



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Anglies šaltinių įtaka alginato gamybai iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų ir antioksidaciniam aktyvumui

Baigiamasis magistro projektas

Laura Augustinaitytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2024



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Anglies šaltinių įtaka alginato gamybai iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų ir antioksidaciniam aktyvumui

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Laura Augustinaitytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Doc. dr. Kristina Kantminienė

Recenzentė

Kaunas, 2024



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Laura Augustinaitytė

Anglies šaltinių įtaka alginato gamybai iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų ir antioksidaciniam aktyvumui

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.

Laura Augustinaitytė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Augustinaitytė, Laura. Anglies šaltinių įtaka alginato gamybai iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų ir antioksidaciniam aktyvumui. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: alginatas, *Azotobacter vinelandii*, anglies šaltiniai, antioksidacinis aktyvumas.

Kaunas, 2024. 64 p.

Santrauka

Natūralus polisacharidas alginatas dėl unikalių savybių yra vienas iš plačiausiai naudojamų biopolimerų. Gebėjimas sudaryti gelius, biologinis suderinamumas su kitomis medžiagomis, fizikocheminės savybės ir biologinis aktyvumas lemia platų alginato panaudojimą medicinos, farmacijos, maisto, kosmetikos ir tekstilės pramonėje. Alginato gamyba fermentacijos būdu iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų tampa svarbiu tyrimų objektu siekiant komercializuoti mikrobinius polimerus. Didelės gamybos sąnaudos – vienas iš pagrindinių veiksnių, ribojančių alginato gamybos iš bakterijų pritaikymą pramoniniu mastu. Įvairiais tyrimais nustatyta, kad antrinių žaliavų naudojimas kaip anglies šaltinio, fermentacijos parametrų kontrolė bei genų inžinerijos metodai gali efektyviai sumažinti gamybos išlaidas bei padidinti gaminamo produkto koncentraciją.

Biotechnologinė alginato gamyba atlikta naudojant gramneigiamas *Azotobacter vinelandii* bakterijas, fermentaciją vykdant 72 valandas. Atliktų tyrimų metu buvo ištirta fermentacijos trukmės ir devyniolikos skirtingų anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasei ir alginato koncentracijai, nustatytos redukuojančių cukrų koncentracijos, įvertintas pagamintų alginatų antioksidacinis aktyvumas, alginato struktūros identifikavimui nubraižyti FT-IR spektrai. Iš tirtų tradicinių ir alternatyvių anglies šaltinių didžiausia (1,51 g/l) alginato koncentracija po 24 valandų trukmės fermentacijos gauta, kai mitybinėje terpėje anglies šaltiniu buvo naudotas citrinų žievelių hidrolizatas. Pagamintų alginatų antioksidacinio aktyvumo rezultatai pagal FRAP ir redukcinį metodą parodė, kad didžiausios antioksidacinės savybės, atitinkamai 8,73 $\mu\text{mol/l}$ ir 0,30 o.v., buvo būdingos alginatui, kai jo gamybai anglies šaltiniu naudotas obuolių žievelių hidrolizatas.

Augustinaitytė, Laura. Influence of Carbon Sources on the Production of Alginate by *Azotobacter vinelandii* and Antioxidant Activity. Master's Final Degree Project / supervisor Assoc. Prof. dr. Ilona Jonuškienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: alginate, *Azotobacter vinelandii*, carbon sources, antioxidant activity.

Kaunas, 2024. 64.

Summary

The natural polysaccharide alginate is one of the most widely used biopolymers due to its unique properties. The ability to form gels, biocompatibility with other substances, physicochemical properties and biological activity determine the wide use of alginate in the medical, pharmaceutical, food, cosmetic and textile industries. The production of alginate by fermentation from *Azotobacter vinelandii* bacteria is becoming an important research object in order to commercialize microbial polymers. High production costs are one of the main factors limiting the application of alginate production from bacteria on an industrial scale. Various studies have established that the use of secondary raw materials as a carbon source, control of fermentation parameters and genetic engineering methods can effectively reduce production costs and increase the concentration of the produced product.

Biotechnological production of alginate was carried out using gram-negative *Azotobacter vinelandii* bacteria, fermentation was carried out for 72 hours. During the conducted research, the influence of fermentation duration and nineteen different carbon sources on bacterial biomass and alginate concentration was investigated, the concentration of reducing sugars was determined, the antioxidant activity of the produced alginates was evaluated, FT-IR spectra were drawn to identify the structure of alginate. Among the studied traditional and alternative carbon sources, the highest concentration (1.51 g/L) of alginate after 24 hours of fermentation was obtained when lemon peel hydrolysate was used as a carbon source in the nutrient medium. The results of the antioxidant activity of the produced alginates by FRAP and the reduction method showed that the highest antioxidant properties, respectively 8.73 $\mu\text{mol/L}$ and 0.30 o.u., were characteristic of alginate when apple peel hydrolysate was used as a carbon source.

Turinys

Lentelių sąrašas	8
Paveikslų sąrašas	9
Santrumpų ir terminų sąrašas	11
Įvadas.....	12
1. Literatūros apžvalga	13
1.1. Alginatas.....	13
1.2. Alginatas iš dumblių.....	14
1.3. Alginatas iš bakterijų.....	14
1.3.1. Alginato biosintezės mechanizmas <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijose.....	15
1.4. Alginatų fizikinės savybės.....	16
1.4.1. Gelio formavimas	17
1.5. Alginatų cheminė modifikacija	18
1.6. Alginatų biologinis aktyvumas.....	19
1.6.1. Antioksidacinis aktyvumas.....	19
1.6.2. Antibakterinis aktyvumas.....	19
1.7. Fermentacijos sąlygų įtaka alginato gamybai iš <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijų	20
1.8. Įvairių anglies šaltinių įtaka alginato gamybai.....	21
1.9. Alginatų kapsuliavimo technikos	23
1.10. Alginatų panaudojimas.....	24
1.10.1. Alginatų taikymas biomedicinoje.....	24
1.10.2. Augalų ekstraktų įkapsuliavimas naudojant natrio alginato kapsules.....	25
1.10.3. Alginatai maisto pramonėje.....	26
1.10.4. Kitos alginatų panaudojimo sritys	27
1.11. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	27
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	28
2.1. Tyrimų metu naudotų reagentų sąrašas	28
2.2. Laboratorinės įrangos sąrašas.....	28
2.3. Produkcijos ir kultivavimo terpės sudėtis.....	28
2.4. Terpės pH matavimas	29
2.5. Naudoti anglies šaltiniai	30
2.6. Atsinaujinančių šaltinių pavertimas į redukuojančius cukrus	31
2.7. Išdžiovintų <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijų atgaivinimas	32
2.8. <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijų kultivavimas.....	32
2.9. Inokulianto paruošimas ir įnešimas į produkcijos terpę.....	32
2.10. Bakterijų biomasės ir alginato gavimas.....	33
2.10.1. Ląstelių biomasės nusodinimas	33
2.10.2. Alginato nusodinimas.....	33
2.11. Gliukozės kalibracinės kreivės sudarymas	34
2.12. Alginatų, pagamintų naudojant skirtingus anglies šaltinius, antioksidacinio aktyvumo nustatymas	34
2.12.1. Antioksidacinių savybių įvertinimas naudojant DPPH metodą	34
2.12.2. Reducinių savybių nustatymas	35

2.12.3. Antioksidacinių savybių nustatymas pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ	35
2.13. FT-IR spektrų užrašymas	36
2.14. Jonažolės ekstrakto įkapsuliavimas kalcio alginato kapsulėje	37
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	38
3.1. Anglies šaltinių įtaka <i>A. vinelandii</i> bakterijų biomasės augimui	38
3.1.1. Rezultatai, kai anglies šaltiniais buvo naudoti tradiciniai angliavandeniai	38
3.1.2. Antrinių žaliavų, kaip anglies šaltinių, įtaka <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijų biomasės augimui	41
3.2. Anglies šaltinių įtaka alginato gamybai iš <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijų	43
3.2.1. Tradicinių anglies šaltinių įtaka alginato koncentracijai	43
3.2.2. Alternatyvių anglies šaltinių įtaka alginato koncentracijai	44
3.2.3. Alginato gamybos rezultatų palyginimas su literatūros šaltiniais	46
3.3. Redukuojančių cukrų nustatymas	46
3.4. pH matavimų rezultatai	48
3.5. Alginatų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	48
3.5.1. Alginatų antioksidacinių savybių įvertinimas naudojant redukcinį metodą.....	48
3.5.2. Alginatų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą	49
3.6. Jonažolės ekstrakto, įkapsuliuoto į kalcio alginato kapsules, antioksidacinio aktyvumo tyrimas 51	
3.7. FT–IR analizės rezultatai.....	52
4. Rekomendacijų dalis	55
Išvados	58
Literatūros sąrašas	59
Publikacijų sąrašas	64
Priedai.....	65
1 priedas. Komercinio natrio alginato FT-IR spektras	65

Lentelių sąrašas

2.1 lentelė. Cheminių reagentų sąrašas	28
2.2 lentelė. Bakterijų kultivavimo terpės sudėtis	29
2.3 lentelė. Produkcijos terpės sudėtis	29
2.4 lentelė. Kalibracinės kreivės sudarymas	34
3.1 lentelė. Rezultatų palyginimas	46
3.2 lentelė. Alginatų FT-IR spektrų analizė	54
4.1 lentelė. Aparatūrinės schemos žymėjimas	56

Paveikslų sąrašas

1.1 pav. Alginato struktūra.....	13
1.2 pav. Alginato biosintezės mechanizmo principinė schema.....	16
1.3 pav. Kalcio alginato sudaromas „kiaušinio dėžutės“ modelis	17
1.4 pav. Ekstruzijos ir emulsinimo metodų schema.....	23
1.5 pav. Alginatų panaudojimo sritys	24
2.1 pav. Šaltyje išdžiovintų <i>A. vinelandii</i> bakterijų ampulės atidarymo technika	32
2.2 pav. Alginato gamybos iš <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijų pagrindiniai etapai	33
2.3 pav. DPPH radikalo redukcijos reakcijos mechanizmas.....	34
2.4 pav. FRAP metodo mechanizmo reakcija.....	36
2.5 pav. Ekstraktų įkapsuliavimo į kalcio alginato kapsules principinė schema	37
3.1 pav. Bakterijų biomasės koncentracijos priklausomybė nuo anglies šaltinio po 24 valandų fermentacijos	38
3.2 pav. Bakterijų biomasės koncentracijos priklausomybė nuo anglies šaltinio po 48 valandų fermentacijos	38
3.3 pav. Bakterijų biomasės priklausomybė nuo anglies šaltinio po 72 valandų fermentacijos.....	39
3.4 pav. Angliavandenių alkoholių, kaip anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasės koncentracijai po 24 valandų fermentacijos.....	39
3.5 pav. Angliavandenių alkoholių, kaip anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasės augimui po 48 valandų fermentacijos.....	40
3.6 pav. Angliavandenių alkoholių, kaip anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasės koncentracijai po 72 valandų fermentacijos.....	40
3.7 pav. Alternatyvių anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasės koncentracijai po 24 valandų fermentacijos	41
3.8 pav. Bakterijų biomasės koncentracijos priklausomybė nuo anglies šaltinio, po 48 valandų fermentacijos	42
3.9 pav. Bakterijų biomasės koncentracijos priklausomybė nuo anglies šaltinio po 72 valandų fermentacijos	42
3.10 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo fermentacijos trukmės ir naudoto anglies šaltinio	43
3.11 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo fermentacijos laiko ir skirtingų anglies šaltinių	43
3.12 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo fermentacijos trukmės ir anglies šaltinio....	44
3.13 pav. Alternatyvių anglies šaltinių ir fermentacijos trukmės įtaka alginato koncentracijai	44
3.14 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo laiko ir skirtingų anglies šaltinių	45
3.15 pav. Anglies šaltinių įtakos alginato koncentracijai rezultatų apibendrinimas	45
3.16 pav. Gliukozės kalibracinė kreivė	47
3.17 pav. Redukuojančių cukrų koncentracijos priklausomybė nuo fermentacijos laiko ir anglies šaltinio	47
3.18 pav. Redukuojančių cukrų koncentracijos priklausomybė nuo laiko ir anglies šaltinių.....	47
3.19 pav. Anglies šaltinių įtaka alginato antioksidaciniam aktyvumui pagal redukcinį metodą	48
3.20 pav. Alginatų, gautų naudojant alternatyvius anglies šaltinius, antioksidacinis aktyvumas pagal redukcinį metodą	49
3.21 pav. FeSO ₄ ·7H ₂ O kalibracinė kreivė FRAP metodui	49

3.22 pav. Alginatų, gautų naudojant skirtingus anglies šaltinius, antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą	50
3.23 pav. Alternatyvių anglies šaltinių įtaka alginatų antioksidaciniam aktyvumui pagal FRAP metodą	50
3.24 pav. Jonažolės ekstraktas įkapsuliuotas į kalcio alginato kapsules.....	51
3.25 pav. Įkapsuliavimo įtaka jonažolės ekstrakto antioksidaciniam aktyvumui pagal DPPH metodą	51
3.26 pav. Alginato, gauto anglies šaltiniu naudojant gliukozę, FT-IR spektras	52
3.27 pav. Alginato, gauto anglies šaltiniu naudojant kokosų palmių žiedų cukrų, FT-IR spektras..	52
3.28 pav. Alginato, gauto anglies šaltiniu naudojant D-manitolį, FT-IR spektras.....	53
3.29 pav. Alginato, gauto anglies šaltiniu naudojant citrinų žievelių hidrolizatą, FT-IR spektras ...	53
3.30 pav. Alginato, gauto anglies šaltiniu naudojant apelsinų žievelių hidrolizatą, FT-IR spektras	53
4.1 pav. Alginato gamybos iš <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijų aparatūrinė schema	55

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

- AlgA - fosfomanozės izomerazė;
- AlgC – fosfomanozės-mutazė;
- AlgD – GDF-manozės-dehidrogenazė;
- BMR – branduolių magnetinis rezonansas;
- CoA – kofermentas A;
- DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;
- DNS – 3,5-dinitrosalicilo rūgštis;
- EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimidazolis;
- FDA – maisto ir vaistų administracija (*angl.* Food and drug administration);
- FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia;
- FT-IR – Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija;
- GDF – guanozino difosfatas;
- NHS – *N*-hidroksisukcinimidazolis;
- PGA – propilenglikolio alginatas;
- TPTZ - 2,4,6-tripiridil-*s*-triazinas.

Įvadas

Didėjantis natūralių medžiagų poreikis bei siekis išspręsti aplinkosaugines problemas skatina ieškoti naujų būdų biomedžiagoms gauti iš atsinaujinančių šaltinių. Biopolimerų gamyba iš augalų ir mikroorganizmų tapo vienu iš perspektyviausiu būdu tvarumui vystyti. Iš rudadumblių ląstelių ir *Azotobacter vinelandii* bakterijų gaminamas alginatas, dar vadinamas algino rūgštimi, pasižymi unikalių savybių gausa, leidžiančių šį polimerą panaudoti įvairiose srityse. Dėl plačių pritaikymo galimybių maisto, medicinos, farmacijos bei kosmetikos pramonėse alginatų poreikis nuolat auga, todėl ieškoma būdų kaip kuo efektyviau optimizuoti jo gamybą pramoniniu būdu. Iki šiol pagrindinis šaltinis naudojamas komerciniam alginatui gaminti yra jūros dumbliai, kadangi tai pigus, plačiai paplitęs ir atsinaujinantis šaltinis. Tačiau iš dumblių gaminami alginatai yra mažos molekulinės masės ir grynumo, jų savybės labai priklauso nuo sezoniškumo ir dumblių augimo sąlygų, kas ypač apriboja alginatų panaudojimą biomedicinos srityje. Populiarėjanti alternatyva, galinti pakeisti alginatų gamybą iš dumblių yra bakterijų sintetiniai egzopolisacharidai. Didžiausias iš bakterijų gaminamų alginatų privalumas yra tas, kad reguliuojant ir kontroliuojant fermentacijos procesą bei atliekant chemines modifikacijas galima gauti tam tikromis savybėmis pasižyminčius alginatus, kas padidina šio biopolimero pritaikymo galimybes. Tam, kad alginatas iš bakterijų būtų gaminamas pramoniniu mastu reikalingas gamybos išlaidų sumažinimas. Dideliems gamybos kaštams turi įtakos grynų angliavandenių (gliukozės, sacharozės, laktozės), kaip substratų naudojimas bakterijoms augti. Pagrindinis būdas padidinti gamybos efektyvumą – anglies turinčių antrinių žaliavų, kaip pigių anglies šaltinių, naudojimas. Maisto ir žemės ūkio pramoninių antrinių žaliavų, tokių kaip vaisių žievelių, glicerolio ar pieno išrūgų naudojimas gali ne tik efektyviai sumažinti gamybos sąnaudas ar padidinti gaminamo alginato kiekį, bet ir turėti įtaką atliekų valorizacijai, poveikio aplinkai sumažinimui [1, 2].

Tyrimo tikslas – nustatyti ir palyginti įvairių anglies šaltinių įtaką alginato gamybai iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų bei antioksidaciniam aktyvumui.

Tyrimo uždaviniai:

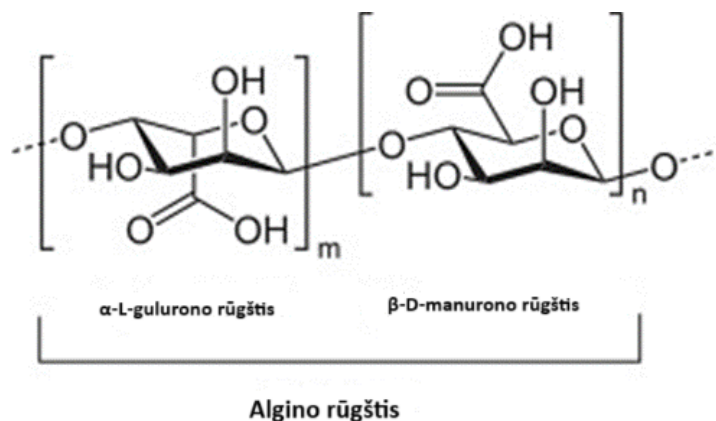
1. optimizuoti alginato biotechnologinę gamybą, naudojant skirtingus anglies šaltinius;
2. nustatyti ir palyginti tradicinių bei alternatyvių anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasės koncentracijai ir alginato gamybai;
3. įvertinti fermentacijos trukmės įtaką alginato gamybai iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų;
4. ištirti pagamintų alginatų antioksidacinio aktyvumo savybes pagal DPPH, redukcinį ir FRAP metodus;
5. pateikti didžiausių koncentracijų alginato mėginių FT-IR spektrus bei palyginti juos su komercinio natrio alginato spektru.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Alginatas

Alginatas – tai anijoninis, hidrofilinis, komerciškai iš rudadumблиų išgaunamas polisacharidas, priklausantis nešakotų kopolimerų šeimai. Kaip ekstraląstelinį polimerą alginatus biologiškai sintetina ir tokios bakterijos kaip *Azotobacter vinelandii* bei *Pseudomonas spp.* Tiek iš dumблиų, tiek iš bakterijų gauti alginatai pasižymi įvairiomis biofizikinėmis, biocheminėmis ir biologinėmis savybėmis, leidžiančiomis šiuos biopolimerus pritaikyti įvairiose pramonės srityse. Pagrindinės savybės, nulemiančios įvairiapusį alginatų panaudojimą yra gebėjimas sudaryti gelius, biologinis suderinamumas, tirpumas, netoksiškumas, bioskaidumas, antioksidacinės savybės. Šios alginatų savybės yra nulemiamos jų struktūros ypatumais bei šaltinio, iš kurio šis polimeras buvo išgautas [3].

Chemiškai alginatas yra sudarytas iš 1,4-glikozidiniais ryšiais sujungtų 1,4-β-D-manurono rūgšties (M) ir jos C5 epimero α-L-gulurono rūgšties (G) liekanų. Šios rūgščių liekanos atsitiktinai išsidėsčiusios išilgai grandinės ir apima kiekvienos urono rūgšties sekas. M ir G liekanos gali sudaryti homopolimerines (GG ar MM) ir heteropolimerines (GM, MG) blokų grandines. Alginato struktūroje svarbiausias yra G blokas, nes tik jis turi įtakos sąveikai su divalenciais jonais, kurie dalyvauja sudarydami hidrogelius. Alginato struktūroje gausu laisvųjų hidroksilo (-OH) ir karboksilo (-COOH) grupių, leidžiančių jiems sudaryti intramolekulinius vandenilinius ryšius. Sekų sudėtis, santykinė grandinės molekulinė masė, blokų ilgis bei M/G santykis molekulėje yra pagrindiniai veiksniai nulemiantys biopolimero gebėjimą formuoti gelį, tirpumą bei kitas svarbias savybes [4].



1.1 pav. Alginato struktūra [5]

Alginato struktūra nustatoma naudojant ne tik įvairius biocheminius tyrimus, bet ir sudėtingus analizės metodus, tokius kaip chromatografija ir spektroskopija. Vienas pagrindinių ir plačiausiai naudojamų būdų alginato molekulinei struktūrai ir cheminei sudėčiai tirti yra ¹H BMR ir FT-IR spektroskopija [6]. ¹H BMR spektroskopijos funkcionalumas priklauso nuo alginato gebėjimo sujungti katijonus ir sudaryti vandenyje netirpų gelį. Informacija apie urono rūgšties sudėtį alginatė gaunama analizuojant signalų padėtis spektre bei santykinės sritis anomerinėje zonoje. Šios analizės metu gauta informacija leidžia apskaičiuoti M/G santykį bei šių vienetų pasiskirstymą polimero grandinėje. Nustatyta, jog fizikinėms alginatų savybėms svarbios GG blokų sekos, kurios lemia standesnį, kietesnį alginatinio gelio susidarymą, kai tuo metu MM blokų sekos – minkštesnio [7].

1.2. Alginatas iš dumblių

Jūros dumbliuose gausu polisacharidų, kurių koncentracija gali siekti iki 76 % visos sausos masės, priklausomai nuo dumblių rūšies bei auginimo sąlygų. Alginatas yra vienas iš pagrindinių polisacharidų, randamų ruduosiuose jūros dumbliuose, kaip ląstelių sienelių bei tarpląstelinės matricos struktūrinė sudedamoji dalis. Šis polisacharidas užtikrina augalo mechaninį stiprumą bei lankstumą, reikalingą išgyventi jūrinėse sąlygose [8]. Alginato biosintezės mechanizmas makrodumbliuose iki šiol nėra iki galo nustatytas, tačiau mokslininkų atlikti medžiagų apykaitos tyrimai leido nustatyti galimą biosintezės kelią. Pagal tyrimų duomenis, alginato susidarymo dumbliuose mechanizmą galima suskirstyti į tris pagrindinius etapus. Pirmasis etapas apima fruktozės-6-fosfato pavertimo guanozino-difosfato-manurono rūgštimi (GDP-ManA), vykstant fermentinėms reakcijoms. Antrajame etape GDP-ManA yra pernešamas per citoplazminę membraną ir membranoje esančiais baltymais polimerizuojamas į polimanuronatą. Paskutinis etapas – modifikacijos procesas, susidedantis iš epimerizacijos ir skilimo reakcijų. Epimerizacijos reakcijos metu fermentas manuronato C5 epimerazė vykdo izomerizaciją iš manurono rūgšties į gulurono rūgštį. Po šio etapo susidaro alginato polimeras [9].

Komercinis alginatas išgaunamas iš *Phaeophyceae* šeimos rudadumblių, daugiausiai iš *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria hyperborea* ir *Macrocystis pyrifera*. Alginato ekstrakcijos iš dumblių metodas apima keletą pagrindinių etapų. Pirmiausiai atliekamas pirminis dumblių biomasės apdorojimas, kurio metu medžiaga išdžiovinama ir mechaniškai suardoma malant. Tam, kad būtų ištirpinti ląstelės komponentai, pašalinti priešjoniai bei sumažintas alginato klampumas, medžiaga apdorojama mineralinėmis rūgštimis. Po apdorojimo rūgštimis vykdomas ekstrahavimas šarmais, dažniausiai naudojant natrio karbonatą ar natrio hidroksidą, kurio metu išgaunama algino rūgštis kaip tirpus natrio alginatas. Nuosėdoms atskirti atliekamas centrifugavimas arba filtravimas. Alginatui nusodinti druskos arba rūgšties pavidalu į gautą ekstraktą pridedama kalcio chlorido arba sieros rūgšties. Pabaigoje, gautas alginatas yra išdžiovinamas, susmulkinamas bei paruošiamas naudojimui. Šis alginatų ekstrahavimo metodas yra plačiai taikomas pramonėje, tačiau būdas yra sudėtingas, reikalaujantis daug laiko, cheminių medžiagų ir tirpiklių sąnaudų. Šiuo metu atliekami įvairūs tyrimai siekiant optimizuoti ekstrahavimo metodą, panaudojant ekstruderius, ultragarsą bei kitas pirminio apdorojimo technologijas [10].

