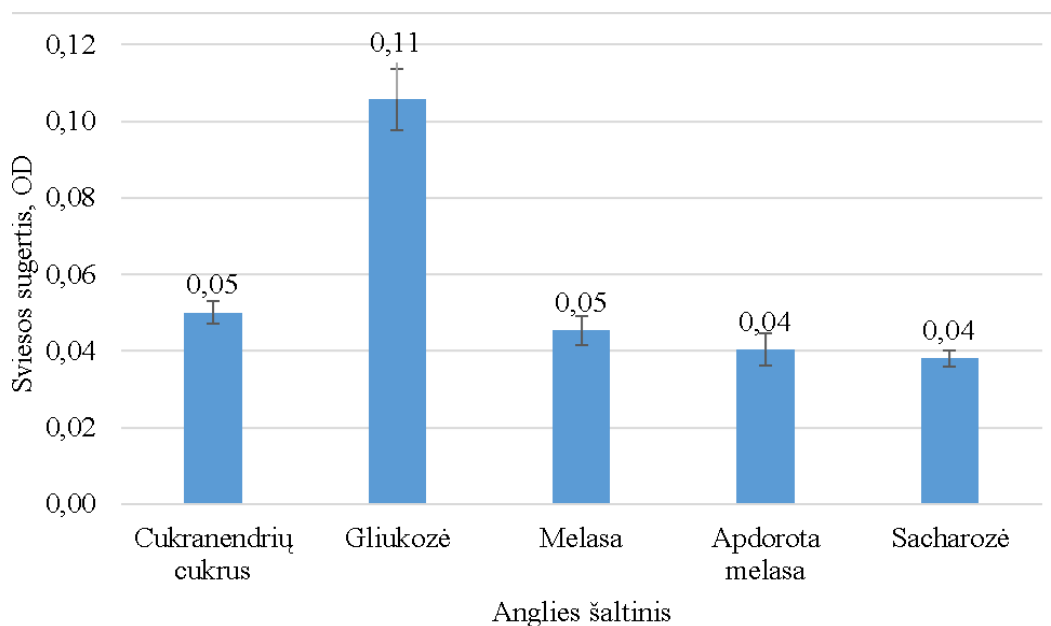
Redukcinio aktyvumo nustatymo tyrime dėl tiriamosios medžiagos trūkumo nebuvo tirti PHA, gauti iš *Cupriavidus necator*, kai anglies šaltinis buvo stevija ir *Escherichia coli*, kai anglies šaltinis buvo sacharozė.

Atliktas antioksidacinio (redukcinio) aktyvumo tyrimas parodė, kad gauti PHA pasižymi silpna geba redukuoti Fe^{3+} joną, palyginus su askorbo rūgštimi, kurios šviesos sugertis siekė 2,29 o. v.



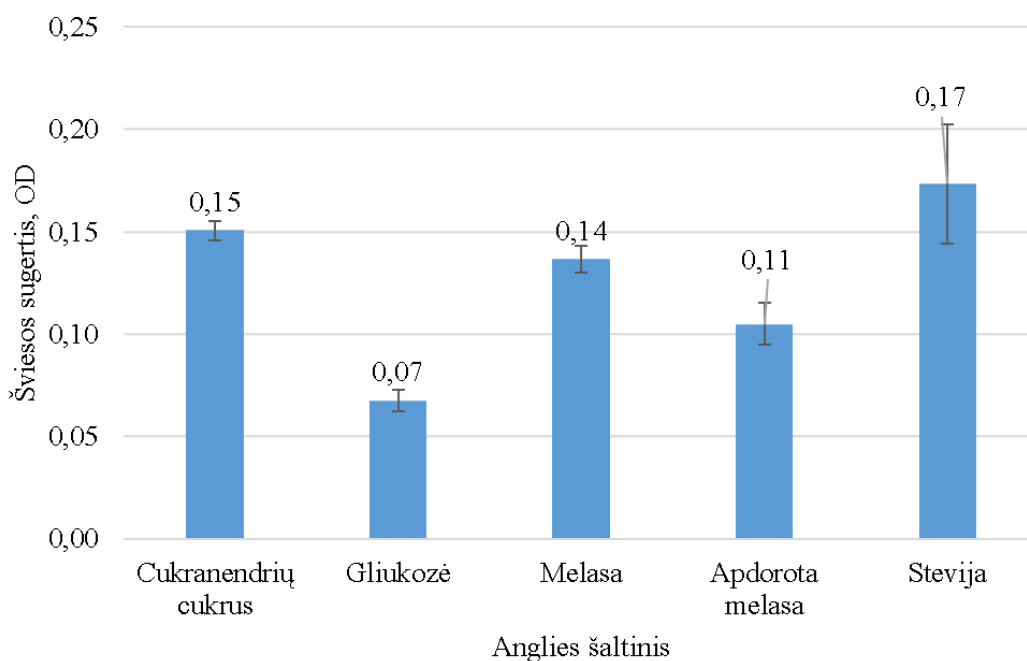
3.22 pav. Redukcinio aktyvumo tyrimo rezultatai iš *Bacillus subtilis* pagamintų PHA

Iš *Bacillus subtilis* kultūros susintetintų PHA (3.22 pav.) gautas didžiausias redukcinio aktyvumo rezultatas, kai fermentacijos terpės anglies šaltinis buvo apdorota melasa (0,16 o. v.), o mažiausias – kai stevija (0,04 o. v.).



3.23 pav. Redukcinio aktyvumo tyrimo rezultatai iš *Cupriavidus necator* pagamintų PHA

Iš *Cupriavidus necator* kultūros susintetintų PHA (3.23 pav.) didžiausia šviesos sugerties vertė gauta, kai anglies šaltinis buvo gliukozė (0,11 o. v.), o mažiausia – apdorota melasa ir sacharozė (0,04 o. v.).