1.3. Alginatas iš bakterijų

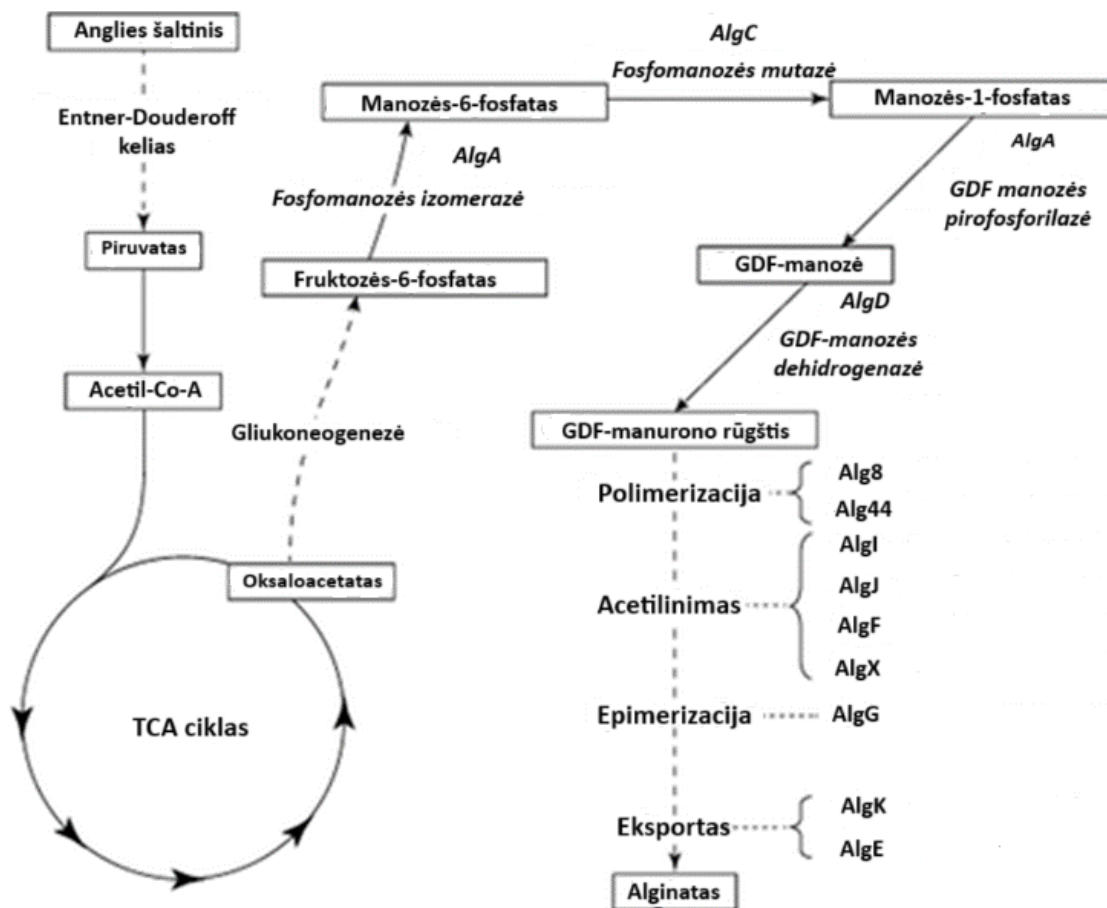
Per pastaruosius kelerius metus iš bakterijų sintetinami egzopolisacharidai tapo vienu svarbiausiu mokslinių tyrimų objektu siekiant pakeisti tradiciniu būdu iš dumblių, gyvūnų bei augalų gaunamus polisacharidus. Yra žinoma, jog iš bakterijų išskiriami polisacharidai pasižymi unikaliomis savybėmis, leidžiančiomis juos pritaikyti biomedicinos, kosmetikos ir farmacijos srityse, kuriose tradicinių biopolimerų naudojimas yra ribotas, nes neatitinka reikiamo grynumo, ar neturi specifinių funkcinių savybių [11]. Laisvai dirvožemyje gyvenančios *Azotobacter vinelandii* ir žmogaus patogeninės *Pseudomonas spp.* bakterijos yra pagrindiniai alginatą sintetinantys mikroorganizmai. Šios bakterijos sintetina alginatus skirtingais tikslais, todėl gauti alginatai skiriasi savo savybėmis bei pritaikymo galimybėmis. *P. aeruginosa*, dar žinoma kaip gleivinė padermė, alginatą gausiai sintetina esant stresinėms ląstelės sąlygoms. Pagal mokslinius tyrimus buvo įrodyta, jog alginatas šios rūšies bakterijose dalyvauja sudarant bioplėvelę, užtikrinančią atsparumą šeimininko imuninei sistemai ir antimikrobinėms medžiagoms. *Azotobacter vinelandii* bakterijos alginatą biosintetina dideliais kiekiais vegetatyvinio augimo metu, kur alginatas atlieka apsauginę funkciją, saugodamas nuo

deguonies difuzijos bei sunkiųjų metalų. Šios bakterijos sintetinamas alginatas pasižymi didesniu standumu, nes paprastai struktūroje turi didesnę G liekanos koncentraciją. Kadangi *Pseudomonas spp* rūšies bakterijos yra patogeninės, o *Azotobacter vinelandii* FDA pripažinta saugia rūšimi, apibrėžtos sudėties alginatams gaminti dažniausiai naudojama būtent ši bakterija [12, 13].

Azotobacter vinelandii bakterijų sintetinami alginatai turi keletą privalumų, lyginant su dumblių alginatais. Pirmiausia, bakterinis alginatas dėl O-acetilavimo C2 ir C3 padėtyse, skiriasi fizikinėmis bei cheminėmis savybėmis, nes acetilavimas turi įtakos klampumui, kalcio jonų sąveikai, manuronano epimerazės ir liazės reakcijoms, todėl galima gauti įvairių savybių alginatą. Antra, dumblius sudėtinga auginti laboratorinėmis sąlygomis, todėl iš jų gautų alginatų fizikocheminės savybės nėra apibrėžtos ir priklauso nuo dumblių augimo sąlygų, vietovės ir sezoninių veiksnių. Priešingai nei dumbliai, bakterijos auginamos laboratorinėmis sąlygomis, kurios leidžia kontroliuoti ir optimizuoti alginato sintezę, keičiant fermentacijos sąlygas (temperatūrą, pH, koncentraciją) gauti polimerą su reikiamomis savybėmis [14].

1.3.1. Alginato biosintezės mechanizmas *Azotobacter vinelandii* bakterijoje

Griežtai aerobinė, gramneigiama, azotą fiksuojanti ir plačiai dirvožemyje paplitusi *Azotobacter vinelandii* bakterija yra biotechnologiškai potencialus mikroorganizmas, gaminantis alginatą kaip ekstraląstelinę medžiagą [15]. Alginato biosintezė bakterinėse ląstelėse yra sudėtingas ir daug etapų apimantis procesas, kuriame tiesiogiai dalyvauja mažiausiai 24 genai. Struktūriniai genai koduoja baltymus, dalyvaujančius alginato pirmtako sintezėje (*algD* ir *algA*), polimerizacijoje (*alg8* ir *alg44*), periplazminiame perkėlime, modifikacijose (*algG*, *algK*, *algX*, *algV*, *algI*, *algF*, *algL*) bei eksportavime per išorinę membraną (*algJ*) [16]. Biosintezės mechanizmas prasideda, kai anglies šaltinis, turintis C6 substratą, *Entner-Doudoroff* būdu paverčiamas piruvatu. Piruvatas yra nukreipiamas į trikarboksirūgšties ciklą (TCA), iš kurio oksaloacetatas gliukoneogenezės būdu yra paverčiamas fruktozės-6-fosfatu, reikalingu alginato pirmtako GDF-manurono rūgšties sintezei. Toliau vyksta citozoliniai fermentiniai procesai. Fruktozės-6-fosfatas, katalizuojamas fermento fosfomanozės izomerazės (*AlgA*) paverčiamas manozės-6-fosfatu. Fermentas fosfomanozės-mutazė (*AlgC*) manozės-6-fosfatą paverčia izomeru manozės-1-fosfatu, kuris katalizuojamas dar vieno fermento – GDF manozės pirofosforilazės, paverčiamas GDF-manoze. Šio fermento aktyvumas inicijuoja atvirkštinę reakciją, tačiau fermentas *AlgD* (GDF-manozės-dehidrogenazė) GDF-manozę negrįžtamai verčia į GDF-manurono rūgštį. Didelis tarpląstelinis GDF-manozės kiekis rodo, jog *AlgD* katalizuojama reakcija yra pagrindinis greitį ribojantis veiksnys šiame sintezės procese [17]. Manuronato polimerazė atlieka GDF-manurono rūgšties polimerizaciją ir jos pernešimą per citoplazminę membraną. Alginato modifikacija, išskyrus epimerizacijos reakciją, vyksta periplazmoje, kur atliekamas M liekanų acetilavimas ir molekulinės masės kontroliavimas, veikiant alginato liazei (*algL*). Epimerizacijos reakcijos metu periplazminė manuronano C5-epimerazė (*AlgG*), katalizuoja neacetilintų β-D-manurono rūgšties liekanos pavertimą į jos epimerą β-L-gulurono rūgštį. Galiausiai alginatas eksportuojamas per išorinę membraną [18].



1.2 pav. Alginato biosintezės mechanizmo principinė schema [19]

1.4. Alginatų fizikinės savybės

Fizikinės alginatų savybės priklauso nuo jų molekulinės masės bei M ir G blokų santykinio pasiskirstymo molekulėje. Molekulinė masė alginatuose gali skirtis priklausomai nuo šaltinio tipo bei ekstrahavimo proceso parametrų. Klampumas ir gelio sudarymas yra pagrindinės molekulinės masės nulemiamos savybės. Didesnės molekulinės masės alginatai pasižymi gebėjimu sudaryti didelio klampumo gelius, kurių naudojimas pramonėje nėra tinkamas dėl per didelių šlyties jėgų, reikalingų maišymui. Komerciškai gaminamo natrio alginato molekulinė masė svyruoja nuo 32 000 iki 400 000 g/mol [20].

Alginatų tirpalų klampumui įtakos turi koncentracija, temperatūra, divalenčių jonų buvimas tirpale bei tirpiklio pH. Mažėjant pH reikšmei, tirpalo klampumas didėja. Šį pokytį lemia karboksilo grupės protonavimas polimero grandinėje. Alginatai sudaro gelius rūgštinėje terpėje, kai pH 3–4, o pH vertei esant didesnei kaip 10 – klampumas mažėja dėl vykstančios depolimerizacijos [21].

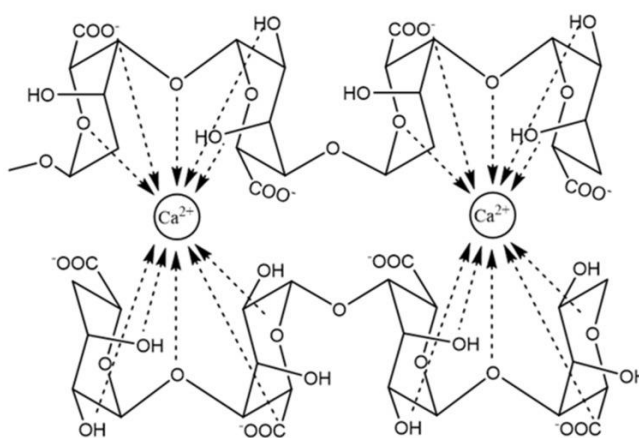
Alginatų tirpumui įtakos turi šie pagrindiniai veiksniai: tirpiklio pH, terpės joninis stiprumas, divalenčių ir trivalenčių metalų jonų buvimas tirpiklyje bei biopolimero struktūra. Nustatyta, jog alginatai stabilesni esant šarminiai terpei, kai pH 10, tačiau viršijus šią vertę prasideda depolimerizacijos procesas. Alginatui ištirpti, karboksilo ($-\text{COO}^-$) grupės turi būti deprotonuotos, tam tikslui tirpalo pH neturi būti mažesnis nei tam tikra kritinė pH vertė. Kritinis pH diapazonas priklauso nuo alginato cheminės sudėties, M ir G blokų sekos bei molekulinės masės. Alginatai, kurių

struktūroje vyrauja heterogeniniai MG blokai bus nusodinami esant žemesnėms pH vertėms, lyginant su alginatais, kurių struktūroje dominuoja homogeniniai blokai. Joninis tirpalo stiprumas turi įtakos polimero grandinės konformacijai, ilgiui bei klampai, todėl atitinkamai kintant joniniam stiprumui, pasikeičia ir alginato tirpumas. Algino rūgščiai sąveikaujant su divalenčiais (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+}) ar trivalenčiais (Fe^{3+} , Al^{3+}) metalų katijonais, susidaro rūgšties druskos, kurios paprastai netirpsta vandenyje. Alginato druskos su vienvalenčiais jonais, tokiais kaip Na^+ , K^+ ir NH_4^+ , tirpsta tiek šaltame, tiek karštame vandenyje, bet netirpsta organiniuose tirpikliuose [21, 22].

1.4.1. Gelio formavimas

Svarbiausia alginatų savybė – gebėjimas formuoti joninius gelius sąveikaujant su daugiavalenčiais metalų katijonais. Ši savybė yra alginatų pritaikymo pramonėje pagrindas. Gelis susidaro vykstant jonų mainams tarp vienvalenčių (dažniausiai Na^+) alginato tirpalo jonų ir divalenčių ar trivalenčių katijonų. Dažniausiai naudojamas katijonas alginatiniams geliams formuoti yra kalcis (Ca^{2+}).

Gelio formavimo mechanizmas apibūdinamas kaip koordinacinis procesas tarp alginato karboksilo grupių ir daugiavalenčių metalų jonų. Metalo jonas, pavyzdžiui, Ca^{2+} , koordinaciniais ryšiais jungiasi su dviem gretimais alginato molekulinės grandinės G vienetais, sudarydamas struktūrą, kuri vadinama „kiaušinių dėžute“. Mokslininkų atlikti tyrimai parodė, kad kalcio alginato gelio formavimosi procesas susideda iš trijų pagrindinių etapų. Mechanizmas prasideda nuo Ca^{2+} jonų sąveikos su vienu iš grandinės G vienetu, sudarant monokompleksą. Monokompleksai susijungia tarpusavyje, sudarydami „kiaušinių dėžutės“ dimerus. Pabaigoje, dimerai sudaro daugiakompleksinę struktūrą [žr. 1.3 pav.].



1.3 pav. Kalcio alginato sudaromas „kiaušinio dėžutės“ modelis [23]

Gelio susidarymą lemia katijono ir kryžminių jungčių tipas, alginato molekulinė masė, polimerizacijos laipsnis, grandinės ilgis ir koncentracija. Alginatai, kurių struktūroje yra didesnis G blokų kiekis, sudaro stabilesnius gelius, todėl padidinus G blokų kiekį ir molekulinę masę gaunami kieti ir trapūs geliai. MG ir MM blokai taip pat gali dalyvauti sudarant gelius, tačiau tokiu atveju gaunami elastingesni ir minkštesni geliai. Alginato giminingumas divalenčiams jonams, su kuriais sąveikaujant susidaro gelis, išsidėsto taip: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$. Manoma, kad katijono dydis turi įtakos gelio stiprumui, nes didesnis katijonas pasižymi stipresnėmis surišimo jėgomis jungimosi zonose, todėl susidaro stipresnis gelis. Trivalenčiai katijonai, dėl savo gebėjimo jungtis su trimis karboksilo grupėmis vienu metu, taip pat gali būti naudojami alginatų geliams gaminti. Panaudojant

alginatų savybę formuoti gelius sukurtos įvairios alginato pagrindu gaminamos medžiagos, tokios kaip hidrogeliai, membranos, neaustiniai audiniai ir pluoštai [23].

1.5. Alginatų cheminė modifikacija

Siekiant įdiegti naujas arba pagerinti esamas alginatų savybes yra atliekama jų cheminė modifikacija. Alginato struktūroje esančios laisvos hidroksilo ir karboksilo grupės cheminiais ir fizikiniais metodais leidžia keisti alginato biologinį suderinamumą, fizikochemines savybes, tirpumą bei kontroliuoti iš alginatų gaminamų medžiagų biologinį skaidumą. Modifikuoti alginatai naudojami regeneraciniėje medicinoje, vaistų tiekimo sistemose, žaizdas gydančių tvarsčių bei hidrogelių gamyboje. Atliekant cheminę modifikaciją svarbu atsižvelgti į alginatų degradacijos procesui įtakos turinčius veiksnius. Cheminiam skilimui įtakos turi rūgštinės ir šarminės sąlygos, dumbliuose esantis fenolinių junginių kiekis, sterilizacijos metodai (apdorojimas aukšta temperatūra, etileno oksidu, γ spinduliuote). Šarminėje terpėje, kurioje pH didesnis kaip 10, alginatų skilimas vyksta β -eliminacijos būdu protonui skylant C6 padėtyje. Rūgštinėmis sąlygomis, kai pH 5 ir mažesnis, vyksta rūgšties katalizuojamas hidrolizinis skaidymo procesas [24]. Alginato tirpumas ir cheminių grupių reaktyvumas taip pat svarbūs parametrai, į kuriuos reikia atsižvelgti atliekant modifikacijos procesą. Reaktyvumo pokyčiai tarp funkcinų grupių yra vienas iš privalumų siekiant pakeisti tam tikras savybes. Taip pat svarbu pasirinkti tinkamą tirpiklį, kuris nekeistų alginato savybių.

Alginatų savybės modifikuojamos cheminėmis reakcijomis veikiant hidroksilo (-OH) grupes C2 ir C3 padėtyse arba karboksilo (-COOH) grupę C6 padėtyje. Modifikavimas gali būti atliekamas įvairiais metodais, tokiais kaip alginato paviršiaus padengimas nanosferomis, kurios gaminamos iš dirbtinių, biologiškai suderintų polimerų, gulurono ir manurono liekanų santykio keitimas, kryžminiai ryšiai su fizikiniais ir cheminiais reagentais, cheminės reakcijos (esterifikavimas, acetilinimas, fosforilinimas, oksidacija ir redukcija) [25].

Alginato modifikavimas chemiškai veikiant deprotonuotą karboksilo grupę galimas naudojant karbodiimidus, sudarant kryžminius ryšius su kitais junginiais, atliekant esterifikavimo bei kitas reakcijas. Karbodiimidai, dažniausiai EDC ir NHS, plačiai naudojami karboksilato grupę paversti į esterio ir amido darinius. Šiuo metodu modifikuoti alginatai naudojami kaip bioadhezyvai, minkštesniems audiniams sujungti. Alginatus apdorojant alkoholiais vyksta esterifikavimo reakcija, kuri naudojama norint alkilo grupę prijungti prie karboksilo grupės. Tokiu būdu padidėja modifikuoto alginato hidrofobinės savybės [26].

Hidroksilo grupę modifikuojama acetilinimo, esterifikavimo, fosforilinimo, oksidacijos ir redukcijos reakcijomis. Acetilintas alginatas atlieka pagrindinį biologinį vaidmenį bakterijose. Didėjant acetilinimo laipsniui alginatai pasižymi didesniu gelio brinkimu ir mažėjančia klampa. Didžiausias acetilinimo laipsnis buvo pasiektas, kai tetrabutilamonio alginatas buvo acetilinamas organiniame tirpiklyje. Taip pat viena iš dažniausiai naudojamų reakcijų alginatui modifikuoti yra oksidacija. Oksiduoti hidroksilo grupei naudojamas natrio perjodatas, dėl kurio kiekviename monomere susidaro po dvi aldehidines grupes. Oksiduotas alginatas pasižymi dideliu reaktyvumu ir didesniu suirimo laipsniu, todėl toks alginatas dažnai naudojamas kaip pagalbinė medžiaga kontroliuojamam vaistų tiekime [26].

1.6. Alginatų biologinis aktyvumas

Alginatai ir jų dariniai pasižymi įvairiomis biologinio aktyvumo savybėmis. Naujausiais farmakologiniais tyrimais buvo nustatyta, kad alginatams būdingas antimikrobinis ir antioksidacinis aktyvumas, antivėžinės, antidiabetinės, antianafilaksinės, imunoreguliacinės bei hiperglikeminės savybės. Dėl didelio bioaktyvumo ir mažos molekulinės masės vis daugiau dėmesio skiriama alginatų skilimo produktams – oligosacharidams. Be jau minėtų savybių, alginatų oligosacharidai pasižymi neuroprotekciškumu, hipolipidemiškumu, ląstelių dauginimosi skatinimu bei augalų augimo reguliavimu [27].

1.6.1. Antioksidacinis aktyvumas

Nors reaktyviosios deguonies formos yra metabolizmo produktai, dalyvaujantys įvairiose biologinėse reakcijose, tačiau per didelis šių junginių kiekis sukelia ląstelių oksidacinį stresą, kuris neigiamai veikia baltymus, lipidus, lipoproteinus bei yra viena iš pagrindinių priežasčių, lemiančių lėtinių ligų atsiradimą. Reaktyvių deguonies formų susidarymas slopinamas sintetiniais antioksidantais, tačiau dėl jų sukiamų šalutinių poveikių išaugo natūralių medžiagų, apsaugančių ląsteles nuo oksidacinio streso, poreikis. Yra žinoma, kad alginatai pasižymi antioksidaciniu aktyvumu, kuris susijęs su jų gebėjimu redukuoti metalų kompleksus. Antioksidacinėms savybėms įtakos turi koncentracija, molekulinė masė bei depolimerizacijos procesas. Alginato oligosacharidai, kurių molekulinė masė mažesnė nei 1 kDa turi didesnę antioksidacinį aktyvumą prieš laisvuosius radikalus, nei alginatai, kurių molekulinė masė yra tarp 1–10 kDa. Rūgštinės hidrolizės būdu gaunamo alginato oligosacharido antioksidacinis aktyvumas yra panašus į polimerinio alginato, kai tuo tarpu oligosacharidas, susidaręs fermentinės hidrolizės metu pasižymi didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu. Remiantis moksliniais tyrimais buvo nustatyta, kad alginatų oligosacharidai didina atsparumą oksidacinio streso sukeliams ligoms. Pavyzdžiui, atliktas tyrimas su pelėmis parodė, kad fermentinės hidrolizės būdu gautas alginato oligosacharidas slopino miokardo išemijos pažeidimus, atsirandančius dėl ląstelių oksidacinės pažeidos. Kito tyrimo, su artritu sergančiomis žiurkėmis, rezultatai parodė, kad alginato rūgštis padidina antioksidacinių fermentų aktyvumą bei sulėtina lipidų peroksidaciją. Alginatų oligosacharidai kaip antioksidantai įeina ir į, kai kurių gyvūnų pašarų sudėtį [27, 28].

Siekiant padidinti alginatinių medžiagų antioksidacinį aktyvumą atliekami tyrimai derinant alginatą su skirtingomis medžiagomis. Vieno tyrimo metu buvo nustatyta, kad iš alginato ir lignino derinio pagamintos biomedžiagos, pavyzdžiui bioplėvelės, pasižymėjo dideliu antioksidaciniu poveikiu. Alginato ir lignino kompozitų antioksidacinių savybių tyrimų metu, naudojant DPPH, bendro antioksidacinio ir redukcinių savybių metodus, nustatyta, kad šis kompozitas turėjo didesnes antioksidacines savybes, lyginant su alginatu išskirtu iš *Sargassum duplicatum* ir *Sargassum polycystum* dumblių. Natrio alginato, išskirto iš dumblių, bendras antioksidacinis aktyvumas buvo 188,54 mg askorbo rūgšties ekvivalento/g sausos masės, o alginato ir lignino kompozito – 218,73 ± 10,45 mg askorbo rūgšties ekvivalento/g sausos masės. Dėl šių tyrimų rezultatų, lengvo ir pigaus sintezės proceso alginato ir lignino derinio biomedžiagos ateityje galėtų būti pritaikomos naudoti pramoniniams tikslams [29].

1.6.2. Antibakterinis aktyvumas

Didėjantis bakterijų atsparumas antibiotikams – problema, su kuria vis dažniau susiduriama infekcinėms ligoms gydyti. Nustatyta, jog bakterijos atsparumą antibiotikams įgyja dėl jų fiziologinių

pasikeitimų, susiformuojant bioplėvelės matricai, sudarytai iš ekstraląstelių medžiagų. Manoma, kad antibiotikus inaktyvuoja bioplėvelėje besikaupiantys, antibiotines medžiagas skaidantys fermentai. Vienas iš galimų būdų spręsti šiai problemai yra adjuvantinio gydymo taikymas. Tai kombinuotas gydymas, apimantis antibiotiko naudojimą kartu su adjuvantu, kuris padidina antibiotikų veiksmingumą ir slopina bakterijų atsparumą. Pagal skirtingus tyrimus nustatyta, kad alginatų oligosacharidai pasižymi antibakteriniu poveikiu prieš tokias gramneigiamas bakterijas kaip *Pseudomonas aeruginosa* bei *Acinetobacter baumannii* ir yra tinkami naudoti kartu su antibiotinėmis medžiagomis. Alginatai veikia bakteriostatiškai, skaido susidariusias bakterijų bioplėveles bei slopina jų susidarymą. Vieno tyrimo metu buvo siekiama iširti alginatų oligosacharidų poveikį prieš gramteigiamas bakterijas – *S. aureus* ir B grupės streptokokus (*Streptococcus agalactiae*). Antibakteriniais tyrimais buvo nustatyta, kad alginato oligosacharidas, esant ir mažoms koncentracijoms (1 %), sukėlė stiprų slopinamąjį poveikį prieš abi šias bakterijas. Taip pat nustatyta, kad alginato oligosacharidas paveikė ir šių bakterijų bioplėvelių susidarymo mechanizmą. Manoma, kad antibakterinį poveikį prieš bakterijas lemia alginatų anijoninė prigimtis. Dėl neigiamai įkrauto alginato sąveikos su teigiamai įkrautais bioplėvelės matricos komponentais sutrinka bakterijų intramolekulinės sąveikos su ekstraląstelinėmis medžiagomis. Tiriant antibiotikų derinius su alginato oligosacharidu perspektyviausi rezultatai gauti su trimetoprimu, kuomet alginatas ženkliai padidino B grupės streptokoko jautrumą šiam antibiotikui [30].

Alginatų poveikis prieš bakterijas gali būti sustiprinamas gaminant alginato derinius su kitomis, antibakterinėmis savybėmis pasižyminčiomis medžiagomis, tokiomis kaip vario, sidabro, cinko ar anglies nanomedžiagomis. Pavyzdžiui, cinko oksido nanodalelių ir alginato derinys pasižymi ypač dideliu efektyvumu tiek prieš gramteigiamas, tiek prieš gramneigiamas bakterijas. Efektyvumas prieš gramneigiamas bakterijas (pvz. *Escherichia coli*) siekia 100 %, o prieš gramteigiamas (*Staphylococcus aureus*) – 99 %. Dėl tokio didelio efektyvumo prieš bakterijas buvo pradėti gaminti antibakterinėmis savybėmis pasižymintys celiuliozės pluoštai, į kurių paviršių, naudojant natrio alginatą, impregnuotos cinko oksido nanodalelės. Taip pat biomedicinoje iš cinko oksido ir alginato hidrogelio gaminami porėti tvarsčiai, skirti žaizdoms gydyti.

Įvairios antibakterinės medžiagos gali būti gaminamos naudojant ir į alginato matricą įkapsuliuotas vario nanodaleles. Tokie nanokompozitai, pagaminti iš alginato, polipropileno ir vario oksidų nanodalelių bei alginato hidrogeliai su įterptomis vario dalelėmis pasižymi daug stipresnėmis antibakterinėmis savybėmis, lyginant su grynu alginatu. Metalų koncentracijos alginato hidrogeliuose turi būti griežtai reguliuojamos, dėl galimo citotoksiškumo bei oksidacinio streso sukėlimo [31].

1.7. Fermentacijos sąlygų įtaka alginato gamybai iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų

Fermentacijos sąlygos, tokios kaip deguonies kiekis, temperatūra, inokulianto dydis, pH bei terpės komponentai yra pagrindiniai veiksniai, nulemiantys stabilius bakterinių ląstelių augimo ir medžiagų apykaitos procesus. Biopolimero alginato iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų gamybos efektyvumui padidinti yra siekiama optimizuoti fermentacijos procesą ir tam tikslui yra atliekami įvairūs moksliniai tyrimai, kad nustatyti optimaliausias fermentacijos sąlygas bei produkcijos terpės komponentų koncentracijas.

Deguonies kiekio reguliavimas fermentacijos proceso metu yra reikšmingas bakterinių ląstelių augimui, nes *Azotobacter* genties bakterijos yra aerobiniai mikroorganizmai, gyvybiniam procesams naudojantys deguonį. Tyrimais nustatyta, kad tinkamai suregulius deguonies tiekimo sąlygas,

galima pagerinti bakterinių ląstelių augimo bei alginato sintezės efektyvumą. Kontroliuojant deguonies perdavimo greitį gaunamas didesnis alginato kiekis eksponentinėje ir stacionarioje ląstelių augimo stadijose, lyginant su nekontroliuojamomis deguonies sąlygomis Mikroaerofilinėmis sąlygomis, kai deguonies perdavimo greitis arti nulio, galima gauti vidutinio klampumo ir molekulinės masės alginatą, tačiau mažais kiekiais. Deguonies perdavimo greičiui esant 3,6 – 12,4 mmol l⁻¹ h⁻¹ padidėja bakterinių ląstelių augimo greitis, o tuo pačiu ir sintetinio alginato kiekis. Gaunami alginatai yra mažesnės molekulinės masės ir didesnio klampumo [32].

Kito tyrimo metu buvo tiriama temperatūra, inokuliacijos pH, azoto ir anglies šaltinių įtaka alginato išėigai. Nustatyta, kad didžiausias alginato kiekis (4,6 g/l) gautas, kai inokuliacijos koncentracija buvo 6 % (tirtos 2, 4, 6, 8 ir 10 % koncentracijos), o terpės pH 7. Taip pat nustatyta, kad maksimali pH vertė, kuomet bakterijos vis dar sintetina alginatą, nors ir mažais kiekiais, yra 8. Fermentacijos inkubacijos temperatūros įtaka tirta 25 – 50 °C ribose. Optimali temperatūra, kuomet bakterijos sintetino didžiausią alginato kiekį, buvo 30 °C. Kolbos maišymo greitis taip pat turėjo įtakos alginato gamybai. Esant 200 aps/min greičiui buvo gauta 5,21 g/l alginato ir šis greitis, pagal kitus tyrimus, laikomas efektyviausiu.

Nustatyta mitybinėje terpėje esančių druskų ir jų koncentracijų įtaka parodė, kad natrio ir fosfato jonai mažina alginato susidarymą, o geriausi rezultatai gauti, naudojant 0,4 g/l koncentracijos MgSO₄×7H₂O ir 0,05 g/l CaCl₂. Azoto šaltiniai, kuriuos pridėjus į terpę buvo gauti dideli alginato kiekiai – peptonas ir mielių ekstraktas. Šio tyrimo metu tirtas žemės ūkio atliekų (kviečių sėlenų, melasos) kaip anglies šaltinių naudojimas alginatui pagaminti. Fermentacija atlikus vienodomis sąlygomis gauta, kad naudojant melasą kaip anglies šaltinį alginato buvo gauta 2,8 g/l, o kviečių sėlenas – 4,23 g/l [33].

1.8. Įvairių anglies šaltinių įtaka alginato gamybai

Anglies šaltinis yra vienas iš pagrindinių mitybinės terpės komponentų, įtakojančių bakterinių ląstelių biomasės augimą ir sintetinio produkto kiekį. Alginato gamybai iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų dažniausiai naudojami anglies šaltiniai yra angliavandeniai, tokie kaip gliukozė, fruktozė, sacharozė, laktozė ar maltozė. Tyrimais nustatyta, kad iš angliavandenių, gliukozė efektyviausiai veikia ląstelių biomasės augimą, o sacharozė – alginato sintezę. Alkoholai taip pat gali būti naudojami kaip anglies šaltiniai. Dažniausiai tiriama cukraus alkoholių, tokių kaip D-manitolio, D-sorbitolio, eritritolio ar ksilitolio poveikis alginato sintezei [34]. Vieno tyrimo metu buvo tirtas įvairių koncentracijų gliukozės, sacharozės, arabinozės, manitolio, fruktozės, ksilozės ir inozitolio kaip anglies šaltinių poveikis alginato sintezei. Yra žinoma, kad ne tik anglies šaltinis, bet ir jo koncentracija mitybinėje terpėje turi įtakos bakterinių ląstelių augimui. Tyrimo duomenimis nustatyta, kad geriausiais rezultatais pasižymėjo manitolis, gliukozė, sacharozė ir laktozė. Iš visų tirtų koncentracijų (1,5 – 4%) 4% manitolis pirmąsias tris fermentacijos dienas turėjo didžiausios įtakos *Azotobacter vinelandii* bakterijų biomasės augimui (5,6 g/l), vėliau, dėl galimo ląstelių lizės proceso, biomasė sumažėjo. Naudojant anglies šaltiniu laktozė geriausi rezultatai gauti taip pat trečiąją dieną, kai naudota koncentracija buvo 2%. Sacharozė (2 – 4%) bakterinių ląstelių biomasę padidino iki 12 g/l. Didžiausias ląstelių biomasės padidėjimas (14 g/l) gautas naudojant 4% koncentracijos gliukozę [35].

Nors tradiciniai angliavandeniai, tokie kaip gliukozė ar sacharozė yra dažniausiai naudojami anglies šaltiniai alginato gamyboje, tačiau gryną angliavandenių naudojimas yra vienas iš pagrindinių veiksnių, ribojančių alginato sintezę iš bakterijų pramoniniu mastu. Kaip potenciali alternatyva

tradiciniams anglies šaltiniams gali būti pigių ir gausių žemės ūkio ar maisto atliekų panaudojimas. Įvairios žemės ūkio ir maisto perdirbimo pramonės atliekos, tokios kaip vaisių ir daržovių žievelės, sėklos, bulvių lupenos, pieno išrūgos ar cukraus gamybos šalutiniai produktai yra išmetamos į sąvartynus, kur pūdamos prisideda prie aplinkos taršos. Įvairūs mokslinių tyrimų rezultatai rodo, kad tokių atliekų panaudojimas gali būti naudingas įvairių produktų, tarp jų ir alginato, gamybai. Vieno tyrimo metu buvo nustatinėjamas obuolių žievelių (lot. *Malus domestica*) kaip anglies šaltinio panaudojimo potencialas *Azotobacter vinelandii* bakterijų biomasės augimui ir alginato gamybai. Iš obuolių gaminamų sulčių proceso metu susidaro dideli kiekiai žievelių ir išspaudų kaip šalutinių produktų. Nustatyta, kad obuolių žievelėse gausu cukrų (59,96 %), kuriuos bakterijos naudoja produkto sintezei. Alginato gamyba naudojant obuolių žievelės buvo atliekama kietojo būvio fermentacijos būdu įvertinant ir proceso sąlygų įtaką. Pagal tyrimo duomenis, gauto alginato koncentracija siekė 180,64 mg/grame sauso substrato, o grynumas – 97 %. Šis rezultatas pasiektas antrąją inkubacijos dieną optimizuotomis fermentacijos proceso sąlygomis, kai temperatūra buvo 37,5 °C, pH 7, o inokuliuoto tūris – 3 ml. Gautas didelis alginato grynumas bei išėiga įrodo, kad obuolių bei kitų vaisių žievelės, kaip antrinės žaliavos gali būti tinkama alternatyva tradiciniams anglies šaltiniams pakeisti [36].

Cukraus gamybos pramonės šalutiniai produktai, tokie kaip melasa ar cukranendrių sultys taip pat gali būti potencialūs ir pigūs substratai naudojami alginato gamyboje. Melasą sudaro apie 50 % cukrų, tarp kurių daugiausiai gliukozė, sacharozė ir fruktozė. Tiek melasoje, tiek cukranendrių sultyse esantys mikroelementai ir vitaminai skatina alginato gamybą, todėl lyginant su gryna sacharozė, gaunami geresni rezultatai produkto sintezėje. Taip pat, palyginus su maltoze, bakterijos melasą sunaudoja greičiau, o tai prisideda prie didesnio bakterijų biomasės susidarymo ir gaunamo alginato kiekio. Tyrimais nustatyta, kad anglies šaltiniu naudojant melasą gaunama alginato koncentracija buvo 4,67 g/l, o cukranendrių sultis – 7,29 g/l [35, 37].

Laktozė – tai dar vienas angliavandenis, kurį *Azotobacter vinelandii* bakterijos naudoja kaip anglies šaltinį alginato gamyboje. Pieno pramonėje sūrio ir kazeino gamybos metu susidaro dideli kiekiai išrūgų, kuriose gausu laktozės (78 %). Išrūgų sunaudojimas siekia tik 50 %, o likusi jų dalis kaip atliekos išleidžiamos į nuotekas. Nustatyta, kad šios atliekos taip pat gali būti vertingos kaip anglies šaltiniai bakterijoms, turinčioms pakankamai laktozę hidrolizuojančių fermentų β-galaktozidazių. Kadangi *Azotobacter vinelandii* bakterijos gali naudoti tik hidrolizuotas išrūgas, buvo tiriamas kitų *Azotobacter* grupės bakterijų gebėjimas sintetinti alginatą, naudojant pieno išrūgas. Tyrimai parodė, kad *Azotobacter chroococcum*, naudojant 4 % laktozę kaip anglies šaltinį, pagamino 0,983 g/l alginato [38].

Mokslininkai nustatė, kad glicerolis, kuris susidaro biodyzelino gamybos metu kaip šalutinis produktas gali būti alternatyvus anglies šaltinis, naudojamas alginato gamyboje. *Azotobacter vinelandii* bakterijos geba asimiliuoti iš anksto neapdorotą, gryną glicerolį, todėl tokia alginato gamybos technologija nereikalauja didelių išlaidų. Tyrimo rezultatai parodė didelį *A. vinelandii* bakterijų ląstelių skaičiaus padidėjimą esant optimalioms sąlygoms, sunaudojant didžiąją dalį glicerolio per 48 valandas. Pagaminto alginato koncentracija, naudojant glicerolį kaip anglies šaltinį, siekė 44 µg/ml [39].

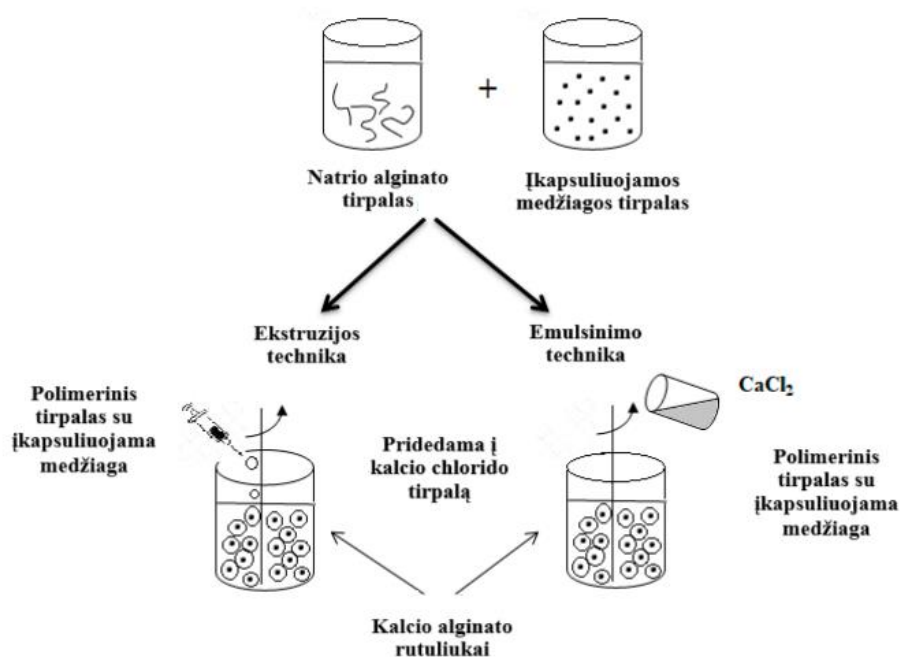
1.9. Alginatų kapsuliavimo technikos

Alginatų mikrodalėlės naudojamos kaip nešikliai hidrofilinėms medžiagoms įkapsuliuoti. Alginato ir įkapsuliuotos medžiagos sistemos yra plačiai naudojamos įvairiose pramonės šakose veikliesiems junginiams apsaugoti nuo aplinkos poveikio ir prailginti produktų galiojimo laiką. Pagrindiniai naudojami alginatų kapsuliavimo metodai yra purkštuvinis džiovinimas, ekstruzija ir emulsinimas.

Purkštuvinio džiovinimo metu tirpalas su veikliąja medžiaga (pvz. insulinu, angliavandeniliais) sumaišomas su ištirpusia polimerine matrica, yra suslegiamas ir išpurškiamas į džiovinimo kamerą. Į kamerą taip pat tiekiamos karšto oro ar azoto dujos, kad išgarinti tirpiklį. Gautos kapsulės regeneruojamos cikloniniame separatoriuje. Proceso metu itin svarbus produkto padavimo, temperatūros ir dujų srauto kontroliavimas. Pagrindinis metodo trūkumas, kad negalima įkapsuliuoti aukštai temperatūrai ir slėgiui jautrių medžiagų.

Ekstruzijos metodas apima hidrokoloidinio natrio alginato tirpalo sumaišymą su kapsuliavimo medžiaga. Gauta suspensija, naudojant švirkštą arba ekstruderį, sulašinama į kietiklio (kalcio chlorido) tirpalą. Tirpale susidaro maži natrio alginato karoliukai su įkapsuliuota medžiaga. Gautų karoliukų dydis ir forma priklauso nuo adatos skersmens ir jos atstumo tarp tirpalo. Dėl lėto mikrodalelių susidarymo šis metodas daugiausiai naudojamas laboratoriniu mastu.

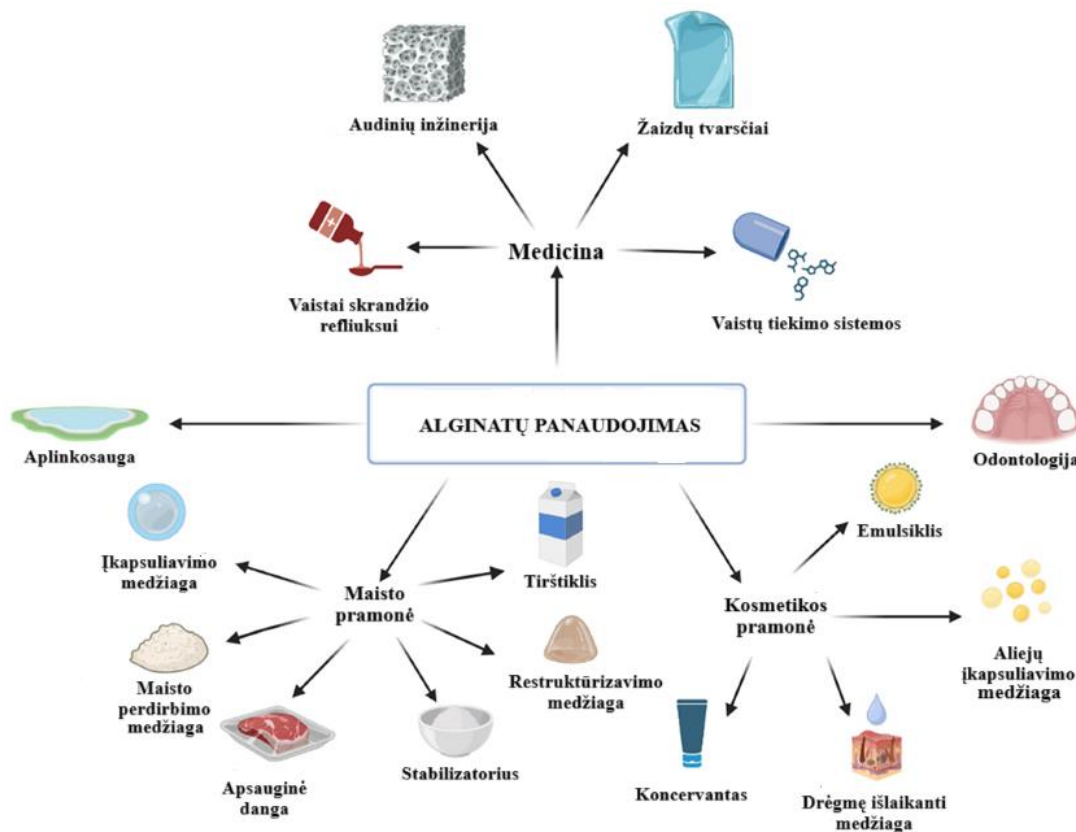
Alternatyva ekstruzijos metodui yra emulsinimas. Jo metu polimerinės matricos ir kapsuliuojamos medžiagos mišinys pridedamas prie didelio tūrio aliejinės medžiagos, taip pat fazės stabilizavimui įpilama emulsiklio. Gauta emulsija nuolat maišoma, nes tai turi įtakos susidarančių kapsulių dydžiui ir formai. Kapsulės, kurių skersmens dydis 1000 μm ir daugiau, pasižymi stambia tekstūra, kuri galutiniame produkte turi įtakos kapsulių dispersijos kokybei. Emulsija suskaidoma į tirpalą pridedant kalcio chlorido ir centrifuguojant, kad atskirti aliejaus ir vandens fazes. Emulsinimo metodas yra brangesnis nei ekstruzijos, nes reikalingi dideli kiekiai aliejinės fazės [40].



1.4 pav. Ekstruzijos ir emulsinimo metodų schema [40]

1.10. Alginatų panaudojimas

Alginatų panaudojimo galimybės įvairiose pramonės šakose nuolat auga, ypač dėl jų biologinių savybių bei gebėjimo sudaryti gelius. Šiuo metu komercinio alginato pagaminama apie 300 000 tonų per metus ir manoma, kad ateityje šio polimero poreikis toliau tik didės [41]. Pirmiausiai alginatai buvo pradėti naudoti maisto pramonėje kaip emulsikliai, tirštikliai, stabilizatoriai ar klampumo reguliatoriai, taip pat vaisių ir daržovių apsaugai nuo mikroorganizmų. Nustatytos įvairios alginatų savybės, tokios kaip netoksiškumas, biologinis suderinamumas ir skaidumas, lėmė jų panaudojimą ir kitose pramonės šakose. Šiuo metu alginatai plačiai naudojami biomedicinoje, farmacijoje, kosmetikos ir popieriaus pramonėje, vandenvalo procesuose ir genų inžinerijoje [42].



1.5 pav. Alginatų panaudojimo sritys [43]

1.10.1. Alginatų taikymas biomedicinoje

Medicinos srityje alginatai kaip biomedžiagos naudojami kontroliuojamiems vaistams ir baltymams tiekti, ląstelių terapijoje, trimačiams audiniams ir žaizdų tvarsčiams kurti, probiotikams įkapsuliuoti ir kitoms reikmėms. Alginatų poveikis ir saugumas buvo nustatytas *in vivo* tyrimais prieš tokias ligas, kaip osteoporozė, diabetas, navikai ar atopinis dermatitas. Biomedicinoje itin naudojami alginatų hidrogeliai, nes struktūriškai šio polimero sudaromi geliai yra panašūs į tarpląstelių audinių matricas.

Paprastai įvairioms žaizdoms gydyti alginatai naudojami mikrogelių, aerogelių, hidrogelių ir tvarsčių pavidalu. Žaizdoms gydyti ir apsaugoti nuo infekcijų skirtos medžiagos turi atitikti keliamus reikalavimus: pasižymėti antimikrobiniu poveikiu, netoksiškumu, mechaniniu stiprumu, biologiniu suderinamumu. Alginatai atitinka daugelį reikalavimų ir kartu su divalenciais jonais ir

antibakterinėmis medžiagomis yra naudojami tvarsčių gamyboje. Žaizdos išskiriamuose skysčiuose natrio alginato jonams sąveikaujant su kalcio jonais tvarsčio medžiaga įgauna gelio pavidalą, kuris drėkina žaizdą ir pagerina jos gijimo procesą. Taip pat alginato antibakterinis aktyvumas padeda aktyvuoti protrombiną aktyvavimo ir pagerinti hemostazę. Alginatai, esant 25 °C temperatūroje geba sudaryti hidrogelius, kurių pagrindu pagaminti tvarsčiai sukuria hidratacijos aplinką žaizdoms gyti.. Tokie tvarsčiai yra itin svarbūs žaizdoms gydyti, o siekiant pagerinti jų drėkinančias savybes, kartu su alginatu naudojamos natūralios medžiagos, pavyzdžiui, *Aloe vera* [44].

Alginatai ir jų pagrindu pagamintos medžiagos audinių inžinerijoje naudojamos randams ir kremzlėms gydyti, kaulų regeneracijai, ląstelių tiekimui, kepenų ir akių audiniams kurti. Alginatų biologinis suderinamumas ir netoksiškumas leidžia juos naudoti kaulų persodinimui, kur biopolimerinė medžiaga kaip karkasas palaiko ląstelių augimą bei diferenciaciją, skatinančią kaulinio audinio regeneraciją. Iš dumblių gaminamas alginatas pasižymi silpnomis ir nekontroliuojamomis mechaninėmis savybėmis dėl nepastovaus M ir G blokų kiekio sudėtyje, todėl yra sudėtinga alginatą naudoti audinių inžinerijoje. Siekiant padidinti alginatų naudojimo galimybes yra kuriami kompozitai su kitomis medžiagomis, padidinančiomis mechaninį stiprumą ar kitas savybes [45]. Biospausdinimas yra vienas iš audinių inžinerijos metodų, taikomų tikslioms ląstelėms, audiniams, matricoms atkurti ir biokomponentams įterpti pagal iš anksto kompiuterio sukurtą modelį. Biorašalu naudojamos polimerinės medžiagos, pavyzdžiui, alginato hidrogeliai. Tyrimais nustatyta, kad sumaišius alginatą su nanoceliulioze, kolagenu ir polilaktidu gaunamos patvaresnės ir standesnės spausdinamos konstrukcijos [46].

Alginatai naudojami vaistų tiekimo sistemose antibiotiniams, priešuždegiminiams, diabetiniams, chemoterapiniams vaistams bei maistinėms ir antimikrobinėms medžiagoms imobilizuoti. Alginato matricoje įkapsuliuotos vaistinės ir baltyminės medžiagos gali būti tiekiamos per plaučius, burną, veną ir odą. Buvo nustatyta, kad medžiagų imobilizavimui naudojant alginatus, efektyviai prailginamas vaistų veikimo poveikis, sustiprinamas organizmo imuninis atsakas, užtikrinamas didesnis imunogeninis veiksmingumas ir biomedžiagų prieinamumas [47].

1.10.2. Augalų ekstraktų įkapsuliuojimas naudojant natrio alginato kapsules

Medicininiai augalai sintetina antrinius metabolitus, pasižyminčius teigiamu poveikiu žmonių sveikatai. Iš augalų išskirti bioaktyvūs junginiai gali būti panaudojami įvairioms ligoms gydyti kaip antibakterinės, priešuždegiminės, antivėžinės ar antioksidacinės medžiagos. Dauguma augalų ekstraktuose esantys aktyvieji junginiai yra hidrofobiniai, todėl sunkiai tirpsta citoplazminėje membranoje, o tai gali sumažinti jų farmakologinį poveikį. Šiuo metu taikomas augalų ekstraktų ir jų junginių įkapsuliuojimas yra nauja strategija farmakologiniam poveikiui pagerinti bei naudingoms savybėms išsaugoti. Imobilizavus augalų ekstraktus sumažinamas nemalonus skonis ir kvapas bei kontroliuojamas junginių išsiskyrimas. Augalų ekstraktams įkapsuliuoti naudojamos biomedžiagos yra baltymai ir polisacharidai. Natrio alginatas yra viena dažniausiai naudojamų kapsuliuojimo matricų, į kurią kryžminiais ryšiais, esant divalenčiams jonams, įterpiami antriniai metabolitai. Sudaryta struktūra padeda palaikyti rūgštinę skrandžio terpę ir kontroliuoti vaistinių medžiagų atpalaidavimą, kad būtų prailgintas jų poveikis [48]. Vieno tyrimo metu buvo tirtas skirtingų koncentracijų jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) ekstraktų įkapsuliuojimo į alginato plėvelės poveikis antibakteriniam ir antioksidaciniam aktyvumui. Farmakologinių savybių gausa pasižyminti jonažolė medicinoje ypač vertinama dėl antibakterinio poveikio prieš bakterijas, antioksidacinio aktyvumo ir gydomojo poveikio. Alginato su įterptu jonažolės ekstraktu plėvelės turi didelį potencialą

žaizdoms gydyti, todėl svarbu nustatyti tinkamas šio ekstrakto koncentracijas, galinčias padidinti pritaikymo galimybes medicinoje. Pagal tyrimų rezultatus buvo nustatyta, kad *H. perforatum* ekstrakto įterpimas į alginato plėvelę ženkliai pagerino antioksidacines savybes. Taip pat nustatyta, kad didesnės ekstrakto koncentracijos lėmė didesnę aktyvumą. Alginato plėvelės antioksidacinis aktyvumas pagal troloksą siekė 260,8 μM , o pridėjus 0,25 % ir 0,5 % koncentracijų jonažolės ekstraktus aktyvumas padidėjo atitinkamai iki 517,4 μM ir 513,4 μM . Didžiausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo alginato plėvelė su 1 % ekstrakto koncentracija – 738,4 μM . Antibakterinio aktyvumo tyrimų rezultatai parodė, kad visos tirtos plėvelės, tiek su jonažolės ekstraktu, tiek be jo, pasižymėjo veiksmingumu prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas. Plėvelės su 0,25 % ir 0,5 % ekstrakto koncentracijomis turėjo didesnę poveikį prieš *S. aureus* ir *E. coli* bakterijas nei gryno alginato plėvelė. Jonažolės ekstrakto (1 %) pridėjimas į alginato plėvelę šio tyrimo metu neparodė didelio antibakterinio poveikio prieš gramneigiamas *E. coli* bakterijas. Kiti moksliniai šaltiniai patvirtino, kad jonažolės ekstraktai pasižymi mažesniu antibakteriniu poveikiu prieš gramneigiamas bakterijas, turinčias dalinai nepralaidžią išorinę membraną. Įbrėžimų gydymo testas, naudojant alginato plėveles su mažesnėmis nei 1 % koncentracijų jonažolės ekstraktais, taip pat parodė geresnį veiksmingumą, lyginant tik su alginato plėvele [49].