3.24 pav. Redukcinio aktyvumo tyrimo rezultatai iš *Escherichia coli* pagamintų PHA

Iš *Escherichia coli* kultūros susintetintų PHA (3.24 pav.) didžiausia šviesos sugerties reikšmė gauta PHA, auginto terpėje, kurioje anglies šaltinis buvo stevija (0,17 o. v.), o mažiausia – gliukozė (0,07 o. v.).

Iš visų rezultatų didžiausiu redukciniu aktyvumu pasižymėjo PHA, susintetintas iš *Escherichia coli* kultūros, naudojant steviją (0,17 o. v.), o mažiausiu aktyvumu – susintetintas iš *Bacillus subtilis*, naudojant steviją (0,04 o. v.) arba *Cupriavidus necator*, naudojant apdorotą melasą ir sacharozę (0,04

o. v.). Tačiau įvertinant visus rezultatus, stipresnėmis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo PHA mėginiai, gauti iš *Bacillus subtilis*, lyginant su *Cupriavidus necator*.

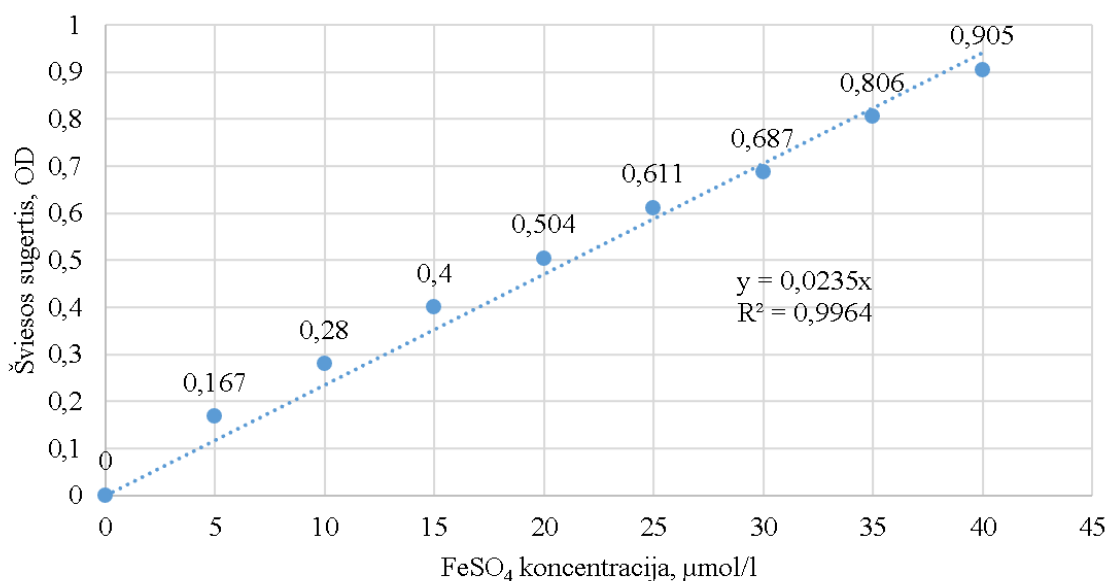
3.6. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu

Šiuo metodu atlikti tyrimai neparodė teigiamo rezultato, apskaičiuotos slopinimo reikšmės buvo neigiamos.

3.7. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas FRAP metodu

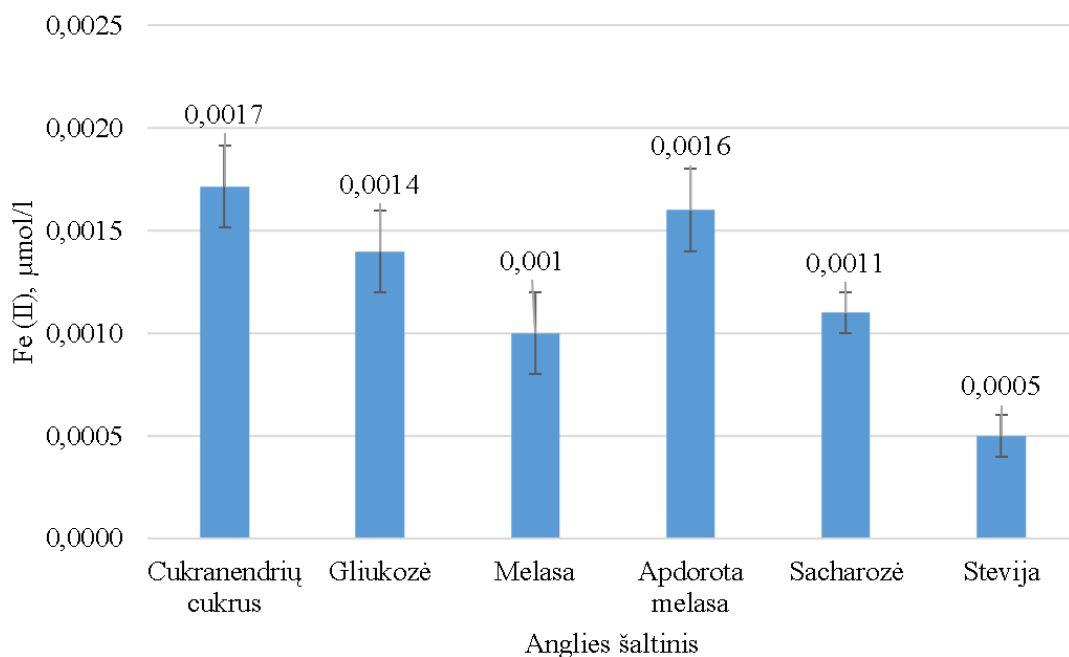
FRAP metodo tyrime dėl tiriamosios medžiagos trūkumo nebuvo tirti PHA, gauti iš *Cupriavidus necator*, kai anglies šaltinis buvo stevija ir *Eschericia coli*, kai anglies šaltinis buvo sacharozė.

Tyrimo metu matuota ir vėliau skaičiavimams naudota kalibracinė kreivė pateikta 3.25 pav.