1.10.3. Alginatai maisto pramonėje

Biologiškai skaidus ir saugus vartoti polisacharidas alginatas maisto pramonėje naudojamas naujo tipo maistinių plėvelių gamybai. Valgomosios plėvelės skirtos apsaugoti maisto produktus nuo mikroorganizmų poveikio ir savybių praradimo. Alginato pagrindu pagamintos plėvelės ne tik išsaugo produktų savybes, bet ir prailgina jų galiojimo laiką. Kalcio alginato plėvelės naudojamos apsaugoti žuvų produktus nuo aliejų oksidacijos, suteikiančios kartų skonį. Taip pat, plėvelės naudojamos ir mėsos kokybei pagerinti bei apsaugoti nuo bakterijų. Polisacharidinės plėvelės nors yra atsparios riebalams ir aliejams, tačiau dėl hidrofiliškumo tirpsta vandenyje. Alginatai maišomi su kitais biopolimerais mechaninėms, antibakterinėms ir antioksidacinėms savybėms pagerinti. Pavyzdžiui, alginato ir želatinos plėvelės su įterptu raudonėlio eteriniu aliejumi efektyviai sumažino *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae* ir pieno rūgšties bakterijų augimą ant maisto produktų. Alginato plėvelių tirpumo vandenyje sumažėjimas ir terminio stabilumo padidėjimas pasiekiamas į plėveles pridėjus kalcio chlorido. Plėveles gaminant kartu su citrinžolių ekstraktu ir gliceroliu padidėja antimikrobinis aktyvumas prieš *E. coli* bakterijas, o sidabro nanodalelės padidina jų mechaninį stiprumą [50].

Maisto pramonėje alginatai dažnai naudojami kaip priedai, pagerinantys skonį ir išvaizdą įvairių produktų gamyboje dėl tirštinančių, stabilizuojančių ir gelio sudarymo savybių. Kaip tirštiklis alginatas naudojamas uogienių, džemų, marmeladų ir padažų gamyboje bei jų organoleptinių savybių pagerinimui. Gebėdamas formuoti gelio struktūrą biopolimeras užtikrina stabilumą bei reikiamą klampumą ledų ir kremų gamybos procesuose. Propilenglikolio alginatas dažnai naudojamas gėrimų pramonėje, nes pasižymi lipofiliškumu ir emulsijos stabilumu. PGA sulčių ir jogurto gamyboje naudojamas stabilizuoti ir pagerinti tekstūrą, nesukeliant jokių šalutinių poveikių. Nustatyta, kad alginatas gali sumažinti gliukozės absorbcijos greitį todėl yra naudojamas kaip priedas dietiniame maiste, skirtame sergantiems cukriniu diabetu. Kaip ir kiti dumblių polisacharidai, alginatas, įdėtas į maistą, kuriame daug cholesterolio ir riebalų, efektyviai sumažina bendrą cholesterolio kiekį [51].

1.10.4. Kitos alginatų panaudojimo sritys

Kosmetikos pramonėje natrio alginatas naudojamas kaip odą drėkinanti, nedirginanti ir netoksiška medžiaga įvairiems kremams ir veido kaukėms gaminti. Alginatų mikrosferinės dalelės naudojamos šveičiamuosiuose kremuose kaip abrazyvinės medžiagos, skirtos negyvoms odos dalelėms pašalinti. Dėl gebėjimo išlaikyti tekstūrą ir spalvą, tirštinančių bei drėgmę sulaikančių savybių alginatai ir jų hidrogeliai įeina į losjonų, antiperspirantų ir dekoratyvinės kosmetikos sudėtį. Iš alginato ir pektino gaminamos kapsulės, skirtos plaukų vitaminams, mineralams ar kitiems junginiams talpinti, suteikti jiems estetiškumą bei prailginti galiojimo laiką [52].

Vandens ir nuotekų valymo procesuose alginatai naudojami kaip adsorbentai sunkiųjų metalų ir įvairių teršalų, tokių kaip dažai ar antibiotikai, pašalinimui. Adsorbcinis gebėjimas pasireiškia dėl jonų mainų reakcijos metu funkciškai aktyvių karboksilo ir hidroksilo grupių alginatų struktūroje sąveikos su sunkiaisiais metalais (Pb^{2+} ir Cd^{2+}) ir kitais teršalais. Tyrimais buvo nustatyta, kad alginato pagrindu pagaminti kompozitai gali būti efektyvūs adsorbciniai ir fotokataliziniai organinių teršalų pašalintojai, suskaidantys organines molekules į mažesnes daleles ir taip padidinantys vandens grynumą [53]. Žemės ūkio pramonėje alginatai dėl savo savybių ir nedidelės kainos yra perspektyvi polimerinė medžiaga vandenyje tirpiems dirvožemio preparatams gaminti. Alginatų pagrindu kuriami prailginto veikimo herbicidai bei pesticidai ir lėto veikimo trąšos yra veiksminga strategija siekiant sumažinti neigiamą cheminių medžiagų poveikį aplinkai ir dirvai [54]. Dar viena alginatų panaudojimo sritis – odontologija. Čia alginatai naudojami protezų gamyboje kaip dantų įspaudo forma dėl greito stingimo, ekonomiškumo ir hidrofiliškumo. Lyginant su elastomerinėmis dantų įspaudų formomis, alginatines lengviau naudoti, gaunami tikslesni įspaudai, jas lengviau nuimti bei pritaikyti prie dantų ir burnos formos [55].

1.11. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Įvairiais tyrimais nustatyta polimerinio alginato nauda ligoms gydyti, teršalams šalinti, maisto produktams gaminti, bioaktyviems junginiams įkapsuliuoti ir vaistams tiekti dėl gerų fizikinių, cheminių ir biologinių savybių gausos. Kadangi alginatai yra natūralios, netoksiškos ir biologiškai skaidžios medžiagos, tai manoma, kad jų pagrindu pagamintų medžiagų poreikis ateityje išliks didelis. Kaip teigiama literatūros šaltiniuose, kontroliuojamų savybių alginatų biosintezė iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų yra perspektyviausias metodas galintis pakeisti jų gamybą iš dumblių. Cheminėmis modifikacijomis, kontroliuojamomis fermentacijos sąlygomis bei tinkamai parinktu anglies, azoto šaltiniu galima pagerinti šio polisacharido gamybos procesą. Antrinių žaliavų, turinčių cukraus, panaudojimas kaip anglies šaltinių *Azotobacter vinelandii* bakterijoms augti bei alginatui pagaminti, gali ekonomiškai sumažinti gamybos sąnaudas ir padidinti gamybos proceso efektyvumą.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimų metu naudotų reagentų sąrašas

Tyrimams atlikti naudoti reagentai ir jų koncentracijos pateikiamos 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Cheminių reagentų sąrašas

Reagentas	Cheminė formulė	Koncentracija
Natrio chloridas	NaCl	20 %
Izopropanolis	C ₃ H ₈ O	95 %
Citratinis buferis	C ₆ H ₅ O ₇	0,1 M
Gliukozės tirpalas	C ₆ H ₁₂ O ₆	1 mg/ml
DNS reagentas	C ₇ H ₄ N ₂ O ₇	1 %
Metanolis	CH ₃ OH	80 % (konc.)
DPPH reagentas	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	0,06 M
Natrio fosfatinis buferis (pH 6,6)	Na ₂ HPO ₄	0,2 M
Kalio heksacianoferatas	K ₃ [Fe(CN) ₆]	1 %
Trichloracto rūgštis	C ₂ HCl ₃ O ₂	96 %
Geležies trichloridas	FeCl ₃	0,1
Acetato buferis (pH 3,6)	CH ₃ CO ₂ H	300 mM
TPTZ (ištirpintas 40 mmol/l HCl)	C ₁₈ H ₁₂ N ₆	10 mmol
Geležies trichlorido heksahidratas	FeCl ₃ x 6H ₂ O	20 mmol/l
Natrio šarmas	NaOH	0,1 N, 1N
Sieros rūgštis	H ₂ SO ₄	0,1 N, 1N

2.2. Laboratorinės įrangos sąrašas

Eksperimentams atlikti naudota laboratorinė įranga:

- „Vibra AJ“ svarstyklės;
- „Universal 320R“ centrifuga;
- „Binder BD23“ termostatas;
- „Memmert“ termostatinė vandens vonelė;
- „Biosan“ termostatinis kratytuvas;
- „Certoclav CV-EL“ autoklavas;
- „WinLab“ pH metras;
- „Shimadzu UV-1280“ spektrofotometras;
- „Biosan Bio Vortex VI“ mėgintuvėlių purtyklė;
- „Neolab D-6015“ Ependorff mėgintuvėlių centrifuga;
- „Heidoph MR HEI-TEC“ magnetinė maišyklė.

2.3. Produkcijos ir kultivavimo terpės sudėtis

Bakterijų kultivavimui naudotos terpės sudėtis ir komponentų koncentracijos pateiktos 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Bakterijų kultivavimo terpės sudėtis

Terpės komponentas	Koncentracija, g/l
Gliukozė	5
Manitolis	5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,005
NH ₄ NO ₃	1,5
KH ₂ PO ₄	0,1
K ₂ HPO ₄	0,9
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
CaCO ₃	5
Agaras	15
Terpės pH 7,3	

Mitybinės terpės, kurioje buvo vykdoma *Azotobacter vinelandii* bakterijų fermentacija bei alginato gamyba, sudėtis pateikta 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. Produkcijos terpės sudėtis

Terpės komponentas	Koncentracija, g/l
Anglies šaltinis	20
Mielių ekstraktas	6
MgSO ₄	0,3
Na ₂ HPO ₄	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6
Terpės pH 7,2	

Produkcijos terpė buvo ruošiama kūginėje 250 ml Erlenmejerio kolboje, kurioje nurodytomis 2.3 lentelėje koncentracijomis sumaišyti bakterijų augimui reikalingi komponentai. Mitybinei terpei paruošti naudotos medžiagos: anglies šaltinis (kiekviename tyrime skirtingas), azoto šaltinis (mielių ekstraktas), makroelementas (Na₂HPO₄), mikroelementas (MgSO₄), mineralas ((NH₄)₂SO₄), distiliuotas vanduo. Galutinis paruoštos terpės tūris 200 ml.

2.4. Terpės pH matavimas

Daugumos bakterijų augimui optimalus pH yra artimas neutraliam, todėl paruoštos mitybinės terpės pH buvo sureguliuotas iki 7,2. Fermentacijos metu, dažniausiai bakterijų augimo fazėje, pH gali kisti ir sutrikdyti bakterinių ląstelių augimo procesą ir produkto sintezę. Kad to išvengti, kiekvieną fermentacijos dieną buvo matuojamas ir jei reikia sureguliuojamas terpės pH, naudojant 1N arba 0,1 N natrio šarmą (šarmingumui padidinti) arba sieros rūgštį (rūgštingumui padidinti).

pH matavimai atlikti naudojant pH metrą:

1. Elektrodas nuplaunamas dejonizuotame vandenyje;

2. Nuplautas elektrodas įstatomas į tirpalą, kurio pH norima nustatyti;
3. Palaukiama kol pH vertė nusistovės ir pasigirs garsinis signalas;
4. Gauta reikšmė užrašoma, elektrodas ištraukiamas ir patalpinamas atgal į dejonizuotą vandenį.

2.5. Naudoti anglies šaltiniai

Alginato biotechnologinei gamybai optimizuoti buvo tirti šie anglies šaltiniai:

1) Tradiciniai angliavandeniai:

- **Gliukozė** – monosacharidas, natūralus, paprastasis cukrus randamas visose augalų ir gyvūnų sistemose. Žmogaus organizme gaminamas vykstant gliukoneogenezei. Dažniausiai gamtoje aptinkamas izomeras D-gliukozė. Komerciškai gliukozė gaminama iš kukurūzų krakmolo, kaip baltos spalvos kristalinė medžiaga. Cheminė formulė – $(C_6H_{12}O_6)_n$ [56].
- **Celiuliozė** – Tai gausiausias organinis junginys, įeinantis į augalų ląstelių sienelių sudėtį. Tai ilgas, linijinės struktūros polisacharidas, sudarytas iš 300 – 3000 gliukozės vienetų, sujungtų, β -1,4-glikozidinėmis jungtimis. Celiuliozė yra vienas svarbiausių ir plačiausiai naudojamų polisacharidų įvairiose pramonės šakose. Cheminė formulė – $(C_6H_{10}O_5)_n$ [56].
- **Laktozė** – piene ir pieno produktuose randamas disacharidas, susidedantis iš gliukozės ir galaktozės, sujungtų β -1,4-glikozidinėmis jungtimis. Tai baltos spalvos, kristalinė medžiaga naudojama įvairiose pramonės šakose, taip pat medicinoje ir farmacijoje. Cheminė formulė – $C_{12}H_{22}O_{11}$ [56].
- **Fruktozė** – saldžiausias monosacharidas, randamas meduje ir įvairiuose vaisiuose. Naudojama kaip stabilizatorius, tirštiklis, kvapioji medžiaga, tekstūrai pagerinti bei kaip saldiklis. Cheminė formulė – $C_6H_{12}O_6$ [56].
- **Ksilozė** – aldopentozės monosacharidas, dar vadinamas medienos cukrumi. Tai gausiausias pentozės cukrus randamas lignoceliulioziniuose žaliavose. Natūraliai randama ir vaisiuose, daržovėse bei piene. Ksilozė ypač naudojama mikroorganizmų fermentacijos procese, gaminant bioetanolį. Cheminė formulė – $C_5H_{10}O_5$ [56].
- **Arabinozė** – pentozės cukrus randamas augalų polimeruose (hemiceliuliozėje, pektine). Kaip ir ksilozė yra pagrindinis hemiceliuliozės komponentas, sudarantis apie 12 %. Cheminė formulė – $C_5H_{10}O_5$ [56].
- **Galaktozė** – heksozės monosacharidas, gaunamas hidrolizuojant laktozę. Žmogaus organizme gali būti sintetinama iš gliukozės. Galaktozė reikalinga ląstelių energijai bei įeina į glikolipidų sudėtį. Cheminė formulė – $C_6H_{12}O_6$ [56].

2) Cukraus alkoholiai:

- **Ksilitolis** – natūraliai iš vaisių, daržovių, uogų, avižų ir cukranendrių gaunamas saldiklis. Dėl žemo glikemijos indekso turi minimalų poveikį gliukozės kiekiui kraujyje, taip pat neturi įtakos dantų kariesų susidarymui. Gaminamas iš ksilano, randamo medienoje, kuris vėliau hidrolizuojamas iki ksilozės. Pramoniniu būdu gaunamas hidrinant ksilozę ar atliekant mikrobinę fermentaciją iš ksilozės. Cheminė formulė – $C_5H_{12}O_5$ [57].

- **Eritritolis** – švelnaus, saldaus skonio alkoholis, naudojamas kaip saldiklis kramtomosios gumos, ledų, saldainių ir gėrimų gamyboje, tekstūrai bei skoniu pagerinti. Eritritolis apie 70 % saldesnis už sacharozę, nekaloringas, nesukelia karieso ir neturi įtakos gliukozės kiekiui kraujyje. Pramoniniu būdu gaminamas atliekant kukurūzų krakmolo fermentinę hidrolizę ir fermentuojant gliukozę. Šaltiniai, kuriuose gausu eritritolio: daržovės, melionai, persikai ir grybai. Cheminė formulė – $C_4H_{10}O_4$ [57].
- **D-manitolis** – malonaus skonio, mažo kaloringumo cukraus alkoholis, daugiausiai naudojamas kaip saldiklis. Manitolis mažai tirpus vandenyje, ribotai tirpsta organiniuose tirpikliuose ir visiškai netirpsta eteriuose, ketonuose bei angliavandeniliuose. Gaunamas redukuojant manozę ar atliekant fruktozės hidrinimą. Natūralūs manitolio šaltiniai: figos, alyvuogės, grybai, maumedis, dumbliai, mielės. Cheminė formulė – $C_6H_{14}O_6$ [57].
- **D-sorbitolis** – manitolio izomeras, saldaus ir malonaus skonio pramonėje naudojamas saldiklis. Už sacharozę saldesnis 60 % bei turintis mažiau kalorijų. Vandenyje tirpsta daug geriau nei manitolis, gali būti skystos ir kristalinės (kietos) būsenos. Sorbitolis yra chemiškai inertiškas ir stabilus įvairiose temperatūros ribose. Pagrindiniai šaltiniai: kriaušės, persikai, nektarinai, abrikosai, razinos ir datulės. Sorbitolis gaminamas atliekant gliukozės redukciją iš kukurūzų sirupo. Dažniausiai naudojamas sirupų, šokoladų, vitamino C gamyboje. Cheminė formulė – $C_6H_{14}O_6$ [57].

3) Alternatyvūs, iš antrinių žaliavų:

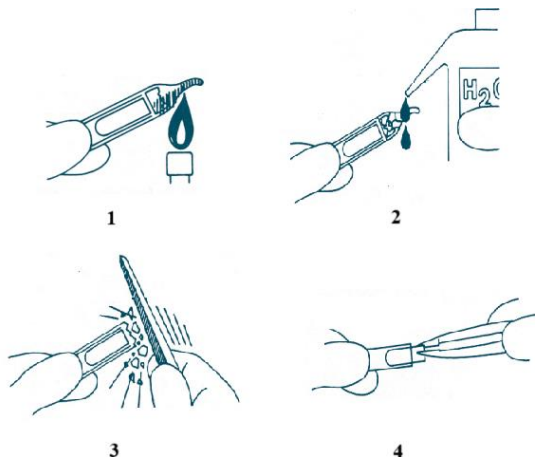
- **Kokosų palmių žiedų cukrus** – tai natūralus, būdingo karamelės kvapo cukrus, gaunamas iš kokoso palmių žiedų sulčių. Cukrus gaminamas nupjaunant neatsivėrusius žiedynus, po 12 valandų surenkant išsiliejusią sulą, kuri vėliau kaitinama ir reguliariai maišoma, kol sutirštėja ir kristalizuojasi. Cukruje aptinkama glitimo, krakmolo, C4 cukrų, aliejaus [58].
- **Nerafinuotas cukranendrių cukrus** – natūralus, iš cukranendrių sulčių išgaunamas cukrus, kuriame gausu monosacharidų (pvz. 76 – 89 % sacharozės, 1,5–15 % redukuojančių cukrų), vitaminų (A, B, C, E) ir mikroelementų (kalcio, magnio, fosforo, kalio). Tai vienas iš labiausiai naudojamų cukrų pasaulyje [59].
- **Vaisių žievelių hidrolizatai** – vaisių žievelėse esantys polisacharidai fermentinės hidrolizės metu lengvai paverčiami redukuojančiais cukrais, todėl žievelių hidrolizatai gali būti naudojami kaip anglies šaltiniai mitybinėje terpėje aukštesnės pridėtinės vertės produktams gaminti [60]. Tyrimai atlikti su šių vaisių žievelių hidrolizatais: mandarinų, apelsinų, obuolių, melionų, citrinų, avokadų.

2.6. Atsinaujinančių šaltinių pavertimas į redukuojančius cukrus

- Atsveriama 3 % tiriamosios atsinaujinančios žaliavos;
- Įpilama 0,1 M citratinio buferio, kurio pH 4,8, taip pat fermentinio mišinio „Cellustar XL“ (kuriame yra celiuliazės ir ksilanazės);
- Mišinys inkubuojamas 50 °C temperatūroje 50 min;
- Mėginiai centrifuguojami 10 min 9000 aps/min greičiu;
- Nustatomi redukuojantys cukrai pagal gliukozės kalibracinę kreivę, naudojant 0,1 ml tiriamojo tirpalo.

2.7. Išdžiovintų *Azotobacter vinelandii* bakterijų atgaivinimas

Tyrimams naudotos ampulėje patalpintos, šaltyje išdžiovintos *Azotobacter vinelandii* DSM 85 bakterijų kultūros, gautos iš Vokietijoje esančios mikroorganizmų ir ląstelių kultūrų kolekcijos DSMZ. Tam, kad bakterijų kultūra būtų atgaivinta reikia tinkamai atidaryti ampulę kaip pavaizduota 2.1 pav.



2.1 pav. Šaltyje išdžiovintų *A. vinelandii* bakterijų ampulės atidarymo technika [61]

Pirmiausiai išorinis ampulės antgalis atsargiai pakaitinamas liepsnoje (1), paskui užlašinami keli lašai šalto vandens (2), kad ampulės stiklas suskiltų. Panaudojant pincetą nuskeliama ampulės viršūnė (3) ir galiausiai pincetu ar kitu įrankiu ištraukiama izoliuojanti medžiaga ir išimama vidinė kapsulė (4). Vidinė kapsulė, ištraukus apsauginį kamštį, nudeginama liepsnoje. Pabaigoje į kapsulę įpilama 0,5 ml specialios terpės, skirtos bakterijų kultūrai atgaivinti. Bakterijos perkeliamos padauginimui į skystąją arba kietąją terpę.

2.8. *Azotobacter vinelandii* bakterijų kultivavimas

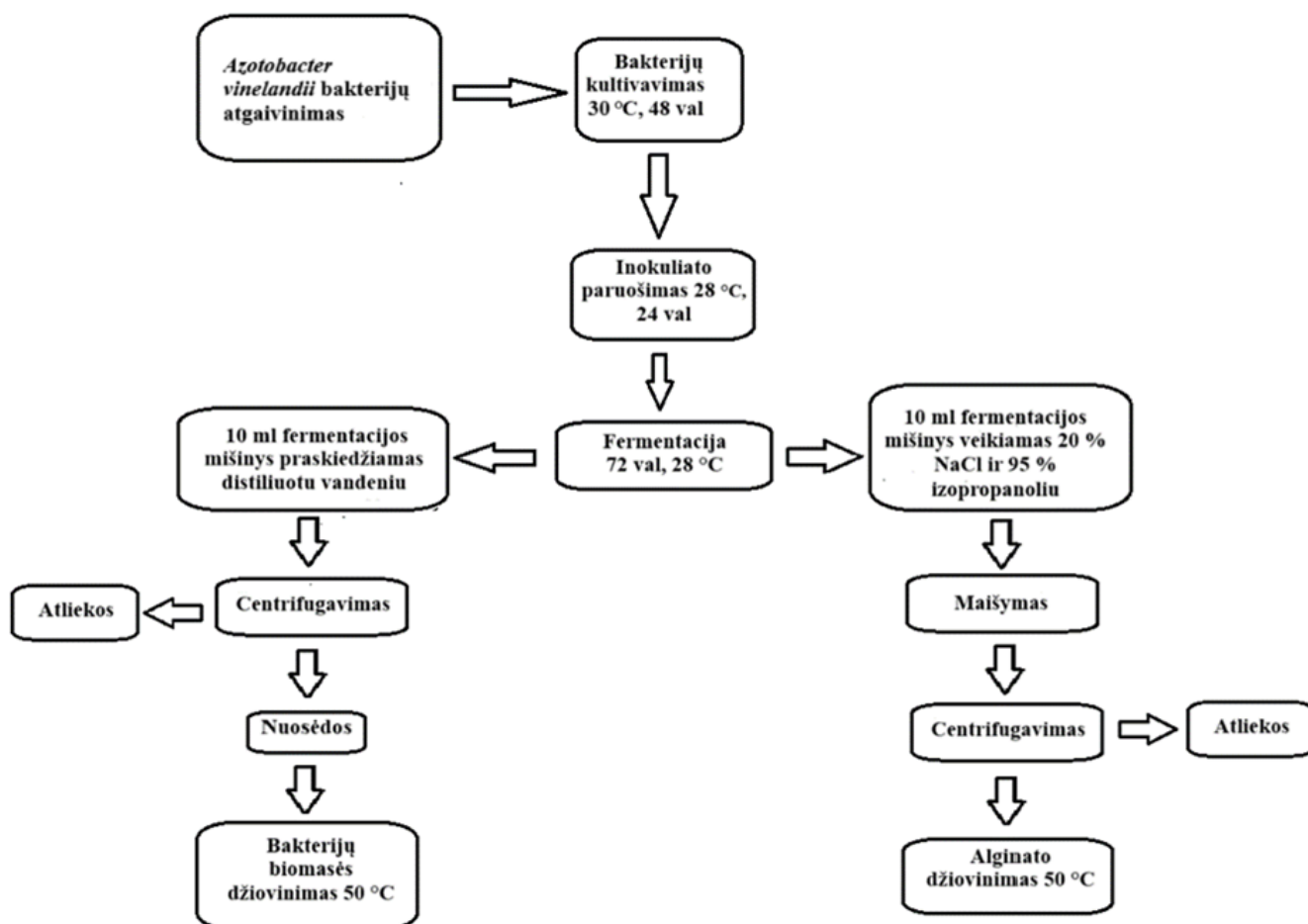
Į petri lėkšteles įpilama autoklave sterilizuotos bakterijų kultivavimo terpės su agaru (sudėtį žr. 2.3 lentelėje). Terpei sustingus atliekamas bakterijų sėjimas į terpę paviršiniu būdu: pipete užlašinama 50 μ l *A. vinelandii* bakterijų suspensijos ir naudojant sterilią kilpelę išsklaidoma. Lėkštelės apverčiamos ir laikomos termostate 30 °C temperatūroje, 48 valandas.

2.9. Inokulianto paruošimas ir įnešimas į produkcijos terpę

Kilpele paimamos ant agaro terpės užaugusių *Azotobacter vinelandii* bakterijų kolonija, kuri perkeliama į mėgintuvėlį su skysta terpe, kurios sudėtis išlieka tokia pati, kaip nurodyta 2.3 lentelėje. Mėgintuvėlis su bakterijomis maišomas termostatiname kratytuve, esant 28 °C temperatūrai ir 150 aps/min maišymo greičiui. Į 200 ml mitybinę alginato produkcijos terpę pridedama 10 ml bakterijų inokulianto. Kolboje esantis mišinys toliau maišomas termostatiname kratytuve 3 dienas, palaikant 28 °C temperatūrą, 150 aps/min. maišymo greitį.

2.10. Bakterijų biomasės ir alginato gavimas

Alginato gamybos iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų technologijos etapai pavaizduoti 2.2 pav.



2.2 pav. Alginato gamybos iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų pagrindiniai etapai

2.10.1. Ląstelių biomasės nusodinimas

Bakterinių ląstelių biomasės nusodinimas atliekamas tokia seka:

- 10 ml produkcijos terpės įpilama į mėgintuvėlį ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 45 ml;
- Mėginiai centrifuguojami 10 min 9000 aps/min greičiu;
- Po centrifugavimo supernatantas nupilamas, o gautos nuosėdos išdžiovinamos termostate 50 °C temperatūroje.