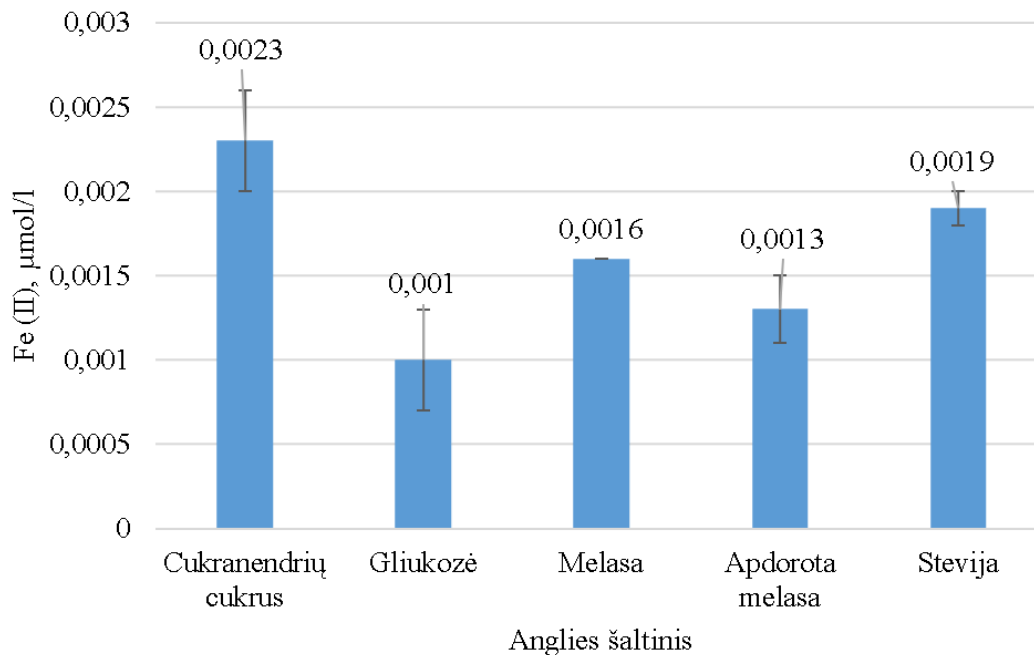
3.25 pav. FRAP tyrimo kalibracinė kreivė

Atlikus FRAP tyrimą su *Bacillus subtilis* pagamintais PHA (3.26 pav.) pastebėta, kad stipriausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo biopolimeras, kurio biosintezėje kaip anglies šaltinis naudotas cukranendrių cukrus (0,0017 µmol/l), panašus rezultatas nustatytas mėginyje su apdorota melasa (0,0016 µmol/l), o silpniausias antioksidacinis poveikis nustatytas mėginyje su stevija (0,0005 µmol/l).



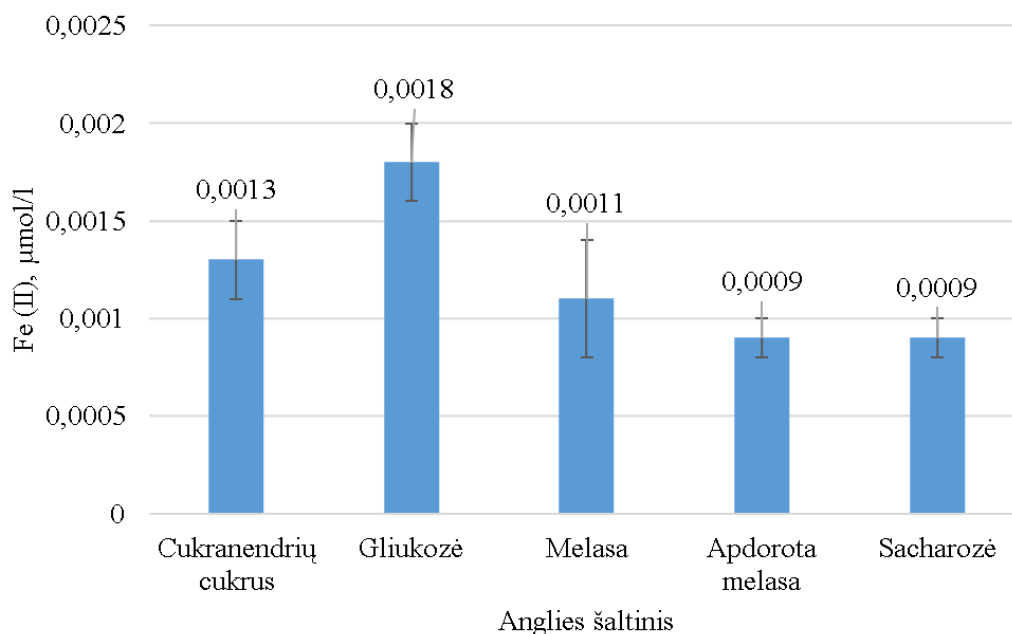
3.26 pav. FRAP tyrimo rezultatai iš *Bacillus subtilis* pagamintų PHA

Tyrimo, atlikto su *Cupriavidus necator* pagamintais PHA (3.27 pav.) rezultatai parodė, kad stipriausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo biopolimeras, pagamintas iš cukranendrių cukraus (0,0023 $\mu\text{mol/l}$), o silpniausiu – iš gliukozės (0,001 $\mu\text{mol/l}$).



3.27 pav. FRAP tyrimo rezultatai iš *Cupriavidus necator* pagamintų PHA

Iš *Escherichia coli* pagamintų PHA mėginių atlikto tyrimo metu (3.28 pav.) nustatyta, kad biopolimerai, susintetinti naudojant gliukozę, pasižymi stipriausiu antioksidaciniu poveikiu (0,0018 $\mu\text{mol/l}$), o naudojant apdorotą melasą ir sacharozę – silpniausiu (0,0009 $\mu\text{mol/l}$).