2.10.2. Alginato nusodinimas

- Alginatui nusodinti į 10 ml produkcijos terpę įpilama 0,5 ml 20 % NaCl tirpalo;
- Tirpalas veikiamas 95 % izopropanoliu;
- Mėginys maišomas termostatiniam kratytuvė palaikant 28 °C temperatūrą ir 150 aps/min greitį;
- Mėginiai centrifuguojami 10 min 9000 aps/min greičiu;
- Supernatantas nupilamas, gautos nuosėdos išdžiovinamos termostate, 50 °C temperatūroje.

2.11. Gliukozės kalibracinės kreivės sudarymas

Pagal pateiktus tūrius (2.4 lentelė) supilstomi tirpalai tokia tvarka: gliukozės (1 mg/ml) tirpalas, citratinis buferis ir DNS reagentas. Mėgintuvėliai patalpinami į verdančio vandens vonelę 5 min. Turinys sumaišomas ir spektrofotometru išmatuojama 540 nm bangos ilgyje šviesos sugertis tiriamaisiais tirpalais. Matavimas spektrofotometru atliekamas tokiu eiliškumu:

- 1) Nustatomas bangos ilgis 540 nm;
- 2) Įstatoma kiuvetė su „tuščiu“ mėginiu ir uždengiamas spektrofotometro dangtelis. Spaudžiant mygtuką „zero“ nustatomos prietaiso sugerties vertės, lygios nuliui;
- 3) Išimama kiuvetė su „tuščiu“ mėginiu ir į ją įpilamas tiriamasis tirpalas;
- 4) Kiuvetė su tiriamuoju tirpalu įstatoma į spektrofotometrą ir uždengiamas dangtelis;
- 5) Išmatuojama 540 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio sugertis tiriamojo tirpalo.

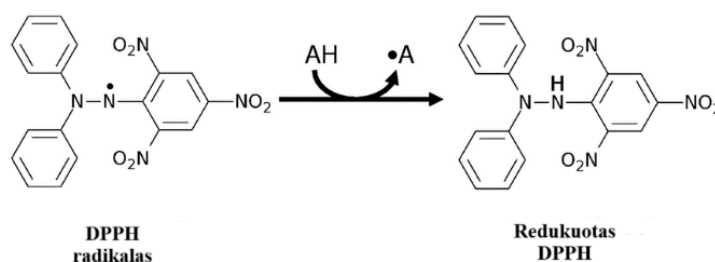
2.4 lentelė. Kalibracinės kreivės sudarymas

Mėgintuvėlio nr.	Standartinis gliukozės tirpalas, ml	Citratinis buferis, ml	DNS reagentas
1	0,05	0,95	1
2	0,1	0,9	1
3	0,2	0,8	1
4	0,3	0,7	1
5	0,4	0,6	1
6	0,5	0,5	1
7	1	0	1
8	0	1	1

2.12. Alginatų, pagamintų naudojant skirtingus anglies šaltinius, antioksidacinio aktyvumo nustatymas

2.12.1. Antioksidacinių savybių įvertinimas naudojant DPPH metodą

Antioksidacinis aktyvumas įvertinamas nustatant, kiek procentų DPPH radikalo geba neutralizuoti bioaktyvūs junginiai.



2.3 pav. DPPH radikalo redukcijos reakcijos mechanizmas [62]

Tyrimo eiga:

2 ml metanolio užpilama ant 0,2 g susmulkintos žaliavos, homogenizuojama 10 min. Homogenatas centrifuguojamas 9000 aps/min greičiu, 10 minučių. Surenkamas supernatantas.

Tiriamasis tirpalas ruošiamas į mėgintuvėlį įpilant 0,07 ml paruošto mėginio ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišomas. Mėginiai 15 minučių laikomi tamsoje, paskui išmatuojama tirpalo šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje.

Palyginamasis tirpalas ruošiamas į mėgintuvėlį įpilant 0,07 ml metanolio ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Etaloninis DPPH tirpalas ruošiamas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje. Kontrolinis mėginys – metanolis.

Slopinimas apskaičiuojamas pagal 2.1 formulę:

$$\text{slopinimas (\%)} = [(A_B - A_A)/A_B] \cdot 100 \quad (2.1)$$

Čia A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis;

A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

2.12.2. Redukcinių savybių nustatymas

0,1 g išdžiovintos tiriamosios medžiagos ekstrahuojama 5 ml metanolyje 45 °C 0,5 val. Gautas tirpalas centrifuguojamas 9000 aps/min greičiu, 10 minučių ir naudojamas tyrimams.

Paruošiami skirtingų koncentracijų mėginiai: 0,01 mol/l (0,25 ml bandinio ir 0,25 ml etanolio), 0,005 mol/l (0,125 ml bandinio ir 0,375 ml metanolio), 0,0025 mol/l (0,06 ml bandinio ir 0,44 ml metanolio), 0,00125 mol/l (0,00125 ml bandinio ir 0,46 ml metanolio).

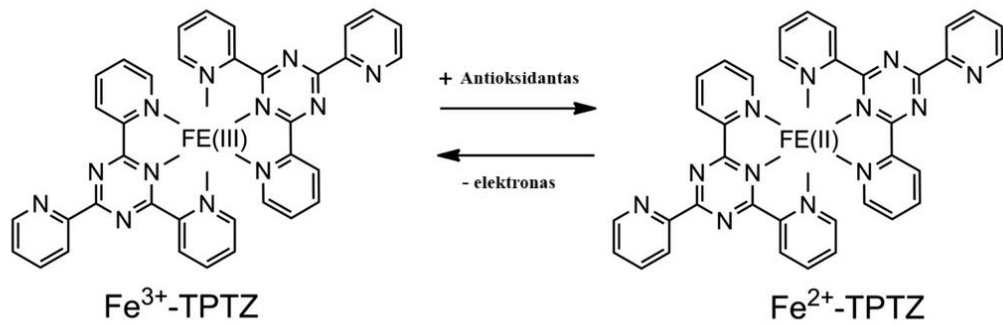
Į 0,5 ml skirtingų koncentracijų mėginius, supilama 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio bei 1,25 ml $K_3[Fe(CN)_6]$. Sumaišoma ir inkubuojama 50 °C temperatūroje 20 min. Po to pridedama 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišoma. Centrifuguojama 10 min, 9000 aps/min greičiu.

Nucentrifuguoto tirpalo 1,25 ml sumaišoma su 1,25 ml distiliuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 % $FeCl_3$. Mėginiai išmatuojami 700 nm bangos ilgyje.

Kontrolinis mėginys – 1 ml $K_3[Fe(CN)_6]$ ir 1 ml fosfatinio buferio.

2.12.3. Antioksidacinių savybių nustatymas pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ

Šiuo metodu nustatomos augalo redukuojančios savybės. Jis paremtas Fe^{3+} -TPTZ pavirtimu į Fe^{2+} -TPTZ 593 nm bangos ilgyje.



2.4 pav. FRAP metodo mechanizmo reakcija [63]

0,1 g išdžiovintos tiriamosios medžiagos ekstrahuojama 5 ml metanolyje 45 °C, 0,5 val. Tirpalas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min ir naudojamas tyrimams.

Ruošiami šie reagentai:

- 300 mM acetato buferis (pH 3,6), 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) ištirpintas 40 mmol/l HCl, FeCl₃·6H₂O (20 mmol/l).
- FRAP reagentas ruošiamas su 25 ml 300 mM acetato buferio, 2,5 ml 10 mmol TPTZ ir 2,5 ml FeCl₃·6H₂O (20 mmol/l).

Mėginiai 100 µL yra sumaišomi su 3 ml FRAP reagentu. Reakcijos mišinys matuojamas 593 nm bangos ilgyje spektrofotometriškai.

Kalibravimo kreivė ruošiama FeSO₄·7H₂O (5, 10, 15, 20; 25 µmol/l). Reikšmė apskaičiuojama pagal kalibravimo kreivę µmol/l Fe(II)/l.

Kalibracinei kreivei naudotas kontrolinis mėginys – 3 ml FRAP reagento ir 7 ml H₂O. Apskaičiuojamas antioksidacinis aktyvumas (µmol/l) pagal FeSO₄·H₂O kalibracinę kreivę (žr. 3.20 pav.).

2.13. FT-IR spektrų užrašymas

Buvo pasirinkta užrašyti didžiausių gautų koncentracijų alginatų FT-IR spektrus, kai anglies šaltiniai buvo naudota gliukozė, D-manitolis, kokosų palmių žiedų cukrus, citrinų ir apelsinų žievelių hidrolizatai. Alginato mėginiai FT-IR spektrų užrašymui buvo siūsti į Vilniaus universiteto gyvybės mokslų centro biotechnologijos institutą.

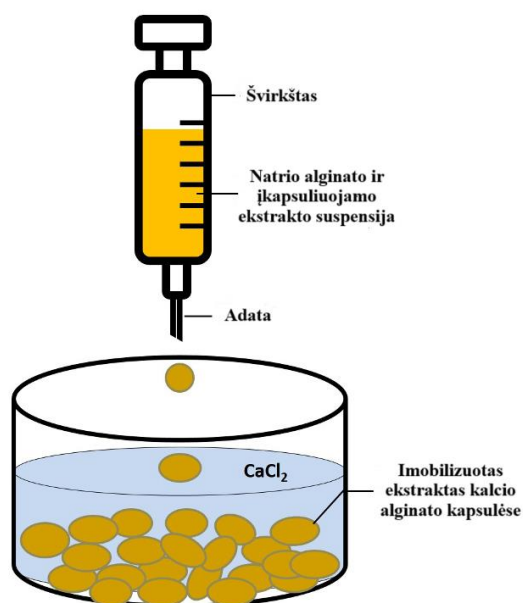
Spektrų užrašymo eiga:

- bandiniai sumaišomi su KBr milteliais masių santykių 1:100 ir supresuojami į tabletes;
- FT-IR spektrai užrašomi „Spectrum GX“ spektrofotometru, bangų srities intervale nuo 4000 iki 400 cm⁻¹. Skenavimų skaičius – 10. Skiriamoji geba – 4 cm⁻¹;
- duomenys apdorojami *Spectrum* programa.

2.14. Jonažolės ekstrakto įkapsuliavimas kalcio alginato kapsulėje

Jonažolės ekstrakto įkapsuliavimo į kalcio alginato kapsulės eiga:

- Paruošiamas natrio alginato (4 %) tirpalas: 0,4 g natrio alginato ištirpinama 10 ml vandens;
- 4 % natrio alginato tirpalas lygiomis dalimis sumaišomas su jonažolės ekstraktu;
- Mišinys supilamas į švirkštą arba pipetę ir turinys iš lėto lašinamas į 0,25 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tirpalą, kuris ant magnetinės maišyklės yra lėtai maišomas;
- Baigus lašinti tirpalas paliekamas nusistovėti apie 15 min;
- Gautas imobilizuotas jonažolės ekstraktas kalcio alginato kapsulėse plaunamas distiliuotu vandeniu ir nufiltruojamas naudojant filtro popierių;
- Gautos kapsulės išdžiovinamos ir ištiriamos jų antioksidacinės savybės, kurios palyginamos su pradinio jonažolės ekstrakto bei CaCl_2 tirpalo su natrio alginatu ir jonažolės ekstraktu, antioksidaciniu aktyvumu.



2.5 pav. Ekstraktų įkapsuliavimo į kalcio alginato kapsulės principinė schema [64]

Įkapsuliavimo metodo esmę sudaro biologiškai aktyvios medžiagos (fermento, baltymo, ląstelės, ekstrakto) įterpimas į matricą, siekiant apsaugoti ją nuo išoriniu veiksnių: temperatūros, šviesos, deguonies, drėgmės ir cheminių medžiagų.

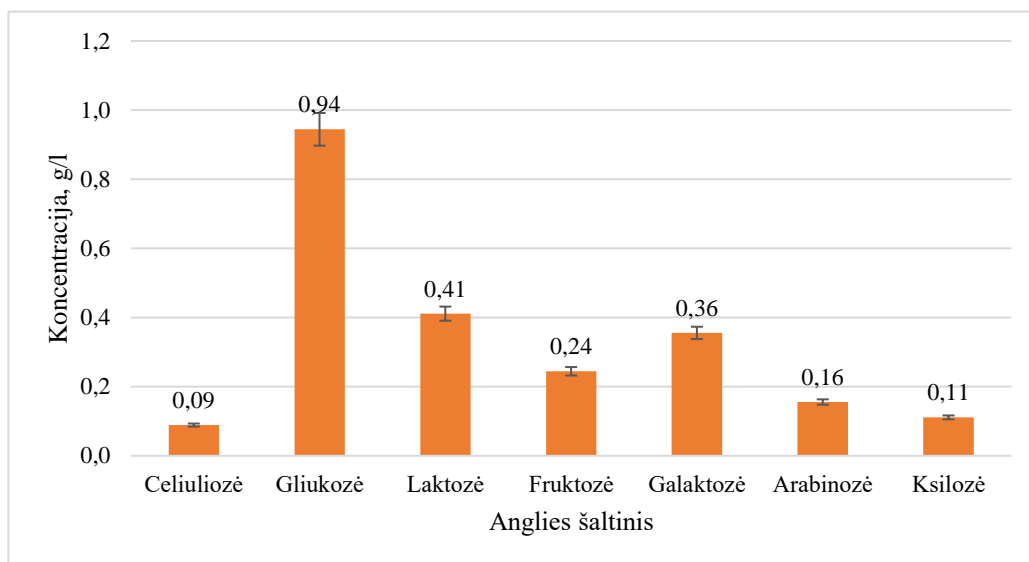
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Naudojantis *Microsoft Excel* programine įranga buvo apskaičiuoti tyrimų rezultatai bei nubraižyti grafikai.

3.1. Anglies šaltinių įtaka *A. vinelandii* bakterijų biomasės augimui

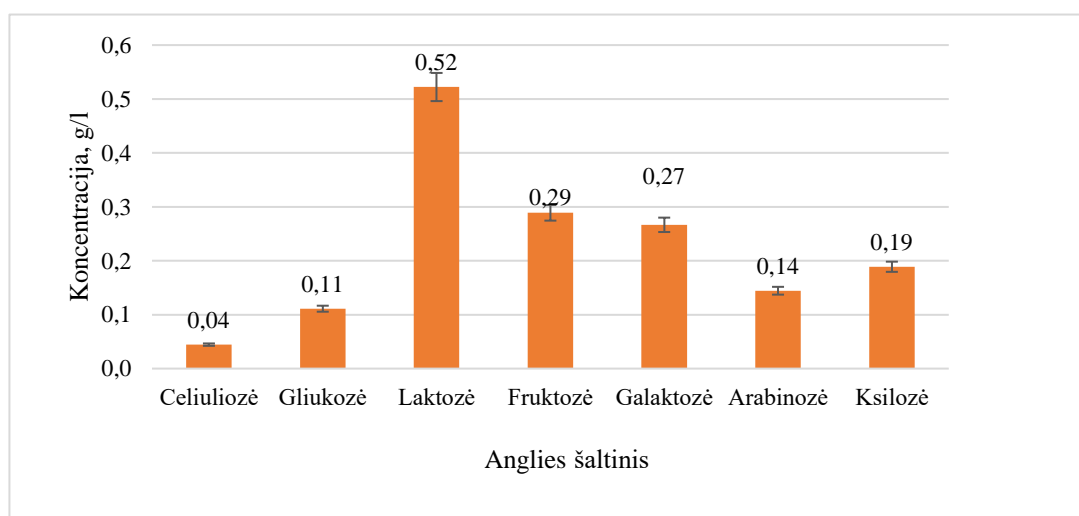
3.1.1. Rezultatai, kai anglies šaltiniais buvo naudoti tradiciniai angliavandeniai

Bakterijų biomasės koncentracija nustatyta kas 24 valandas, fermentacijos procesą vykdant tris paras.



3.1 pav. Bakterijų biomasės koncentracijos priklausomybė nuo anglies šaltinio po 24 valandų fermentacijos

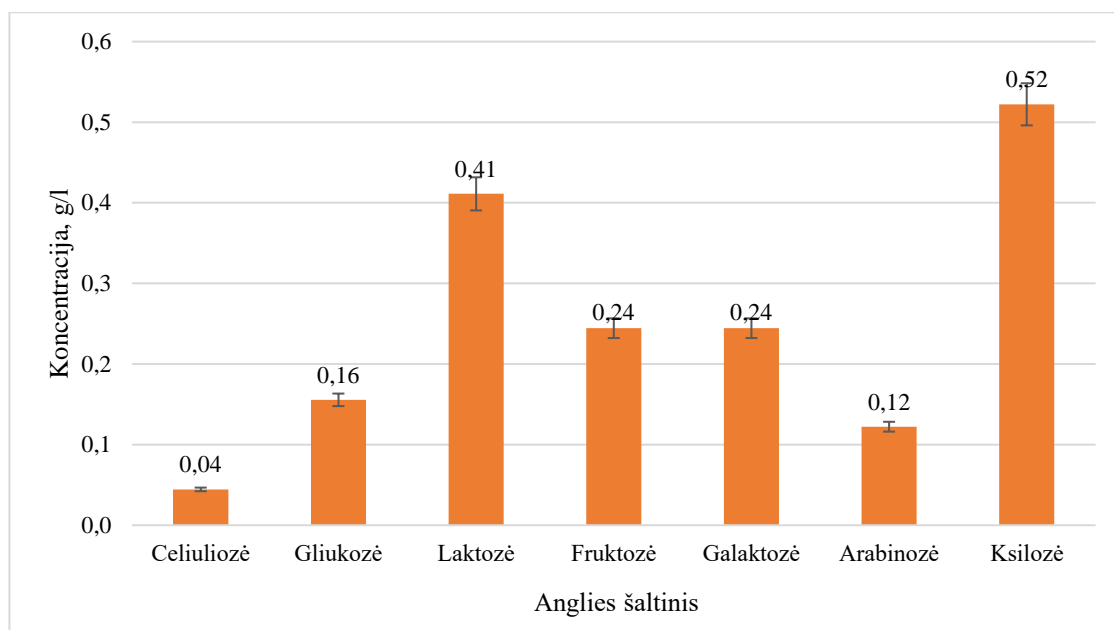
Pagal gautus rezultatus (žr. 3.1 pav.) nustatyta, kad pirmąją fermentacijos dieną didžiausia *Azotobacter vinelandii* bakterijų sausos biomasės koncentracija (0,94 g/l) gauta, kai anglies šaltiniu buvo naudota gliukozė, o mažiausia – 0,09 g/l, naudojant celiuliozę. Taip pat didesni rezultatai buvo gauti anglies šaltiniu naudojant laktozę (0,41 g/l).



3.2 pav. Bakterijų biomasės koncentracijos priklausomybė nuo anglies šaltinio po 48 valandų fermentacijos

Antrąją fermentacijos dieną (žr. 3.2 pav.) didžiausias (0,52 g/l) bakterinių ląstelių augimas stebėtas, kai anglies šaltiniu mitybinėje terpėje buvo naudota laktozė. Lyginant su pirmąją fermentacijos diena

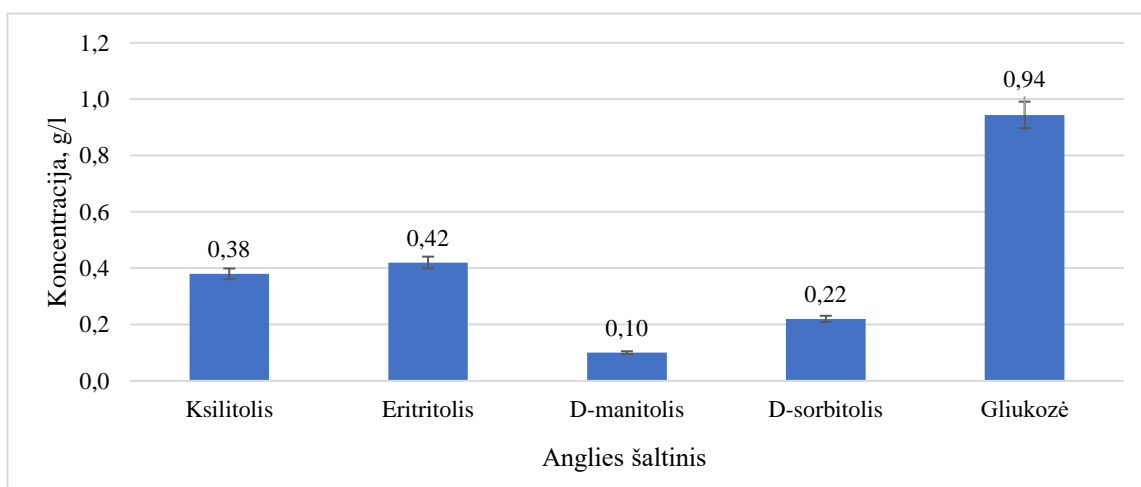
bakterijų biomasės koncentracija naudojant gliukozės anglies šaltinį ženkliai sumažėjo, kai tuo tarpu naudojant daugelį kitų anglies šaltinių – padidėjo.



3.3 pav. Bakterijų biomasės priklausomybė nuo anglies šaltinio po 72 valandų fermentacijos

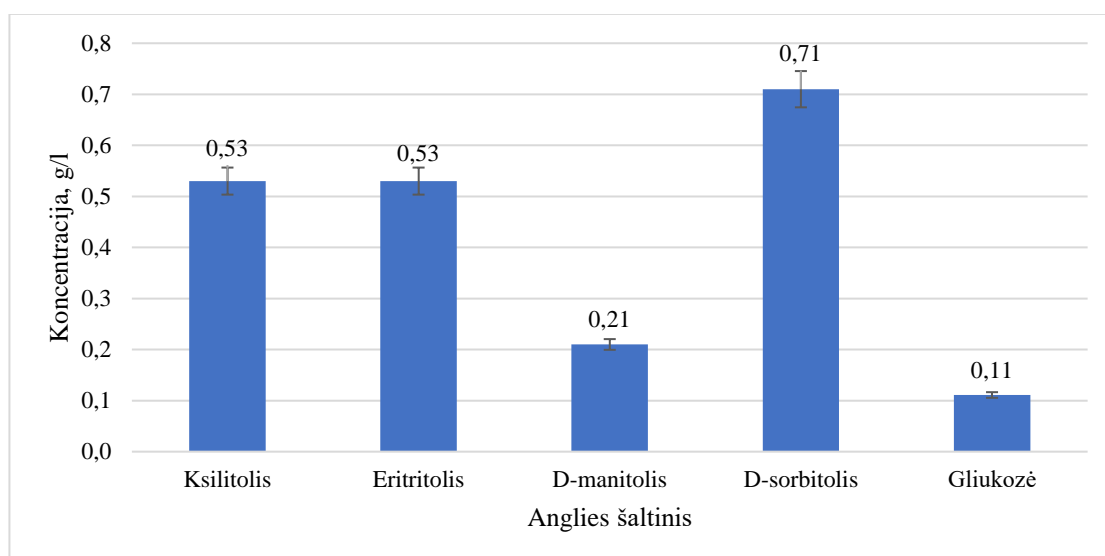
Tyrimu nustatyta (žr. 3.3 pav.), kad trečiąją fermentacijos dieną didžiausias bakterijų koncentracijos augimas (0,52 g/l) buvo, kai mitybinėje terpėje anglies šaltiniu naudota ksilozė. Taip pat didesnis bakterijų biomasės augimas nustatytas ir anglies šaltiniu naudojant laktozę (0,41 g/l). Šiuo atveju, mažiausia (0,04 g/l) bakterijų biomasės koncentracija gauta, kai anglies šaltiniu buvo naudota celiuliozė. Lyginant su antrąja fermentacijos diena bakterijų biomasės koncentracija naudojant daugelį anglies šaltinių sumažėjo, dėl galimai produkcijos terpėje sumažėjusio maistinių medžiagų kiekio.

Anglies šaltinių įtakos alginatų gamyboje nustatymui buvo atlikti tyrimai su cukraus turinčiais alkoholiais: D-manitoliu, D-sorbitoliu, ksilitoliu ir eritritoliu. Rezultatai palyginti su daugiausiai pramonėje naudojamu anglies šaltiniu – gliukoze.



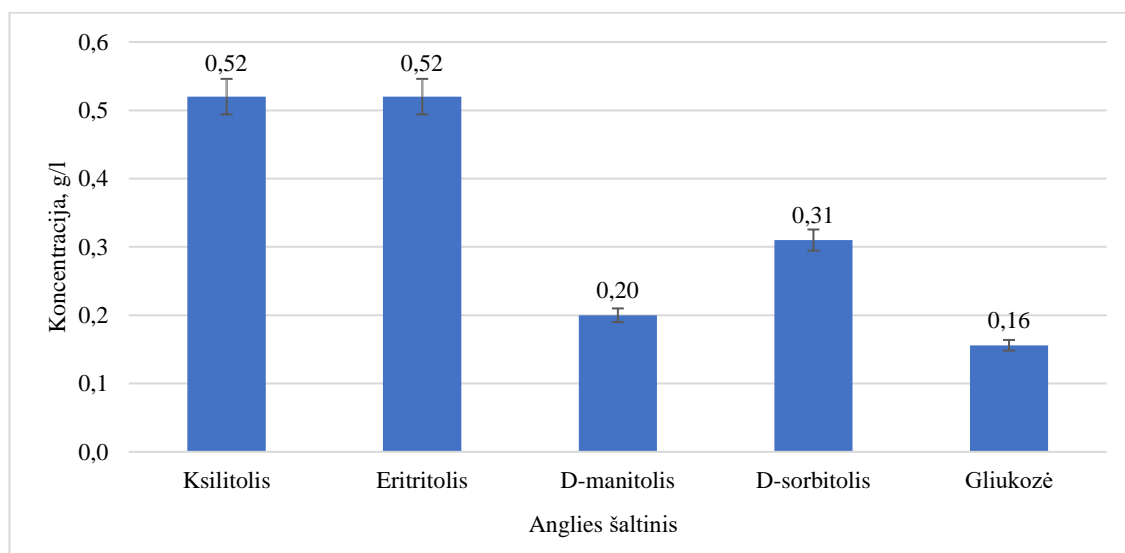
3.4 pav. Angliavandenių alkoholių, kaip anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasės koncentracijai po 24 valandų fermentacijos

Pagal gautus tyrimo duomenis (žr. 3.4 pav.) nustatyta, kad iš tyrimui naudotų angliavandenių alkoholių po 24 valandų fermentacijos bakterijų biomasės koncentracija buvo didžiausia (0,42 g/l), kai anglies šaltiniu naudotas eritritolis. Lyginant su gliukoze (0,94 g/l), naudojant cukraus turinčius alkoholius kaip anglies šaltinius, nebuvo pasiekta didesnė bakterijų biomasės koncentracija.



3.5 pav. Angliavandenių alkoholių, kaip anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasės augimui po 48 valandų fermentacijos

Antrąją fermentacijos dieną (žr. 3.5 pav.) didžiausia gauta bakterijų biomasės koncentracija – 0,71 g/l, kai mitybinėje terpėje anglies šaltiniu buvo naudotas D-sorbitolis. Su visais naudotais alkoholiais, kaip anglies šaltiniais, bakterijų biomasė, lyginant su gliukoze, ženkliai padidėjo. Šiuo atveju, naudojant gliukozę bei D-manitolį buvo gautos mažiausios bakterinių ląstelių biomasės, kurios atitinkamai yra 0,11 g/l ir 0,21 g/l.



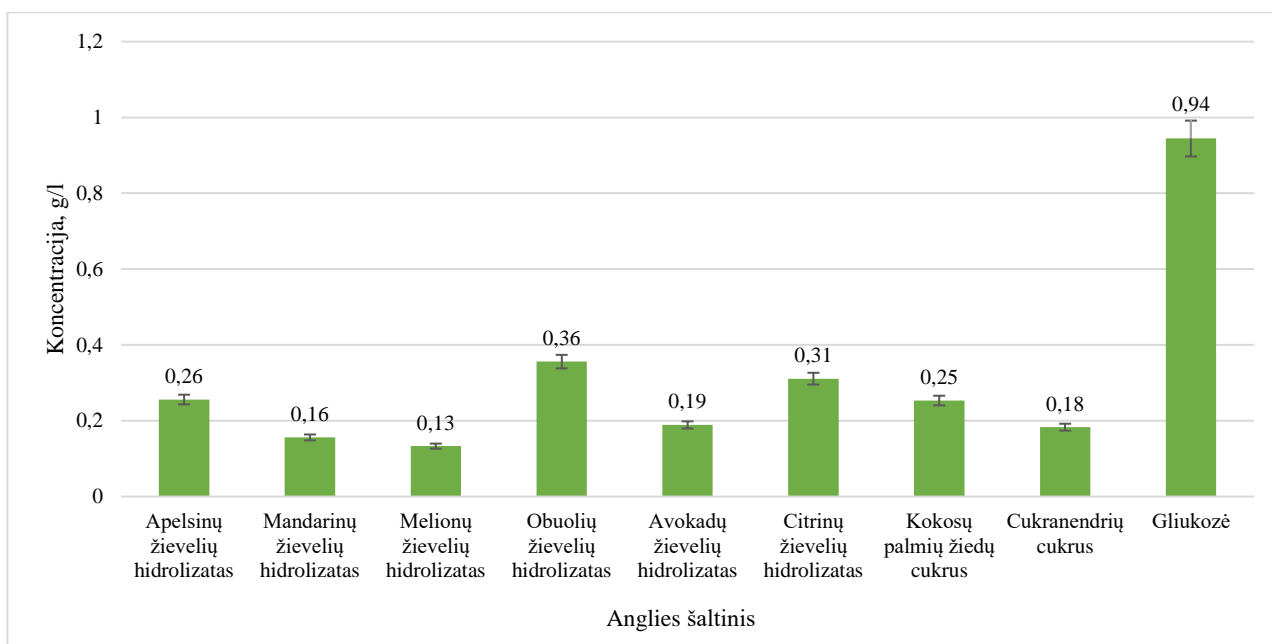
3.6 pav. Angliavandenių alkoholių, kaip anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasės koncentracijai po 72 valandų fermentacijos

Tyrimo rezultatais (žr. 3.6 pav.) nustatyta, kad po 72 valandų fermentacijos visose tirtose terpėse bakterijų biomasė nežymiai sumažėjo. Didžiausios koncentracijos (0,52 g/l) bakterijų biomasė

išskirta, kai anglies šaltiniais buvo naudojamas ksilitolis ir eritritolis. Palyginus su gliukozės anglies šaltiniu, buvo gautos didesnės biomasės koncentracijos visais atvejais.

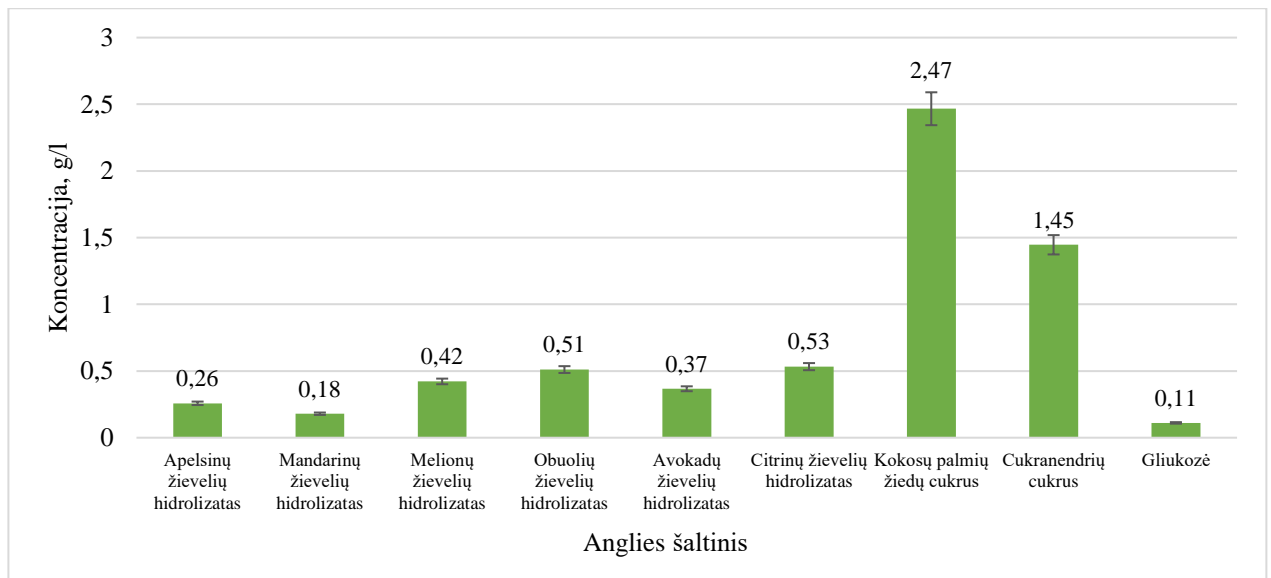
3.1.2. Antrinių žaliavų, kaip anglies šaltinių, įtaka *Azotobacter vinelandii* bakterijų biomasės augimui

Atlikti tyrimai su antrinėmis žaliavomis siekiant nustatyti jų potencialą, kaip alternatyvių anglies šaltinių naudojimo alginato gamyboje iš *A. vinelandii* bakterijų. Gauti rezultatai buvo palyginti su anglies šaltiniu – gliukoze.



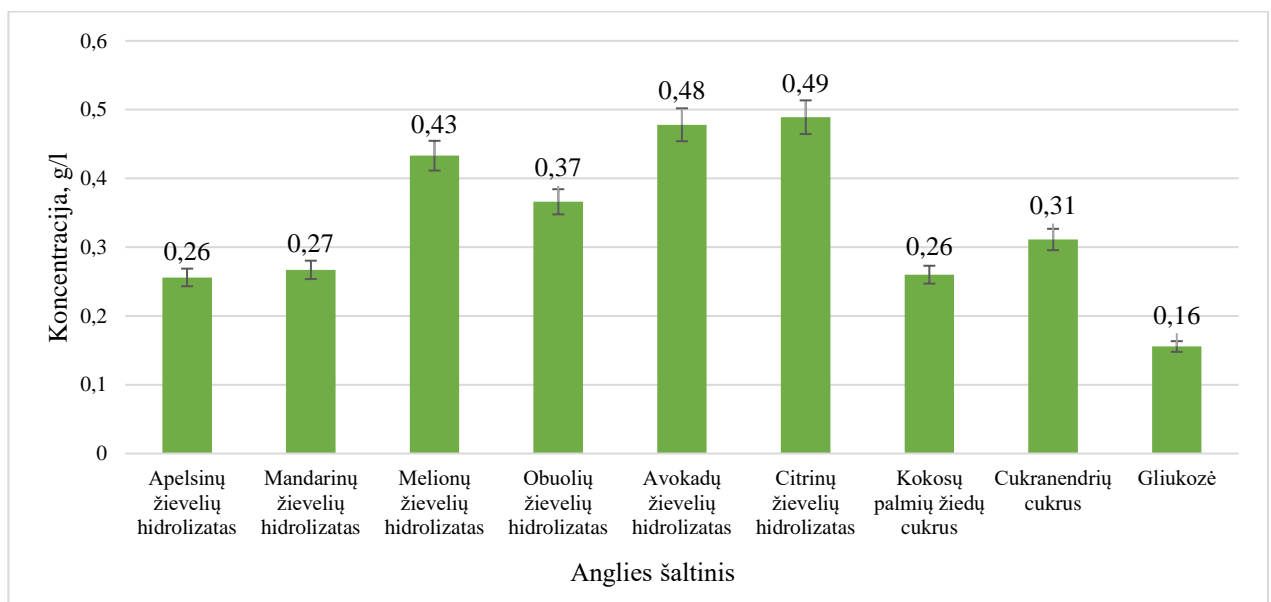
3.7 pav. Alternatyvių anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasės koncentracijai po 24 valandų fermentacijos

Po 24 valandų trukmės fermentacijos gauti rezultatai (žr. 3.7 pav.) parodė, kad iš tirtų alternatyvių anglies šaltinių didžiausia bakterijų biomasė (0,36 g/l) nustatyta substratu naudojant obuolių žievelių hidrolizatą. Didesnis biomasės koncentracijos rezultatas taip pat buvo gautas ir anglies šaltiniu mitybinėje terpėje naudojant citrinų žievelių hidrolizatą (0,31 g/l). Mažiausia koncentracija (0,13 g/l), šiuo atveju buvo gauta, kai anglies šaltiniu naudotas melionų žievelių hidrolizatas. Pagal gautus rezultatus nustatyta, kad naudoti anglies šaltiniai, lyginant su gliukozės naudojimu kaip anglies šaltinio (0,94 g/l), pasižymėjo mažesne įtaka *A. vinelandii* bakterijų biomasės augimui.



3.8 pav. Bakterijų biomasės koncentracijos priklausomybė nuo anglies šaltinio, po 48 valandų fermentacijos

Antrąją fermentacijos dieną (žr. 3.8 pav.) gauta, kad visų alternatyvių anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasėi augti buvo didesnė nei pirmąją fermentacijos dieną. Didžiausia bakterijų biomasės koncentracija gauta, kai anglies šaltiniu buvo naudotas kokosų palmių žiedų cukrus (2,47 g/l), o mažiausia (0,18 g/l) naudojant apelsinų žievelių hidrolizatą. Taip pat, didesnis bakterijų biomasės augimas (1,45 g/l) buvo stebimas ir anglies šaltiniu naudojant cukranendrių cukrų. Šiuo atveju, lyginant su gliukoze, visi substratai turėjo didesnės įtakos *A. vinelandii* bakterijų biomasės koncentracijos didėjimui.



3.9 pav. Bakterijų biomasės koncentracijos priklausomybė nuo anglies šaltinio po 72 valandų fermentacijos

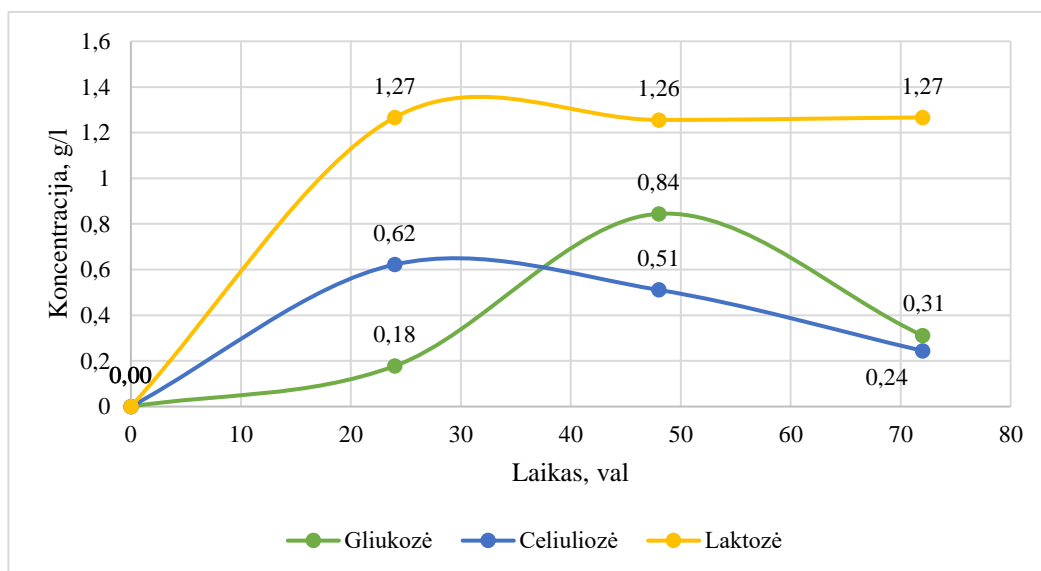
Pagal gautus tyrimo rezultatus (žr. 3.9 pav.) nustatyta, kad bakterijų biomasės koncentracijos didžiausias padidėjimas (0,49 g/l) gautas naudojant citrinų žievelių hidrolizatą, kaip anglies šaltinį. Lyginant su gliukoze, kai bakterijų biomasės koncentracija buvo gauta 0,16 g/l, tai yra tris kartus didesnė koncentracija. Taip pat didesnės koncentracijos gautos ir kai anglies šaltiniais buvo naudoti avokadų, melionų žievelių hidrolizatai – 0,48 g/l ir 0,43 g/l. Trečiąją fermentacijos dieną su tirtais

alternatyviais anglies šaltiniais visais atvejais buvo gautos didesnės bakterijų biomasės koncentracijos, palyginus su gliukozės naudojimu produkcijos terpėje.

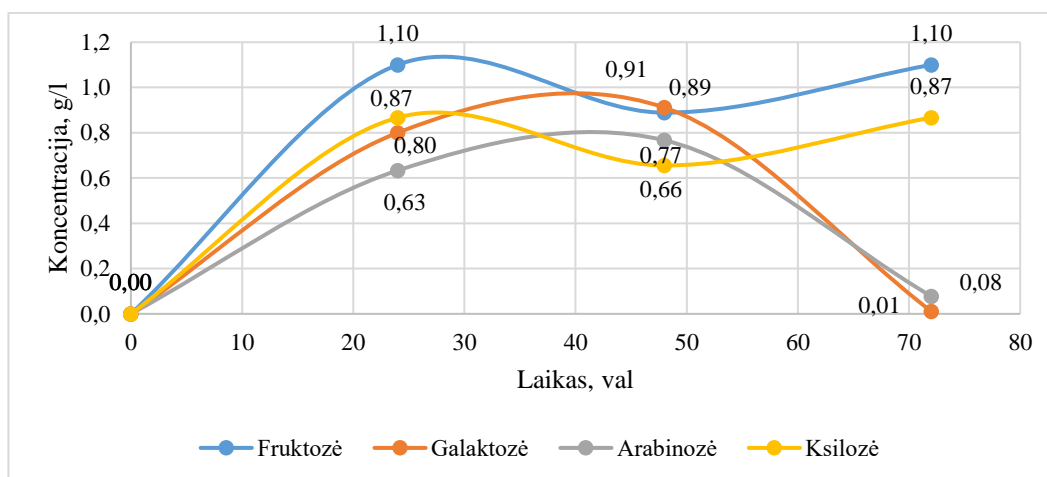
3.2. Anglies šaltinių įtaka alginato gamybai iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų

3.2.1. Tradicinių anglies šaltinių įtaka alginato koncentracijai

Tradicinių angliavandenių, kurie pramoninėje gamyboje dažniausiai naudojami anglies šaltiniais, įtaka alginato koncentracijai nustatyta po 24, 48 ir 72 valandų fermentacijos.

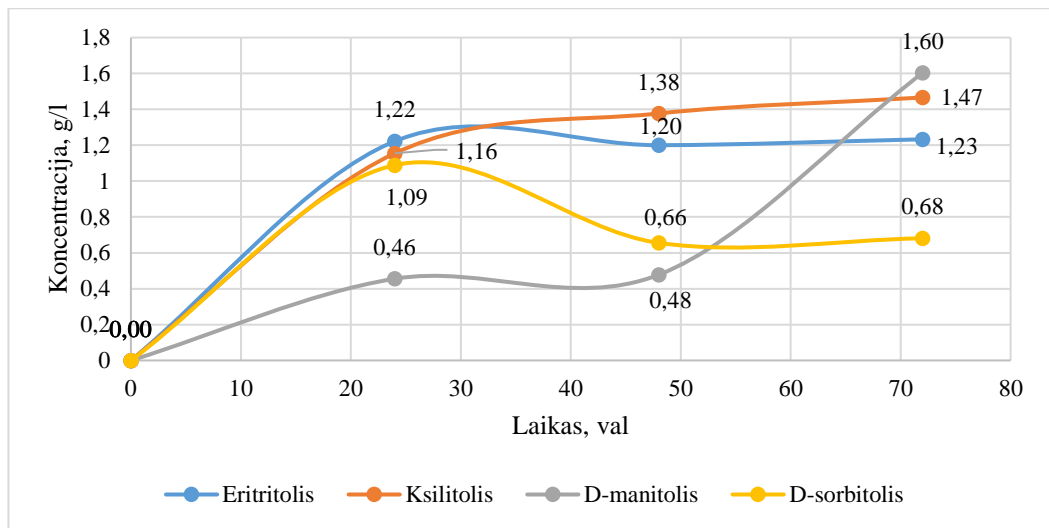


3.10 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo fermentacijos trukmės ir naudoto anglies šaltinio



3.11 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo fermentacijos laiko ir skirtingų anglies šaltinių

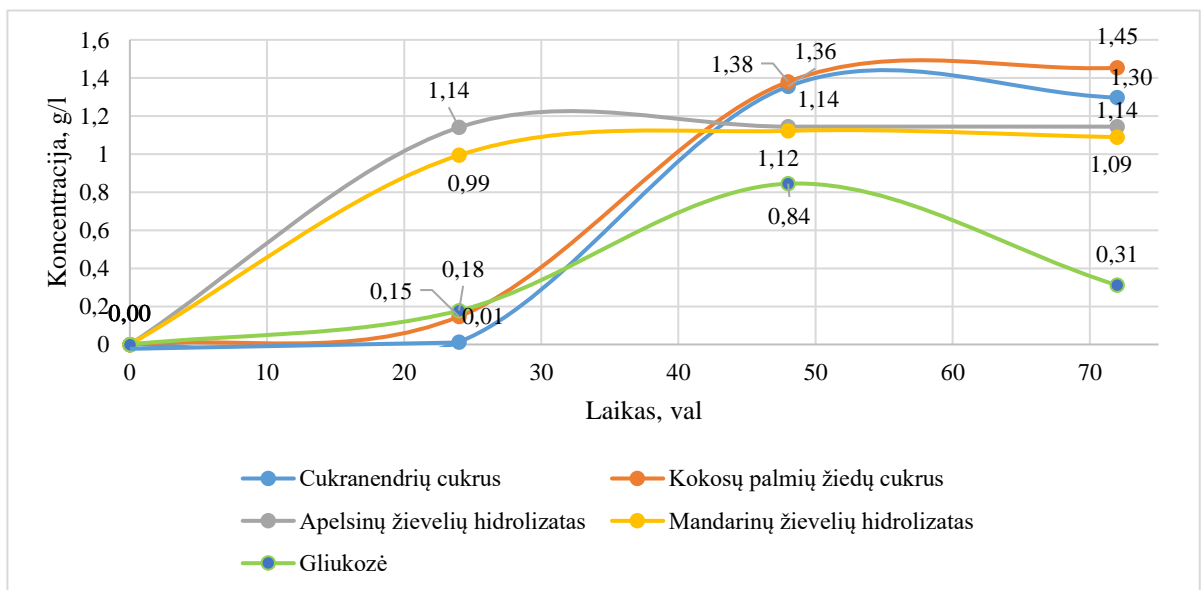
Pagal gautus rezultatus (žr. 3.10 ir 3.11 pav.) nustatyta, kad didžiausia alginato koncentracija (1,27 g/l), naudojant tradicinius angliavandenius anglies šaltiniais, gauta, kai mitybinėje terpėje substratu buvo panaudota laktozė. Šis didžiausias rezultatas nustatytas visomis fermentacijos dienomis. Didesnė alginato koncentracija (1,10 g/l) buvo gauta anglies šaltiniu naudojant fruktozę, nedidelis sumažėjimas buvo stebimas tik antrąją fermentacijos dieną. Mažiausia alginato koncentracija gauta, kai anglies šaltiniais buvo naudota arabinozė ir celiuliozė. Naudojant šiuos substratus didžiausia alginato koncentracija siekė atitinkamai 0,77 g/l ir 0,62 g/l, kas yra beveik du kartus mažiau, lyginant su laktoze.



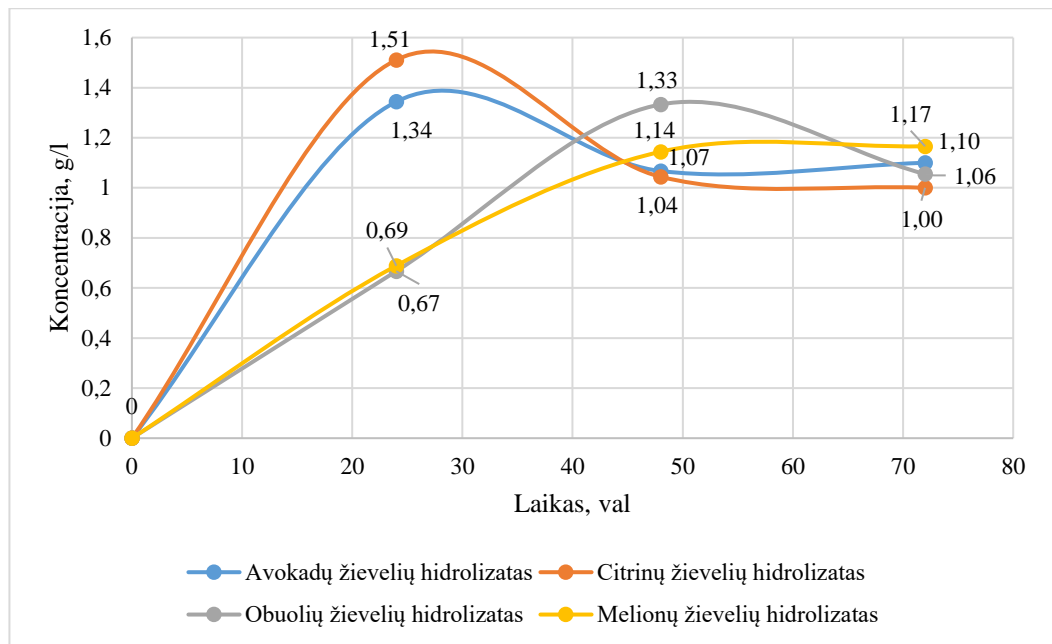
3.12 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo fermentacijos trukmės ir anglies šaltinio

Nustatyta cukraus turinčių alkoholių įtaka alginato gamybai (žr. 3.12 pav.) parodė, kad didžiausias rezultatas (1,60 g/l) gautas po 72 valandų trukmės fermentacijos, kai anglies šaltiniu buvo naudotas D-manitolis. Taip pat didesnė alginato koncentracija (1,47 g/l) buvo gauta, kaip substratą mitybinėje terpėje naudojant ksilitolį. Lyginant su D-manitolium, naudojant ksilitolį alginato koncentracija išliko panaši visomis fermentacijos dienomis.

3.2.2. Alternatyvių anglies šaltinių įtaka alginato koncentracijai



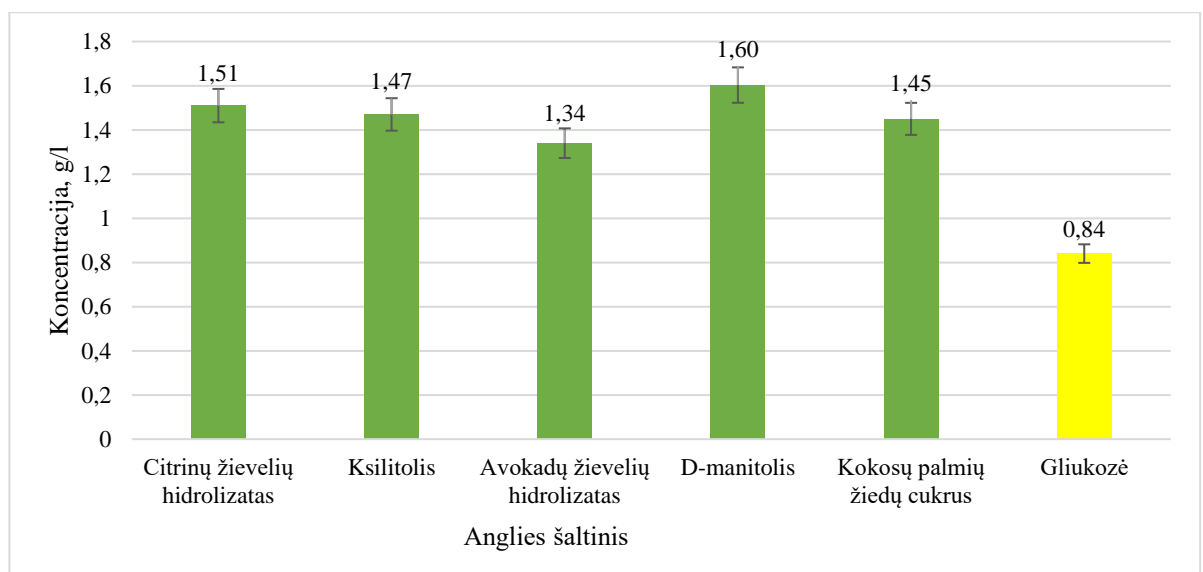
3.13 pav. Alternatyvių anglies šaltinių ir fermentacijos trukmės įtaka alginato koncentracijai



3.14 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo laiko ir skirtingų anglies šaltinių

Atlikto tyrimo rezultatai (žr. 3.13 ir 3.14 pav.) parodė, kad antrinių žaliavų, kaip anglies šaltinių naudojimas alginato gamyboje yra perspektyvus būdas pagerinti proceso efektyvumą. Nustatyta, kad didžiausia alginato koncentracija (1,51 g/l) gauta po 24 valandų trukmės fermentacijos, kai mitybinėje terpėje anglies šaltiniu buvo naudotas citrinų žievelių hidrolizatas. Kitomis fermentacijos dienomis gaunama alginato koncentracija nežymiai sumažėjo, tačiau vis tiek išliko didelė. Taip pat didelės alginato koncentracijos gautos po 24 valandų, naudojant avokadų (1,34 g/l) ir apelsinų (1,14 g/l) žievelių hidrolizatus, po 48 valandų su substratais kokosų palmių žiedų (1,38 g/l) ir cukranendrių (1,36 g/l) cukrumi. Lyginant su gliukoze, visų tirtų alternatyvių anglies šaltinių naudojimas parodė didesnius rezultatus alginato gamyboje.