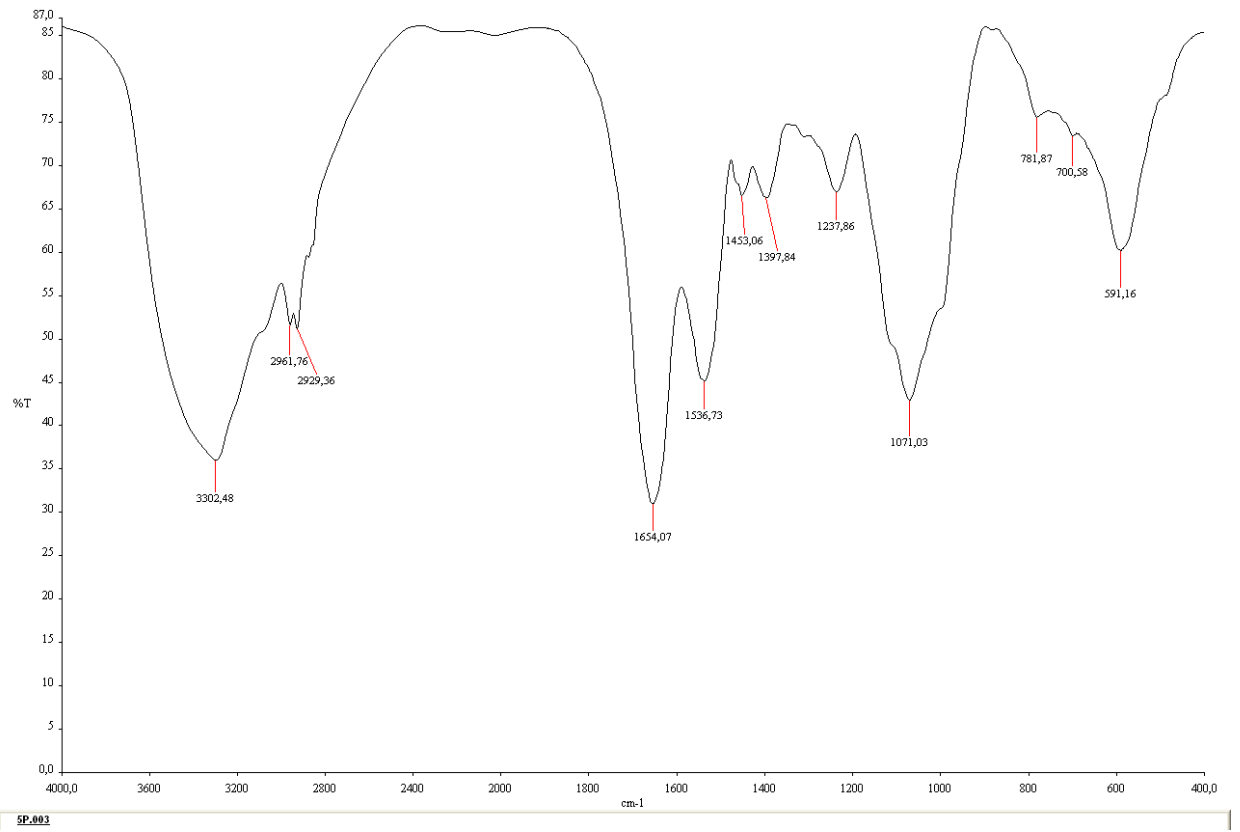


3.28 pav. FRAP tyrimo rezultatai iš *Escherichia coli* pagamintų PHA

Pagal gautus rezultatus galima spręsti, kad aktyviausiai FRAP redukcijos reakcijoje dalyvavo PHA, susintetintas iš *Cupriavidus necator*, kai anglies šaltinis buvo cukranendrių cukrus (0,0023 $\mu\text{mol/l}$), o silpniausią antioksidacinį poveikį prieš FRAP radikalą turėjo *Bacillus subtilis* iš stevijos susintetintas PHA (0,0005 $\mu\text{mol/l}$). Pastebėta, kad melasa pasižymėjo stipresniu antioksidaciniu poveikiu prieš FRAP reagentą nei apdorota melasa, o cukranendrių cukrus – nei sacharozė. Taip pat atliktas tyrimas parodė, kad PHA pasižymėjo silpna geba redukuoti Fe^{3+} -TPTZ reagentą, palyginus su askorbo rūgštimi (0,047 $\mu\text{mol/l}$).

3.8. FTIR tyrimo rezultatai

PHA, gauto iš *Bacillus subtilis*, kai melasa buvo panaudota kaip anglies šaltinis, atlikta FTIR analizė, o gautas spektras pavaizduotas 3.29 pav. Ties 3302,48 cm^{-1} matomas stiprus signalas būdingas O-H jungties virpesiams. Ties 2961,76 cm^{-1} ir 2929,36 cm^{-1} esančios smailės būdingos alifatiniais C-H jungties virpesiams. Ties 1654,07 cm^{-1} matomas signalas priskiriamas C=O jungčiai. Ties 1071,03 cm^{-1} matoma smailė gali būti priskiriama C-O virpesiui esterinėje grupėje. Šios smailės identifikuotos, remiantis T. R. Shamala ir kt. [63] išanalizuotu spektru, kuriame tarp 1724 cm^{-1} ir 1740 cm^{-1} identifikuoti C=O jungties virpesiai, o intervale tarp 1150-1300 cm^{-1} esantys pikai priskiriami C-O virpesiui esterinėje grupėje.