Anglies šaltinių įtakos alginato koncentracijai rezultatų apibendrinimui buvo išrinkti ir 3.15 pav. pavaizduoti anglies šaltiniai, su kuriais buvo gautos didžiausios alginato koncentracijos.



3.15 pav. Anglies šaltinių įtakos alginato koncentracijai rezultatų apibendrinimas

Pagal tyrimų rezultatus nustatyta, kad didžiausios alginato koncentracijos buvo gautos anglies šaltiniais naudojant citrinų žievelių hidrolizatą (1,51 g/l), ksilitolį (1,47 g/l), avokadų žievelių hidrolizatą (1,34 g/l), D-manitolį (1,60 g/l) ir kokosų palmių žiedų cukrų (1,45 g/l). Šie rezultatai gauti po 24 valandų fermentacijos su citrinų ir avokadų žievelių hidrolizatais, bei po 72 valandų su ksilitoliu, D-manitoliumi ir kokosų palmių žiedų cukrumi. Anglies šaltiniu naudojant gliukozę, didesnė alginato koncentracija (0,84 g/l) buvo gauta po 48 valandų trukmės fermentacijos. Lyginant su gliukoze, naudojant citrinų žievelių hidrolizatą kaip anglies šaltinį alginato gamyboje buvo gautas beveik du kartus didesnis rezultatas.

3.2.3. Alginato gamybos rezultatų palyginimas su literatūros šaltiniais

Mokslinėje literatūroje, vieno tyrimo metu buvo įvertinta anglies šaltinių įtaka alginato koncentracijai, naudojant D-manitolį, gliukozę ir laktozę. Tyrimu buvo nustatyta, kad anglies šaltiniu naudojant 2 % D-manitolį alginato koncentracija buvo 3,4 g/l, kuri pasiekta ketvirtąją fermentacijos dieną. Anglies šaltiniu naudojant 2 % laktozę didesnė alginato koncentracija, lyginant su D-manitoliumi, nustatyta ketvirtąją fermentacijos dieną – 4,2 g/l. Didžiausias rezultatas gautas taip pat ketvirtąją fermentacijos dieną, kai anglies šaltiniu mitybinėje terpėje buvo naudota 2 % gliukozė – 5,2 g/l [35]. Lyginant su šiame projekte gautais rezultatais, naudojant anglies šaltinį D-manitolį, gliukozę ir laktozę gauti maždaug 2-3 kartus mažesni rezultatai nei aptartame tyrime. Tokius rezultatų skirtumus galėjo nulemti skirtingos tyrime naudotos koncentracijos, azoto šaltiniai bei fermentacijos sąlygos.

Antrinių žaliavų (pvz. vaisių žievelių) naudojimo kaip anglies šaltinių alginato gamyboje tyrimų rezultatų palyginimui literatūroje buvo rasta nedaug. Viename tyrime buvo tirtas džiovintų ir susmulkintų obuolių žievelių naudojimas kaip anglies šaltinio atliekant kietafazę fermentaciją, kurios metu naudotas substrato kiekis 250 ml terpėje – 10 g. Aptariamo tyrimo metu gauta alginato koncentracija siekė 180,64 mg/g sauso substrato [36]. Lyginant rezultatus, šio projekto metu, naudojant obuolių žievelių hidrolizatą didžiausia nustatyta alginato koncentracija – 1,33 g/l.

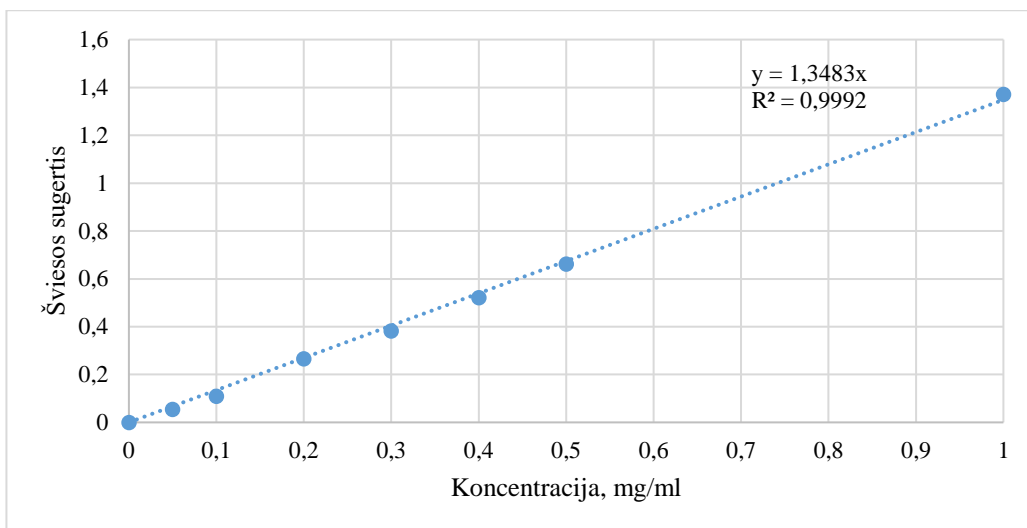
Palyginimui naudoti rezultatai pateikti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Rezultatų palyginimas

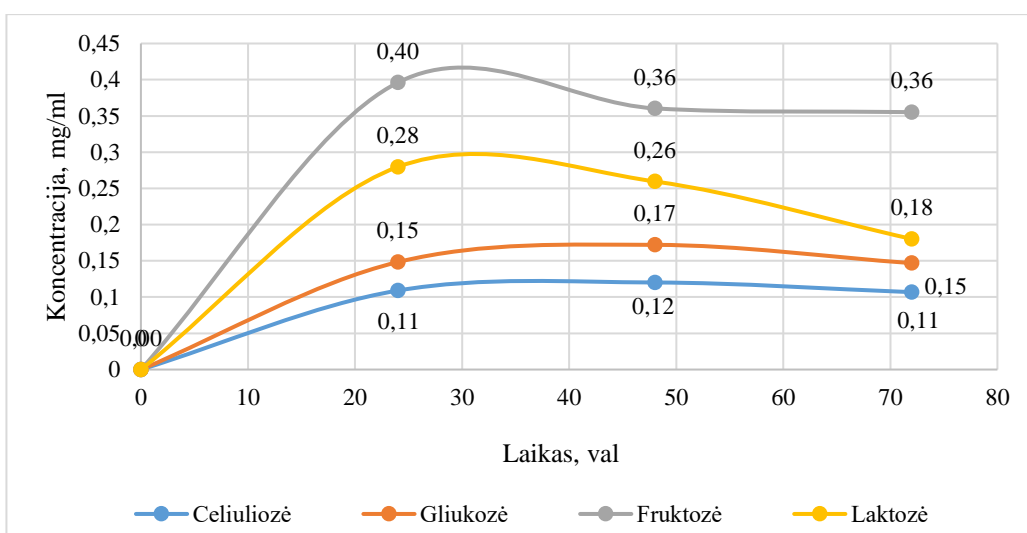
Anglies šaltinis	Gauta alginato koncentracija	Alginato koncentracija literatūros šaltiniuose [35, 36]
Obuolių žievelės	1,33 g/l	180,64 mg/g sauso substrato
Gliukozė	0,84 g/l	5,2 g/l
D-manitolis	1,60 g/l	3,4 g/l
Laktozė	1,27 g/l	4,2 g/l

3.3. Redukuojančių cukrų nustatymas

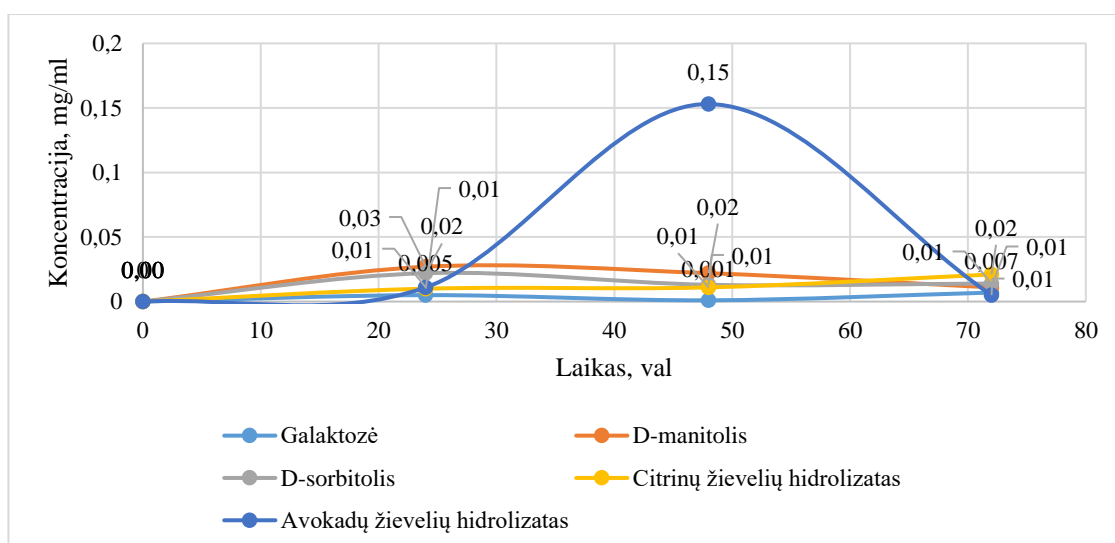
Redukuojančių cukrų koncentracijai apskaičiuoti buvo naudota gliukozės kalibracinė kreivė (žr. 3.16 pav.).



3.16 pav. Gliukozės kalibracinė kreivė



3.17 pav. Redukuojančių cukrų koncentracijos priklausomybė nuo fermentacijos laiko ir anglies šaltinio



3.18 pav. Redukuojančių cukrų koncentracijos priklausomybė nuo laiko ir anglies šaltinių

Iš gautų rezultatų (žr. 3.17 pav. ir 3.18 pav.) nustatyta, kad po 24 valandų trukmės fermentacijos didžiausia redukuojančių cukrų koncentracija terpėje buvo anglies šaltiniu naudojant fruktozę (0,40 mg/ml). Taip pat, didesnės cukrų koncentracijos gautos anglies šaltiniais naudojant laktozę (0,28 mg/ml), avokadų žievelių hidrolizatą (0,15 mg/ml) ir gliukozę (0,15 mg/ml). Iš daugumos tirtų substratų didžiausios cukrų koncentracijos buvo stebimos po 24 valandų fermentacijos, o kitomis dienomis koncentracija sumažėjo.

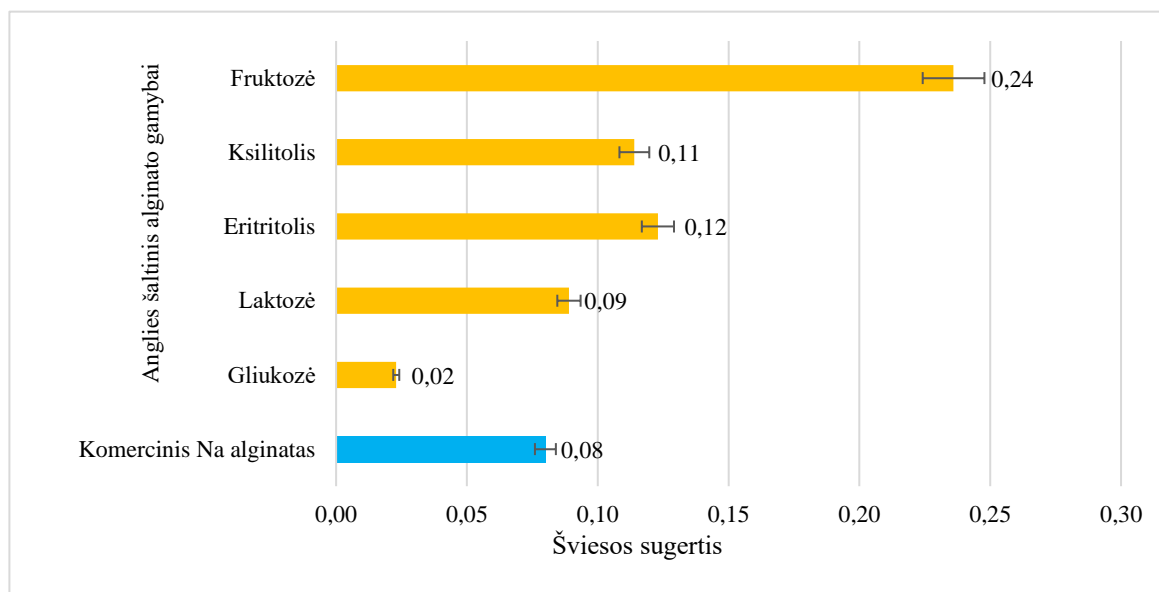
Mažiausiai redukuojančių cukrų nustatyta, kai anglies šaltiniu mitybinėje terpėje buvo naudota galaktozė. Taip pat pastebėta, kad visų tirtų mėginių cukrų koncentracijos buvo mažiausios po 72 valandų trukmės fermentacijos.

3.4. pH matavimų rezultatai

Alginato gamybai naudojant skirtingus anglies šaltinius buvo pastebėtas fermentacijos terpės pH kitimas. Mažiausios pH vertės (4,27-4,73) buvo nustatytos po 48 valandų trukmės fermentacijos, anglies šaltiniais naudojant kokosų palmių žiedų cukrų, gliukozę ir cukranendrių cukrų. Naudojant anglies šaltiniu celiuliozę, po 72 valandų fermentacijos nustatytas didžiausias pH vertės padidėjimas – 12,63. Su kitais tirtais anglies šaltiniais pH kito intervale 5,6-8,3. Padidėjus fermentacijos terpės rūgštingumui arba šarmingumui, pH vertė buvo sureguliuojama naudojant atitinkamai 1 N H₂SO₄ arba NaOH.

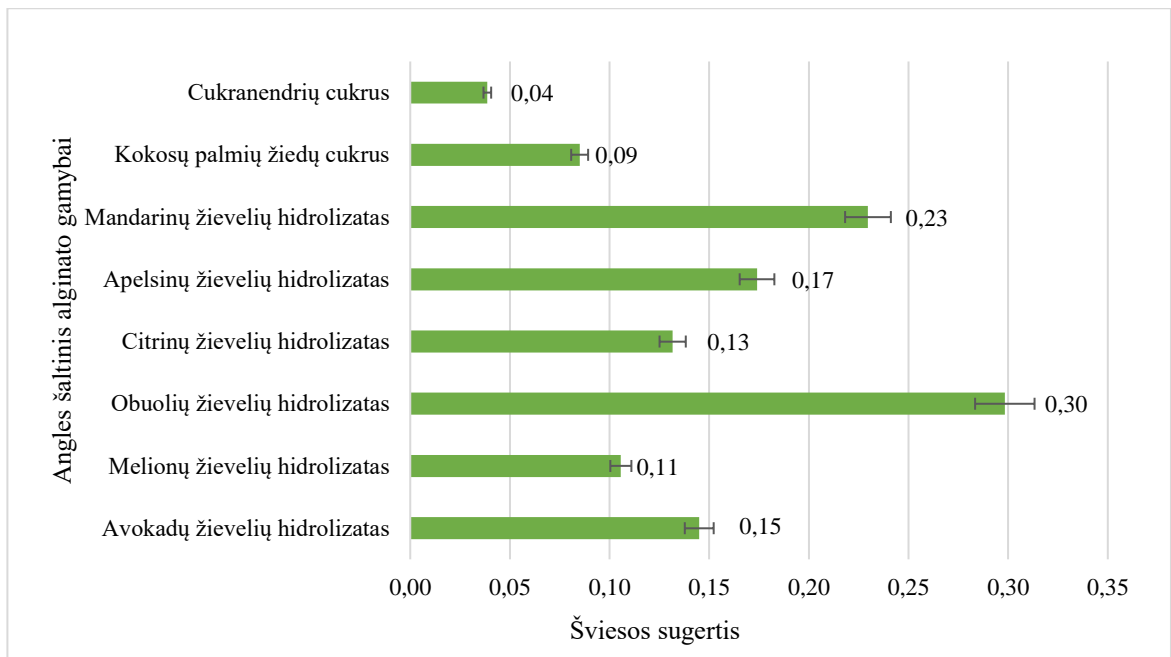
3.5. Alginatų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

3.5.1. Alginatų antioksidacinių savybių įvertinimas naudojant redukcinį metodą



3.19 pav. Anglies šaltinių įtaka alginato antioksidaciniam aktyvumui pagal redukcinį metodą

Pagal gautus rezultatus (žr. 3.19 pav.) buvo nustatyta tradicinių anglies šaltinių įtaka alginatų antioksidaciniam aktyvumui. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo alginatas, kuris buvo gautas, kai mitybinėje terpėje anglies šaltiniu naudota fruktozė (0,24 o.v.). Taip pat didesnėmis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo ir alginatai, gauti anglies šaltiniais naudojant ksilitolį (0,11 o.v.) ir laktozę (0,09 o.v.). Už komercinio natrio alginato antioksidacinį aktyvumą mažesnis buvo tik alginato, pagaminto naudojant gliukozę, kaip anglies šaltinį (0,02 o.v.).

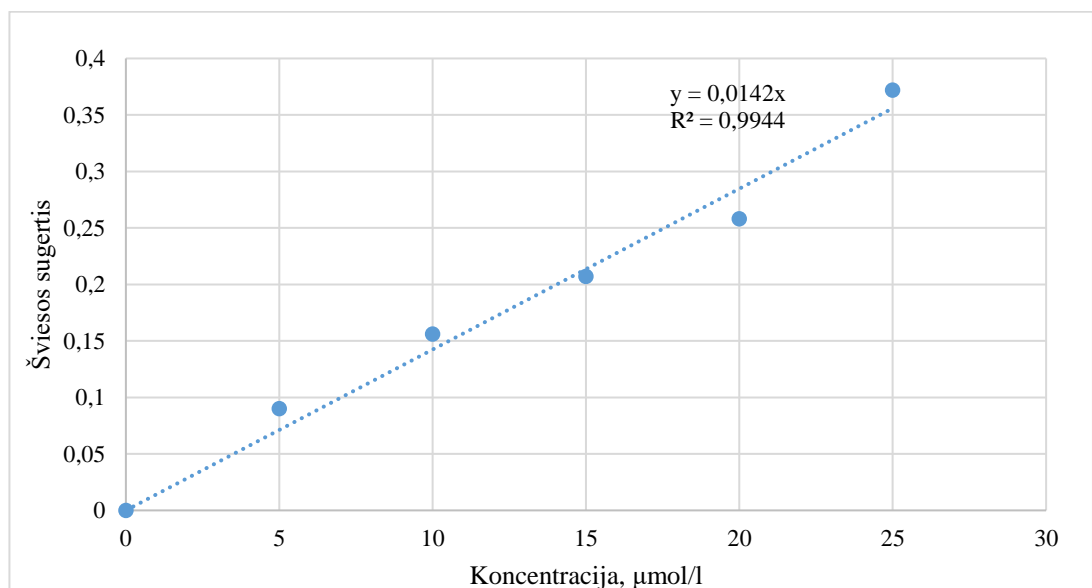


3.20 pav. Alginatų, gautų naudojant alternatyvius anglies šaltinius, antioksidacinis aktyvumas pagal redukcinį metodą

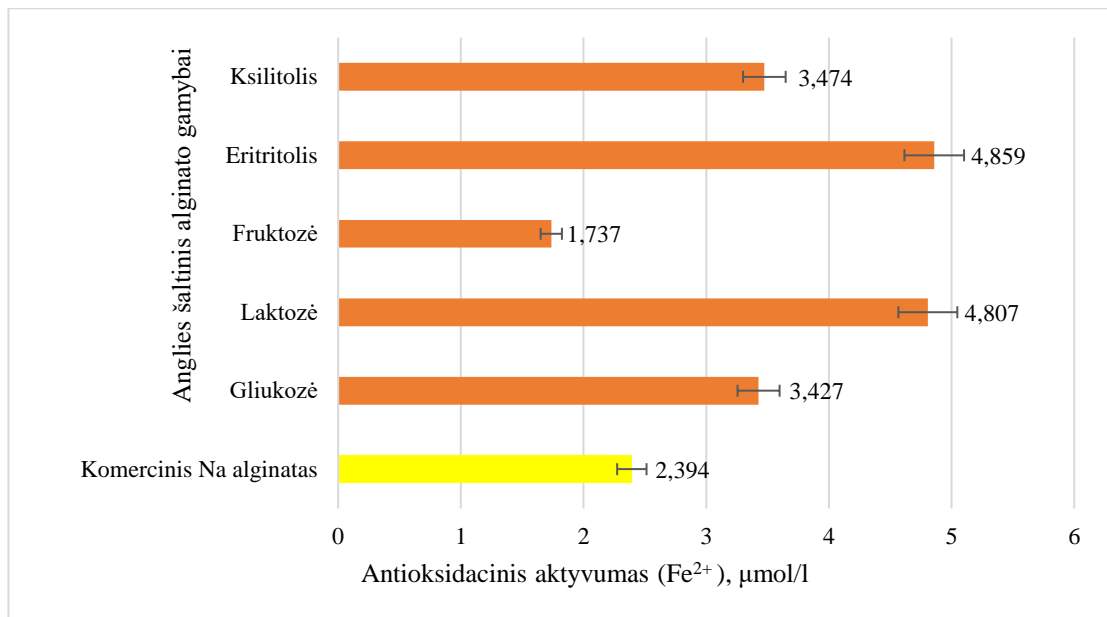
Naudojant redukcinį metodą buvo nustatyta alternatyvių anglies šaltinių įtaka alginatų antioksidaciniam aktyvumui (žr. 3.20 pav.). Gauti rezultatai parodė, kad didžiausiomis antioksidacinėmis savybėmis (0,30 o.v.) pasižymėjo alginatas, gautas naudojant anglies šaltiniu obuolių žievelių hidrolizata. Lyginant su alginatu, gautu naudojant obuolių žievelių hidrolizata, 7 kartus mažesnėmis redukuojančiomis savybėmis pasižymėjo alginatas, kai naudotas anglies šaltinis – cukranendrių cukrus (0,04 o.v.).

3.5.2. Alginatų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą

Skaičiavimų atlikimui naudota $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kalibracinė kreivė (žr. 3.21 pav.).

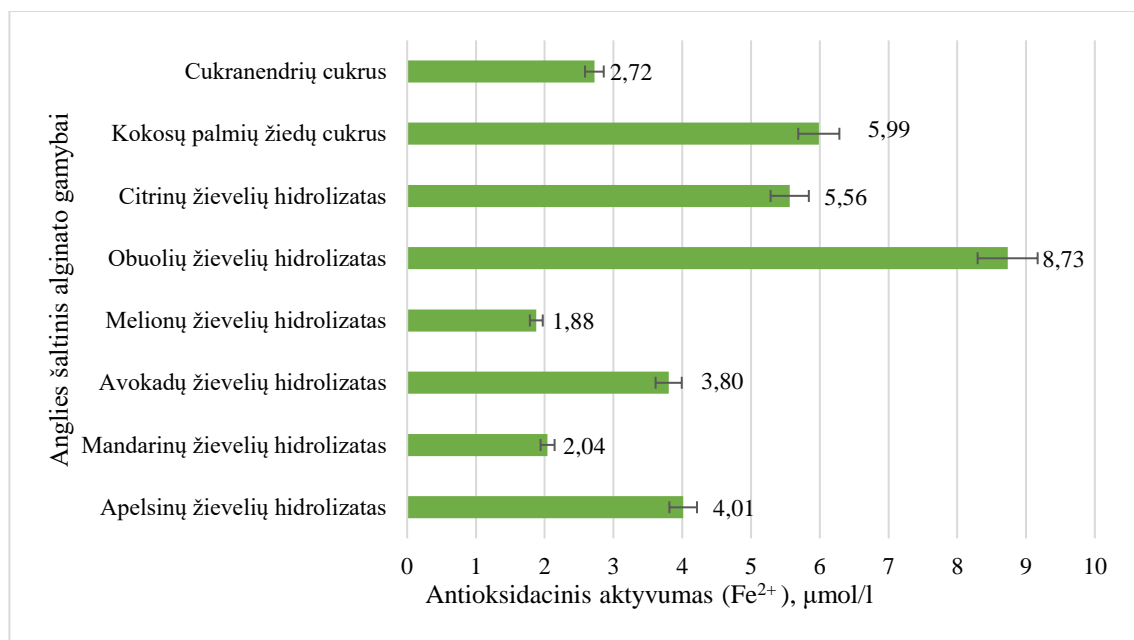


3.21 pav. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kalibracinė kreivė FRAP metodu



3.22 pav. Alginatų, gautų naudojant skirtingus anglies šaltinius, antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą

Pagal FRAP metodą (žr. 3.22 pav.) didžiausios antioksidacinės savybės buvo būdingos alginatui, gautam mitybinėje terpėje anglies šaltiniu naudojant eritritolį (4,86 μmol/l). Taip pat didesnis antioksidacinis aktyvumas nustatytas ir alginato, gauto anglies šaltiniu naudojant laktozę (4,81 μmol/l). Mažiausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo alginatas, pagamintas naudojant fruktozę (1,74 μmol/l). Palyginimui nustatytos ir komercinio natrio alginato antioksidacinės savybės, kurios, šiuo atveju, buvo didesnės tik už alginato, pagaminto naudojant anglies šaltiniu fruktozę.



3.23 pav. Alternatyvių anglies šaltinių įtaka alginatų antioksidaciniam aktyvumui pagal FRAP metodą

Iš gautų rezultatų (žr. 3.23 pav.), nustatyta, kad alginatas, kuriam pagaminti mitybinėje terpėje buvo naudotas obuolių žievelės hidrolizatas, kaip anglies šaltinis, pasižymėjo stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis (8,73 μmol/l) iš visų tirtų mėginių. Didesniu antioksidaciniu aktyvumu

(5,99 $\mu\text{mol/l}$) pasižymėjo ir alginatas, gautas naudojant kokosų palmių žiedų cukrų. Mažiausios antioksidacinės savybės (1,88 $\mu\text{mol/l}$) nustatytos alginato, kai mitybinėje terpėje anglies šaltiniu buvo naudotas melionų žievelių hidrolizatas.