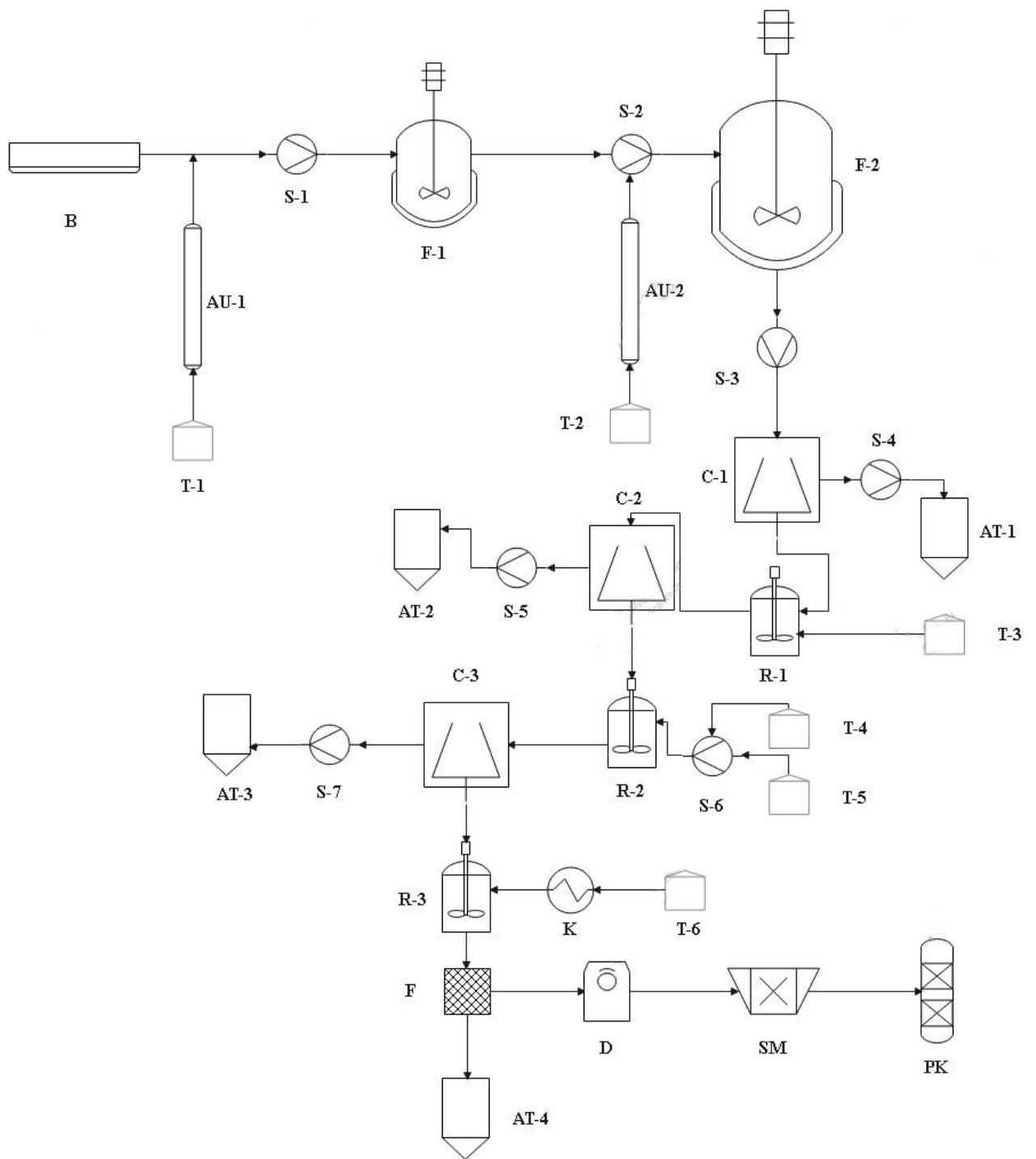
3.29 pav. PHA FTIR spektras

4. Rekomendacijų dalis

Atlikus tyrimus, aptarus gautus rezultatus bei išanalizavus R. De Gama ir kt. atliktą darbą [56], efektyviai polihidroksialkanoatų gamybai rekomenduojama taikyti pateiktą gamybinę schemą (4.1 pav.). Į fermentatorių **F-1** išcentrinu siurbliu **S-1** tiekama atgaivinta *Bacillus subtilis* kultūra **B** ir skysta LB terpė **T-1**, kuri prieš tiekimą yra sterilinama autoklave **AU-1**. Fermentatoriuje rekomenduojama palaikyti 35 °C temperatūrą. Iš jo kultūra išcentrinu siurbliu **S-2** tiekama į fermentatorių **F-2**, ten taip pat tiekama ir produkcijos terpė **T-2**, kuri yra sterilinama autoklavu **AU-2**. Produkcijos terpės sudėtyje yra rekomenduojamo anglies šaltinio cukranendrių cukraus. Fermentatoriuje **F-2** palaikoma 30 °C temperatūra, rekomenduojamas fermentacijos laikas yra 48 valandos. Fermentacijos mišinys tiekiamas **S-3** siurbliu į centrifugą **C-1**, kurioje atskirtos supernatanto atliekos siurbliu **S-4** tiekiamos į atliekų surinkimo talpą **AT-1**. Susidariusi biomasė tiekama į reaktorių **R-1**, kuriame yra maišoma su 0,4 % NaClO tirpalu iš **T-3** talpos, rekomenduojama reaktoriuje palaikyti 37 °C temperatūrą. Mišinys tiekiamas į centrifugą **C-2**, kurioje yra atskiriamos ląstelių nuolaužos ir kitos priemaišos. Supernatantas siurbliu **S-5** tiekiamas į atliekų talpą **AT-2**, o nuosėdos patenka į reaktorių **R-2**, kuriame yra maišomos su siurbliu **S-6** tiekiamu acetonu ir metanoliumi, kurių rekomenduojamas santykis yra 1:1. Toliau šis mišinys patenka į centrifugą **C-3**, kur yra atskiriamas PHA ir ištirpusios priemaišos, jos siurbliu **S-7** tiekiamos į atliekų talpą **AT-3**, o PHA patenka į reaktorių **R-3**, jame polimeras yra maišomas su chloroformu, tiekiamu iš talpos **T-6** per kaitintuvą **K**. Mišinys teka per filtrą **F**, chloroformas surenkamas talpoje **AT-4**, PHA granulės džiovinamos rotacinėje džiovykloje **D**, rekomenduojama džiovinimo temperatūra 50 °C. Išdžiovintas biopolimeras patenka į smulkintuvą **SM**, o susmulkintas produktas pakuojamas pakavimo kolonoje **PK**.

4.1 lentelė. Polihidroksialkanoatų gamybos principinės aparatūrinės schemos žymėjimas

Žymėjimas	Reikšmė
B	<i>Bacillus subtilis</i> bakterijų kultūra
AU-1, AU-2	Autoklavas
T-1, T-2, T-3, T-4, T-5, T-6	Žaliavos tiekimo talpa
S-1, S-2, S-3, S-4, S-5, S-6, S-7	Siurblys
F-1, F-2	Fermentatorius
C-1, C-2, C-3	Centrifuga
AT-1, AT-2, AT-3, AT-4	Atliekų surinkimo talpa
R-1, R-2, R-3	Reaktorius su maišykle
K	Kaitintuvas
F	Filtras
D	Rotacinė džiovyklė
SM	Smulkintuvas
PK	Pakavimo kolona



4.1 pav. Polihidroksialkanoatų gamybos aparatūrinė schema

Išvados

1. *Bacillus subtilis* polihidroksialkanoatų biosintezės metu iš visų tirtų anglies šaltinių produkcijos terpėje didžiausia produkto išeiga gauta, mitybinėje terpėje kaip anglies šaltinį naudojant cukranendrių cukrų (8,03 g/l).
2. *Cupriavidus necator* polihidroksialkanoatų biosintezės metu iš visų tirtų anglies šaltinių produkcijos terpėje didžiausia produkto išeiga nustatyta, fermentacijos terpėje kaip anglies šaltinį naudojant melasą ir apdorotą melasą (2,48 g/l). Pagal gautus rezultatus nustatyta, kad melasos apdorojimas produkto išeigai įtakos neturėjo.
3. *Escherichia coli* polihidroksialkanoatų biosintezės metu iš visų tirtų anglies šaltinių produkcijos terpėje didžiausia produkto išeiga buvo pasiekta, fermentacijos terpėje kaip anglies šaltinį naudojant cukranendrių cukrų (5,63 g/l).
4. Įvertinus visus polihidroksialkanoatų išeigos rezultatus, nustatyta, kad didžiausia polihidroksialkanoatų koncentracija gauta iš *Bacillus subtilis* kultūros po 48 valandų fermentacijos, kai anglies šaltinis fermentacijos terpėje buvo cukranendrių cukrus (8,03 g/l).
5. Atlikti gautų polihidroksialkanoatų iš skirtingų anglies šaltinių antioksidacinio aktyvumo tyrimai Fe (III) redukcijos, DPPH, FRAP, ABTS metodais.
 - a) Nustatyta, kad didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo iš *Bacillus subtilis* pagaminti polihidroksialkanoatai, kurių anglies šaltinis buvo melasa (0,16 o. v.), *Cupriavidus necator* – gliukozė (0,11 o. v.), o *Escherichia coli* – stevija (0,17 o. v.).
 - b) Didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pagal FRAP metodą iš *Bacillus subtilis* kultūros pagamintų produktų pasižymėjo PHA, biosintetintas naudojant cukranendrių cukrų (0,0017 $\mu\text{mol/l}$), *Cupriavidus necator* – cukranendrių cukrų (0,0023 $\mu\text{mol/l}$), o *Escherichia coli* – gliukozę (0,0018 $\mu\text{mol/l}$).
 - c) ABTS radikalą efektyviausiai iš *Bacillus subtilis* kultūros mėginių slopino PHA, kurio biosintezėje anglies šaltinis buvo gliukozė (99,5 %), *Cupriavidus necator* – cukranendrių cukrus (99,35 %), *Escherichia coli* – gliukozė (95,73 %).

Literatūros sąrašas

1. MOŽEJKO-CIESIELSKA, J. - KIEWISZ, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? In *Microbiological Research* . 2016. Vol. 192, no. 2016, p. 271–282.
2. FREDI, G. - DORIGATO, A. Recycling of bioplastic waste: A review. In *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research* [interaktyvus]. 2021. Vol. 4, no. 3, p. 159–177 [žiūrėta 2023-04-24]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2021.06.006>>.
3. Global Plastics Outlook | OECD iLibrary. [interaktyvus]. [žiūrėta 2023-05-23]. Prieiga per internetą: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/data/global-plastic-outlook_c0821f81-en>.
4. HARRIS, P.T. et al. A marine plastic cloud - Global mass balance assessment of oceanic plastic pollution. In *Continental Shelf Research* [interaktyvus]. 2023. Vol. 255, no. October 2022, p. 104947 [žiūrėta 2023-04-24]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.csr.2023.104947>>.
5. FORD, H. V. et al. The fundamental links between climate change and marine plastic pollution. In *Science of the Total Environment* [interaktyvus]. 2022. Vol. 806, p. 150392 [žiūrėta 2023-04-24]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150392>>.
6. LAM, S.S. et al. Plastic crisis underscores need for alternative sustainable-renewable materials. In *Journal of Bioresources and Bioproducts* [interaktyvus]. 2022. Vol. 7, no. 3, p. 145–147 [žiūrėta 2023-04-24]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.jobab.2022.06.001>>.
7. NOH, Y. et al. Environmental and human health risks of plastic composites can be reduced by optimizing manufacturing conditions. In *Journal of Cleaner Production* [interaktyvus]. 2022. Vol. 356, no. April, p. 131803 [žiūrėta 2023-04-24]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131803>>.
8. SANGKHAM, S. et al. A review on microplastics and nanoplastics in the environment: Their occurrence, exposure routes, toxic studies, and potential effects on human health. In *Marine Pollution Bulletin* [interaktyvus]. 2022. Vol. 181, no. June, p. 113832 [žiūrėta 2023-04-28]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113832>>.
9. NANDAKUMAR, A. et al. Bioplastics: A boon or bane? In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [interaktyvus]. 2021. Vol. 147, no. August 2020, p. 111237 [žiūrėta 2023-04-28]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111237>>.
10. OJOGBO, E. et al. Chemical and physical modifications of starch for renewable polymeric materials. In *Materials Today Sustainability* [interaktyvus]. 2020. Vol. 7–8, p. 100028 [žiūrėta 2023-04-28]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2019.100028>>.
11. ZHANG, Y. et al. Thermoplastic Starch Processing and Characteristics-A Review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* . 2014. Vol. 54, no. 10, p. 1353–1370.
12. WAGH, Y.R. et al. Preparation and characterization of milk protein films and their application for packaging of Cheddar cheese. In *Journal of Food Science and Technology* . 2014. Vol. 51, no. 12, p. 3767–3775.

13. BONNAILLIE, L.M. et al. Casein films: The effects of formulation, environmental conditions and the addition of citric pectin on the structure and mechanical properties. In *Polymers* . 2014. Vol. 6, no. 7, p. 2018–2036.
14. KOH, L.M. - KHOR, S.M. Biodegradation Process: Basics, Factors Affecting, and Industrial Applications. In *Handbook of Biodegradable Materials* . 2023. p. 19–56. ISBN 9783031097096.
15. VOLOVA, T.G. et al. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates with Different Chemical Compositions and Their Biodegradability. In *Microbial Ecology [interaktyvus]*. 2017. Vol. 73, no. 2, p. 353–367 [žiūrėta 2023-04-30]. Prieiga per internetą: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-016-0852-3>>.
16. BUGNICOURT, E. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. In *Express Polymer Letters* . 2014. Vol. 8, no. 11, p. 791–808.
17. GRADÍSSIMO, D.G. et al. Cyanobacterial polyhydroxyalkanoates: A sustainable alternative in circular economy. In *Molecules* . 2020. Vol. 25, no. 18, p. 1–23.
18. BASNETT, P. et al. Natural bacterial biodegradable medical polymers: Polyhydroxyalkanoates [interaktyvus]. Elsevier Ltd, 2017. 257–277 p. ISBN 9780081003930.
19. WANG, Q. et al. Production of block copolymer poly(3-hydroxybutyrate)- block -poly(3-hydroxypropionate) with adjustable structure from an inexpensive carbon source. In *ACS Macro Letters* . 2013. Vol. 2, no. 11, p. 996–1000.
20. REDDY, V.U.N. et al. Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production, Volume 3. In *Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production, Volume 3* . 2022. no. October.
21. CHANG, H.M. et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)- based scaffolds for tissue engineering. In *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* . 2014. Vol. 47, no. 7, p. 533–539.
22. CHAI, J.M. et al. Surface-modified highly biocompatible bacterial-poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate): A review on the promising next-generation biomaterial. In *Polymers* . 2021. Vol. 13, no. 1, p. 1–21.
23. THABET, A. - MOBARAK, Y. Predictable models and experimental measurements for electric properties of polypropylene nanocomposite films. In *International Journal of Electrical and Computer Engineering* . 2016. Vol. 6, no. 1, p. 120–129.
24. SHARMA, V. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. In *Polymer [interaktyvus]*. 2021. Vol. 212, p. 123161 [žiūrėta 2023-05-03]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123161>>.
25. EMAIMO, A.J. et al. Polyhydroxyalkanoates Composites and Blends: Improved Properties and New Applications. In *Journal of Composites Science* . 2022. Vol. 6, no. 7.
26. RAZA, Z. et al. Chemical modification of polyhydroxyalkanoates. In *Biotechnology Progress* . 2017. Vol. 34, no. 1, p. 29–41.

27. LI, Z. et al. Polyhydroxyalkanoates: Opening doors for a sustainable future. In *NPG Asia Materials* [interaktyvus]. 2016. Vol. 8, no. 4, p. e265-20 [žiūrėta 2023-05-03]. Prieiga per internetą: <<http://dx.doi.org/10.1038/am.2016.48>>.
28. VOSTREJS, P. et al. Active biodegradable packaging films modified with grape seeds lignin. In *RSC Advances* . 2020. Vol. 10, no. 49, p. 29202–29213.
29. NYGAARD, D. et al. PHA granule formation and degradation by *Cupriavidus necator* under different nutritional conditions. In *Journal of Basic Microbiology* . 2021. Vol. 61, no. 9, p. 825–834.
30. MCADAM, B. et al. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. In *Polymers* . 2020. Vol. 12, no. 12, p. 1–20.
31. MRAVEC, F. et al. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. In *FEMS Microbiology Letters* . 2016. Vol. 363, no. 10, p. 1–18.
32. CHEN, G.Q. et al. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. In *Trends in Biotechnology* . 2015. Vol. 33, no. 10, p. 565–574.
33. ZAKARIA GOMAA, E. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) By *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Grown on Cane Molasses Fortified with Ethanol. In *Arch. Biol. Technol.* v [interaktyvus]. 2014. Vol. 57157, no. 1, p. 145–154 [žiūrėta 2023-05-03]. Prieiga per internetą: <<http://www.scielo.br/pdf/babt/v57n1/20.pdf>>.
34. VALAPPIL, S.P. et al. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. In *Journal of Applied Microbiology* . 2008. Vol. 104, no. 6, p. 1624–1635.
35. LETTNER, M. et al. Factors influencing the market diffusion of bio-based plastics: Results of four comparative scenario analyses. In *Journal of Cleaner Production* . 2017. Vol. 157, p. 289–298.
36. KUMAR, M. et al. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. In *Journal of Cleaner Production* [interaktyvus]. 2020. Vol. 263, p. 121500 [žiūrėta 2023-05-03]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121500>>.
37. RAZA, Z.A. et al. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. In *International Biodeterioration and Biodegradation* . 2018. Vol. 126, no. September 2017, p. 45–56.
38. NIELSEN, C. et al. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. In *Microbial Biotechnology* . 2017. Vol. 10, no. 6, p. 1338–1352.
39. PESCUA, M. et al. Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. In *Applied Microbiology and Biotechnology* . 2015. Vol. 99, no. 15, p. 6183–6196.
40. KOLLER, M. et al. Biopolymer from industrial residues: Life cycle assessment of poly(hydroxyalkanoates) from whey. In *Resources, Conservation and Recycling* [interaktyvus]. 2013. Vol. 73, p. 64–71 [žiūrėta 2023-05-05]. Prieiga per internetą: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resconrec.2013.01.017>>.

41. AMARO, T.M.M.M. et al. Prospects for the use of whey for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. In *Frontiers in Microbiology* . 2019. Vol. 10, no. MAY.
42. OBRUCA, S. et al. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. In *Applied Microbiology and Biotechnology* . 2014. Vol. 98, no. 13, p. 5883–5890.
43. CHAUDHRY, W.N. et al. Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. In *Annals of Microbiology* . 2011. Vol. 61, no. 3, p. 623–629.
44. GANESH SARATALE, R. et al. A comprehensive overview and recent advances on polyhydroxyalkanoates (PHA) production using various organic waste streams. In *Bioresource Technology* . 2021. Vol. 325, no. November 2020.
45. KINGSLEY, J.S. et al. Utilization of sugarcane molasses as the main carbon source for the production of polyhydroxyalkanoates from *Enterobacter cloacae*. In *Energy Nexus [interaktyvus]*. 2022. Vol. 6, no. February, p. 100071 [žiūrėta 2023-05-08]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100071>>.
46. DALSSASSO, R.R. et al. Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. In *Process Biochemistry [interaktyvus]*. 2019. Vol. 85, no. May, p. 12–18 [žiūrėta 2023-05-09]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.007>>.
47. FABRA, M.J. et al. Microbiological and ageing performance of polyhydroxyalkanoate-based multilayer structures of interest in food packaging. In *Lwt* . 2014. Vol. 59, no. 2P1, p. 760–767.
48. CHEA, V. et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) films for food packaging: Physical-chemical and structural stability under food contact conditions. In *Journal of Applied Polymer Science* . 2016. Vol. 133, no. 2, p. 1–8.
49. DALTON, B. et al. A Review on Biological Synthesis of the Biodegradable Polymers Polyhydroxyalkanoates and the Development of Multiple Applications. In *Catalysts* . 2022. Vol. 12, no. 3.
50. DWIVEDI, R. et al. Poly hydroxyalkanoates (PHA): Role in bone scaffolds. In *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* . 2020. Vol. 10, no. 1, p. 389–392.
51. ZHANG, J. et al. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. In *Materials Science and Engineering C [interaktyvus]*. 2018. Vol. 86, p. 144–150 [žiūrėta 2023-05-09]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.035>>.
52. MURUEVA, A. V. et al. Microparticles prepared from biodegradable polyhydroxyalkanoates as matrix for encapsulation of cytostatic drug. In *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* . 2013. Vol. 24, no. 8, p. 1905–1915.
53. ELMOWAFY, E. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Applications in drug delivery and tissue engineering. In *Expert Review of Medical Devices [interaktyvus]*. 2019. Vol. 16, no. 6, p. 467–482 [žiūrėta 2023-05-03]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1080/17434440.2019.1615439>>.

54. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Welcome to the Leibniz Institute DSMZ. In [interaktyvus]. [žiūrėta 2023-05-23]. Prieiga per internetą: <<https://www.dsmz.de/>>.
55. PÉREZ-ARAUZ, A.O. et al. Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil. In Food Packaging and Shelf Life [interaktyvus]. 2019. Vol. 20, no. April 2018, p. 100297 [žiūrėta 2023-05-24]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.01.001>>.
56. GAMA, R. DE et al. Manufacturing of Polyhydroxyalkanoates (PHA) Process Modeling and Evaluation using SuperPro Designer ® For the Process Manufacturing Industries. In. 2022. no. March.
57. ZONDO, S.G. Production and characterization of polyhydroxyalkanoates (PHA) from corn silage using *Thermus thermophilus* HB8. [interaktyvus]. 2019. Prieiga per internetą: <https://openscholar.dut.ac.za/handle/10321/3356%0Ahttps://openscholar.dut.ac.za/bitstream/10321/3356/1/ZONDOSG_2019.pdf> [žiūrėta 2023-05-24].
58. RUMPF, J. et al. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. In International Journal of Biological Macromolecules . 2023. Vol. 233, no. February.
59. MINICKAITĖ, R. et al. Synthesis of Novel Aminothiazole Derivatives as Promising Antiviral, Antioxidant and Antibacterial Candidates. In International Journal of Molecular Sciences . 2022. Vol. 23, no. 14, p. 1–19.
60. XIAO, F. et al. Guidelines for antioxidant assays for food components. In Food Frontiers . 2020. Vol. 1, no. 1, p. 60–69.
61. HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, P. et al. Flavonoids [interaktyvus]. Elsevier Inc., 2019. 265–288 p. ISBN 9780128147740.
62. SILVERSTEIN, R.M. et al. Chapter 2: Infrared spectrometry. In Spectrometric identification of organic compounds . 2005. p. 502.
63. SHAMALA, T.R. et al. Production and characterization of bacterial polyhydroxyalkanoate copolymers and evaluation of their blends by fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. In Indian Journal of Microbiology . 2009. Vol. 49, no. 3, p. 251–258.

Informacijos šaltinių sąrašas

3. Global Plastics Outlook | OECD iLibrary. [Interaktyvus]. [žiūrėta 2023-05-23]. Prieiga per internetą: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/data/global-plastic-outlook_c0821f81-en>.
54. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Welcome to the Leibniz Institute DSMZ. [Interaktyvus]. [žiūrėta 2023-05-23]. Prieiga per internetą: <<https://www.dsmz.de/>>.