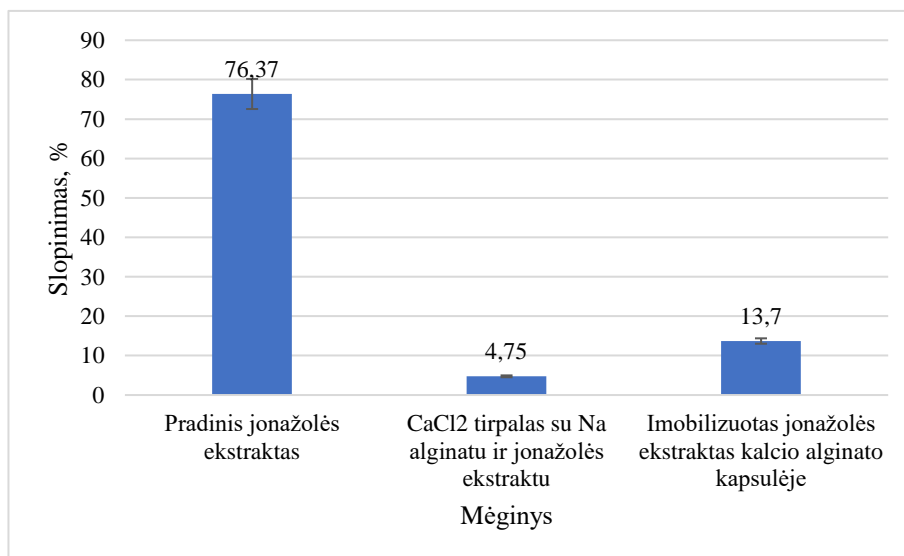
3.6. Jonažolės ekstrakto, įkapsuliuoto į kalcio alginato kapsules, antioksidacinio aktyvumo tyrimas

Po jonažolės ekstrakto įkapsuliuavimo gauti kalcio alginato geliukai (žr. 3.24 pav.) buvo skaidrūs, dideli, kai kurie netaisyklingos formos, taip pat jų viduje buvo matomas įkapsuliuotas ekstraktas.



3.24 pav. Jonažolės ekstraktas įkapsuliuotas į kalcio alginato kapsules

Siekiant nustatyti įkapsuliuavimo į kalcio alginato kapsules poveikį augalų ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui buvo ištirti pradinio jonažolės ekstrakto, CaCl_2 tirpalo su natrio alginatu ir jonažolės ekstraktu bei įkapsuliuoto į kalcio alginato kapsules jonažolės ekstrakto mėginiai.



3.25 pav. Įkapsuliuavimo įtaka jonažolės ekstrakto antioksidaciniam aktyvumui pagal DPPH metodą

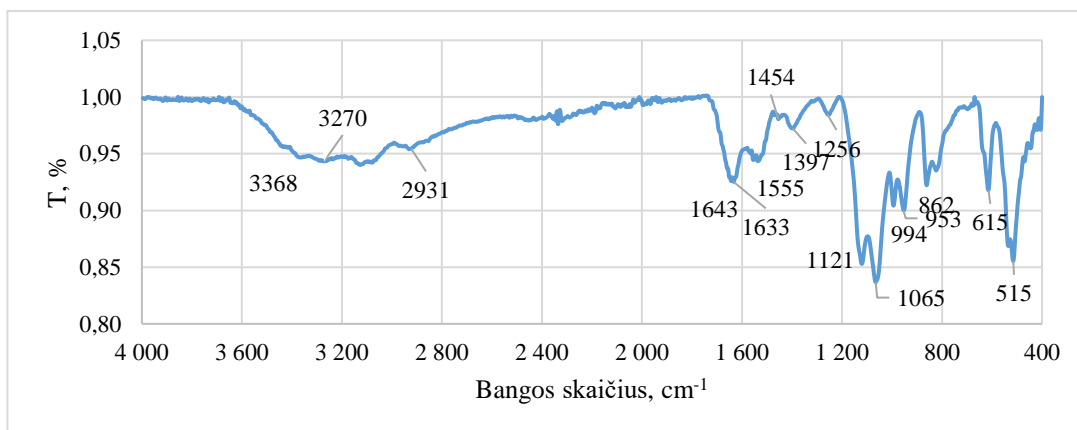
Iš gautų tyrimo rezultatų (žr. 3.25 pav.) matyti, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pagal DPPH metodą pasižymėjo pradinis, neįkapsuliuotas jonažolės ekstraktas, kurio slopinimas siekė 76,37 %. CaCl_2 tirpalas, kuriame buvo jonažolės ekstrakto ir natrio alginato pasižymėjo mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu. Įkapsuliuoto į kalcio alginato kapsules jonažolės ekstrakto antioksidacinis

aktyvumas siekė 13,7 % – tai ženkliai mažiau nei pradinio jonažolės ekstrakto. Bioaktyvumas sumažėjo galimai dėl prastos kapsulių dispersijos, kuriai įtakos galėjo turėti naudotos pipetės skersmuo, laikomos pipetės atstumas nuo kalcio chlorido tirpalo ir dėl to susidarę per dideli kalcio alginato geliukai.

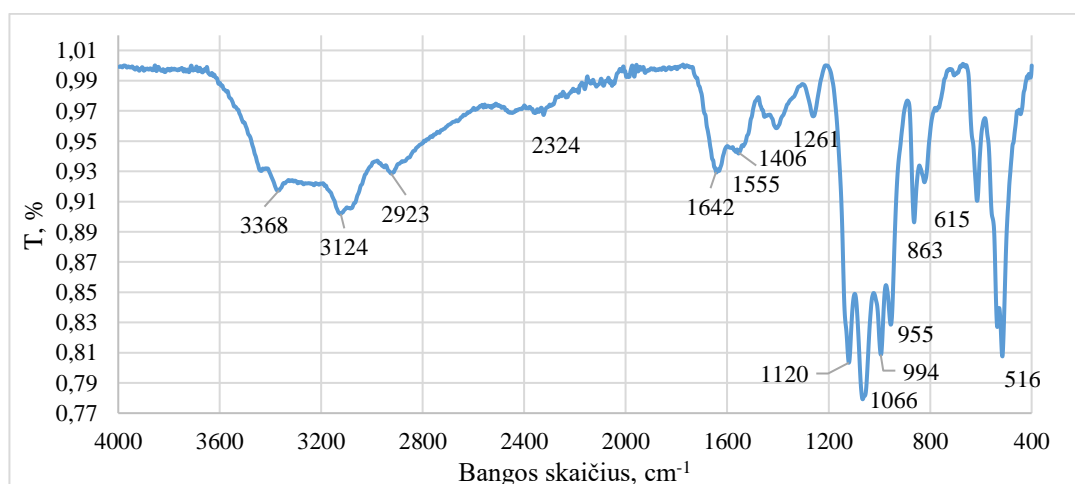
Literatūros šaltiniuose minima, kad įkapsuliavimo efektyvumui ir antioksidaciniam aktyvumui įtakos turi ne tik fizikinės, bet ir cheminės kalcio alginato granulių savybės. Vieno tyrimo metu, rezultatai parodė, kad įkapsuliuotų į kalcio alginato polimerinę matricią augalinių ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui įtakos turėjo M/G blokų santykis kalcio alginato cheminėje struktūroje – mažesnis santykis lėmė didesnę antioksidacinę aktyvumą [65].

3.7. FT–IR analizės rezultatai

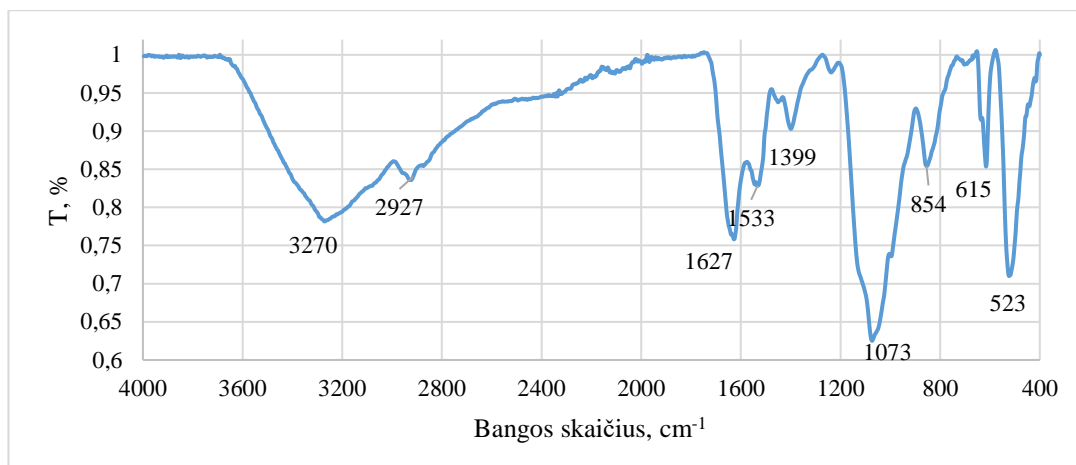
Nubraižyti alginatų, gautų iš skirtingų anglies šaltinių FT–IR spektrai siekiant nustatyti būdingas funkcines grupes struktūroje. Buvo pasirinkti keturi, didžiausios gautos koncentracijos alginato mėginiai, kai anglies šaltiniais buvo naudojamas citrinų žievelių hidrolizatas, D-manitolis, kokosų palmių žiedų cukrus, apelsinų žievelių hidrolizatas. Palyginimui užregistruotas penktasis spektras, kai anglies šaltinis buvo gliukozė.



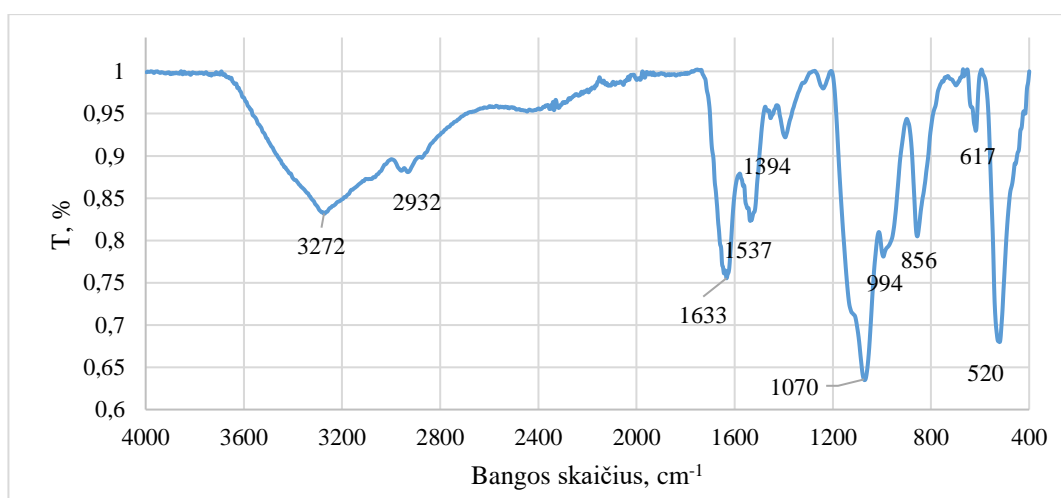
3.26 pav. Alginato, gauto anglies šaltiniu naudojant gliukozę, FT-IR spektras



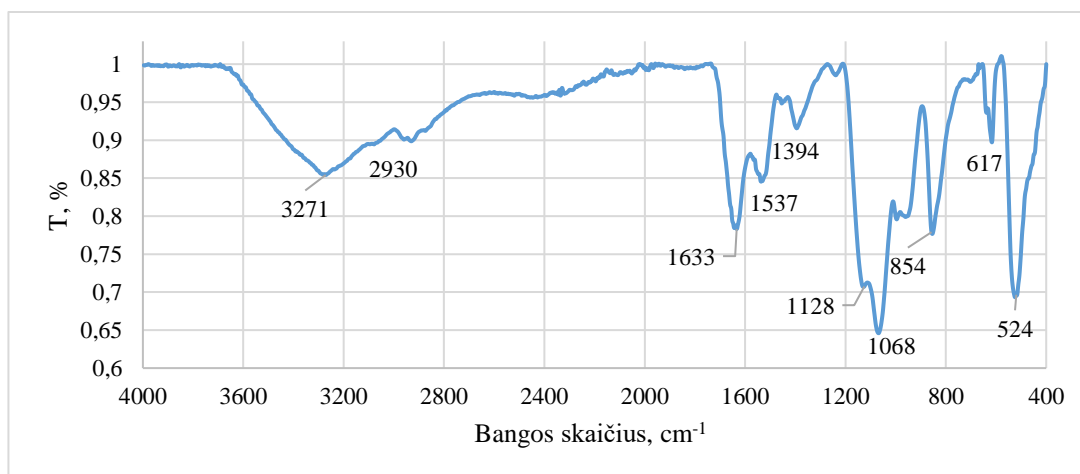
3.27 pav. Alginato, gauto anglies šaltiniu naudojant kokosų palmių žiedų cukrų, FT-IR spektras



3.28 pav. Alginato, gauto anglies šaltiniu naudojant D-manitolį, FT-IR spektras



3.29 pav. Alginato, gauto anglies šaltiniu naudojant citrinų žievelių hidrolizatą, FT-IR spektras



3.30 pav. Alginato, gauto anglies šaltiniu naudojant apelsinų žievelių hidrolizatą, FT-IR spektras

Išanalizavus alginato mėginių FT-IR spektrus nustatytos pagrindinės funkcinės grupės pateiktos 3.2 lentelėje.

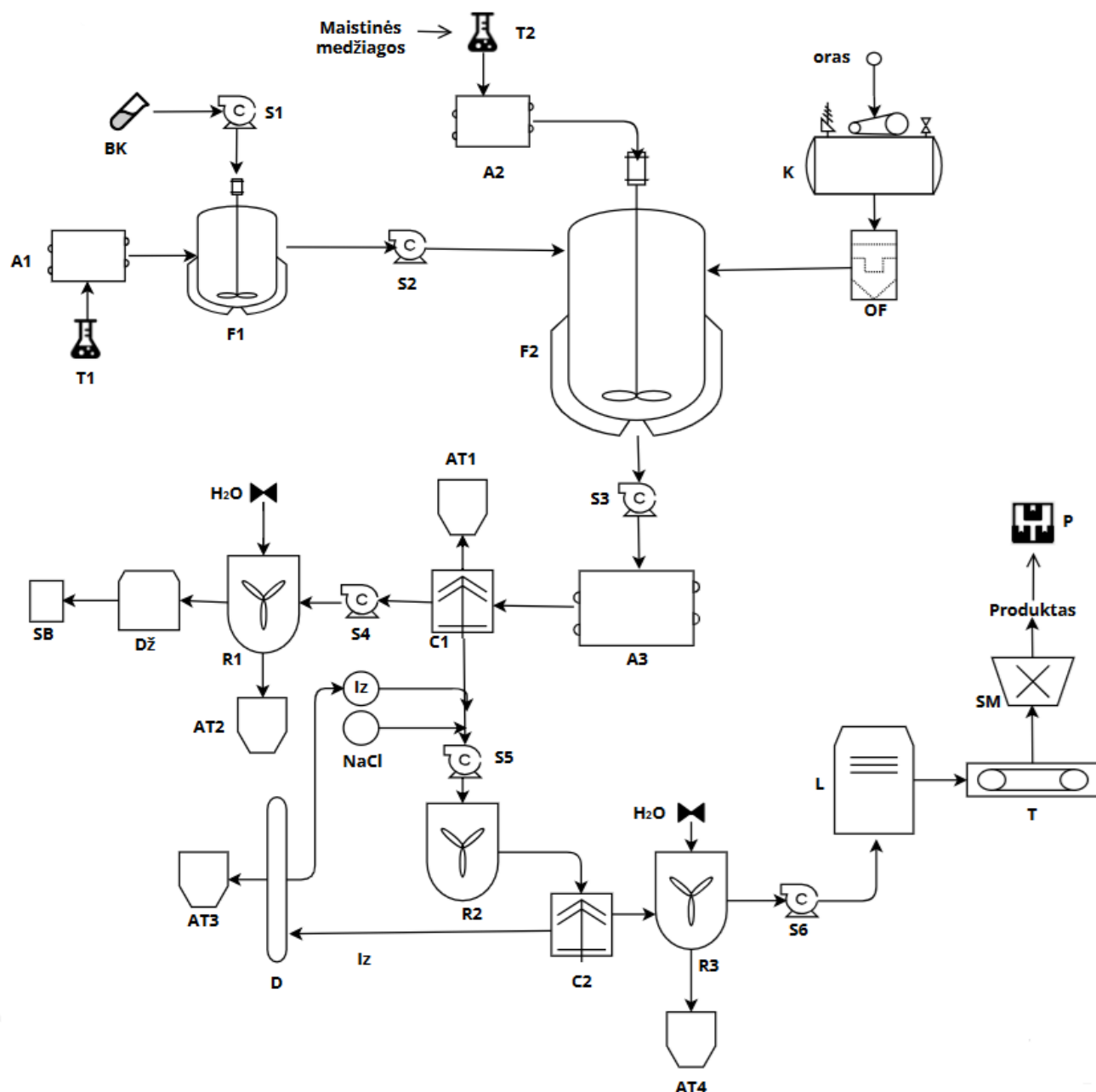
3.2 lentelė. Alginatų FT-IR spektrų analizė

Anglies šaltinis, naudotas alginato gamyboje	Bangos skaičius, cm^{-1}	Funkcinė grupė
Gliukozė	3127	O-H ryšiui būdingi virpesiai
	2931	C-H ryšiui būdingi virpesiai
	1633	O-C-O (karboksilo) ryšio virpesiai
	1121-1065	C-C-H; O-C-H ryšių virpesiai
Kokosų palmių žiedų cukrus	3124	O-H ryšio virpesiai
	2923	C-H ryšiui būdingi virpesiai
	1642	O-C-O (karboksilo) ryšio virpesiai
	1120-1066	C-C-H; O-C-H ryšio virpesiai
	955	C-O ryšio virpesiai
D-manitolis	3270	O-H ryšiui būdingi virpesiai
	2927	C-H ryšiui būdingi virpesiai
	1627	O-C-O (karboksilo) ryšio virpesiai
	1073	C-C-H; O-C-H ryšių virpesiai
Citrinų žievelių hidrolizatas	3272	O-H ryšiui būdingi virpesiai
	2932	C-H grupei būdingi virpesiai
	1633	O-C-O (karboksilo) ryšio virpesiai
	1070	C-C-H; O-C-H ryšio virpesiai
Apelsinų žievelių hidrolizatas	3271	O-H ryšio virpesiai
	2930	C-H ryšio virpesiai
	1633	O-C-O (karboksi) ryšio virpesiai
	1068	C-C-H; O-C-H ryšio virpesiai

Gauti spektrų analizės rezultatai parodė (žr. 3.2 lentelė, 3.26-3.30 pav.), kad visuose tirtų mėginių spektruose galima atpažinti alginato struktūrai būdingas tam tikras funkcines grupes. Ties bangos skaičiumi 3200 cm^{-1} stebima plati (išskyrus atvejus, kai anglies šaltiniais naudota gliukozė ir kokosų palmių žiedų cukrus) O-H ryšio virpesiams būdinga absorbcijos juosta. C-H ryšiui būdingi virpesiai visuose spektruose matomi ties $2920\text{--}2930 \text{ cm}^{-1}$ bangos skaičiumi. Taip pat, alginato struktūrai būdinga intensyvi O-C-O juosta, esanti ties $1627\text{--}1642 \text{ cm}^{-1}$. Piranozės žiede esančius ryšius C-H, C-C ir C-O galima priskirti $1120\text{--}1065 \text{ cm}^{-1}$ ribose matomose absorbcijos juostose. Anomerinėje srityje, ties 955 cm^{-1} esanti juosta, kai anglies šaltiniu buvo naudotas manitolis, galėtų būti priskirta urono rūgšties liekanos C-O ryšiui. Visuose spektruose stebimos absorbcijos juostos $854\text{--}863 \text{ cm}^{-1}$ ribose būdingos β -manurono rūgšties $\text{C}_1\text{-H}$ jungčiai [66]. Spektrų absorbcijos juostų atitikimas buvo palygintas su komercinio natrio alginato FT-IR spektru (žr. 1 priedą).

4. Rekomendacijų dalis

Pagal atliktų tyrimų rezultatus rekomenduojama alginato gamybos iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų optimizavimui naudoti alternatyvų anglies šaltinį – citrinų žievelių hidrolizatą. Tyrimų metu naudojant šį anglies šaltinį buvo nustatyta didžiausia alginato koncentracija jau pirmąją fermentacijos dieną. Alginato gamybos proceso efektyvumui didinti, rekomenduojama toliau tęsti tyrimus, įvertinant ir kitų veiksnių įtaką: pH, temperatūros, tirpiklio, azoto šaltinio, druskų koncentracijų. Taip pat siūloma alginato gamybą fermentacijos būdu atlikti nurodytomis sąlygomis pagal pateiktą aparatūrinę schemą (žr. 4.1 pav.).



4.1 pav. Alginato gamybos iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų aparatūrinė schema

4.1 lentelė. Aparatūrinės schemos žymėjimas

Žymėjimas	Reikšmė
BK	<i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijų kultūra
S1, S2, S3, S4, S5, S6	Išcentrinis siurblys
T1	Bakterijų kultivavimo terpė
T2	Produkcijos terpė
A1, A2, A3	Autoklavas
K	Oro kompresorius
OF	Oro filtras
F1, F2	Fermentatorius su maišykle
C1, C2	Centrifuga
R1, R2, R3	Maišymo rezervuaras
p	Peristaltinis siurblys
AT1, AT2, AT3, AT4	Atliekų konteineris
Dž	Džiovykla
SB	Sausa bakterijų biomasė
H ₂ O	Vanduo
NaCl	Natrio chloridas
Iz	Izopropanolis
L	Liofilizatorius
T	Juostinis transporteris
SM	Malūninis smulkintuvas
P	Supakuotas produktas

Į nuolat maišomą fermentorių (F1) iš autoklavo (A1) išcentrinis siurblys (S1) transportuojama sterili kultivavimo terpė (T1) ir atgaivintos, skystos būsenos *Azotobacter vinelandii* bakterijos (BK). Fermentoriuje (F1) bakterijos auginamos 24 valandas, palaikant 28-30 °C temperatūrą ir 7,2 pH, kuris kontroliuojamas peristaltiniu siurbliu (p) naudojant 2N NaOH tirpalą. Gautas inokuliatas siurbliu (S2) tiekiamas į antrąjį, didesnio darbinio tūrio fermentorių (F2), kur taip pat tiekama ir sterili produkcijos terpė (T2), sudaryta iš anglies (citrinų žievelių hidrolizato) ir azoto šaltinio (mielių ekstrakto), makroelemento (Na₂HPO₄), mikroelemento (MgSO₄) ir mineralo ((NH₄)₂SO₄). Aerobinėms *Azotobacter vinelandii* bakterijoms augti taip pat reikalingas ir deguonis, todėl į fermentorių (F2) tiekiamas kompresoriuje (K) suspaustas ir oro filtre (OF) išvalytas oras. Fermentacijos procesą patariama vykdyti 28 °C temperatūroje, 400 rpm maišymo greičiu, 72 valandas. Pasibaigus fermentacijai gautas mišinys sterilizuojamas autoklave (A3) 121 °C temperatūroje, po to nukreipiamas į centrifuga (C1), kurioje atskiriama skystoji ir kietoji fazės. Po centrifugavimo gautos bakterijų biomasės nuosėdos siurbliu (S4) tiekiamos į maišymo rezervuarą (R1) kur yra plaunamos vandeniui. Iš rezervuaro (R1) drėgnos biomasės nuosėdos perkeliama į džiovinimo kamerą, kur palaikoma 50 °C temperatūra, o vanduo su priemaišomis išleidžiamas į atliekas (AT1). Sausa bakterijų biomasė gali būti naudojama tolimesniems tyrimams. Alginato nusodinimui supernatantas iš centrifugos (C1) išcentrinis siurblys (S5) transportuojamas į kitą rezervuarą su maišykle (R2), kur taip pat yra tiekiamas natrio chloridas (NaCl) bei iš distiliavimo

kolonos (D) išeinantis izopropanolis (Iz). Susidariusioms alginato nuosėdoms atskirti mišinys tiekiamas į centrifugą (C2), iš kurios izopropanolis regeneravimui gražinamas į distiliavimo koloną (D), o natrio alginato nuosėdos transportuojamos į maišymo rezervuarą (R3), kur yra plaunamos vandeniu. Alginato nuosėdos perkeliamos džiovinimui į liofilizatorių (L), iš kurio gauti kristalai smulkinimui juostiniu transporteriu (T) tiekiami į malūninį smulkintuvą (SM). Gauti alginato milteliai supakuojami pakavimo įrenginyje (P).

Išvados

1. Biotechnologinė alginato gamyba iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų buvo optimizuota anglies šaltiniu mitybinėje terpėje naudojant alternatyvų anglies šaltinį – citrinų žievelių hidrolizatą. Didžiausia alginato koncentracija (1,51 g/l) buvo gauta jau pirmąją fermentacijos dieną.
2. Ištirta skirtingų anglies šaltinių įtaka bakterijų biomasės augimui ir alginato koncentracijai. Gauti rezultatai parodė, kad, lyginant su gliukozės naudojimu, didžiausią įtaką bakterijų biomasės koncentracijos didėjimui turėjo šie anglies šaltiniai: kokosų palmių žiedų cukrus (2,47 g/l), D-sorbitolis (0,71 g/l), laktozė (0,52 g/l), kai rezultatai gauti po 48 valandų fermentacijos. Atlikus tyrimus su skirtingais anglies šaltiniais buvo gauta, kad didžiausios pagamintų alginatų koncentracijos nustatytos anglies šaltiniais mitybinėje terpėje naudojant D-manitolį (1,60 g/l), citrinų žievelių hidrolizatą (1,51 g/l) ir ksilitolį (1,47 g/l).
3. Fermentacijos trukmės įtaka alginato gamybai parodė, kad didesnės alginato koncentracijos su vienais anglies šaltiniais buvo pagamintos po 24 valandų, o su kitais po 72 valandų trukmės fermentacijos. Tačiau norint sumažinti gamybos proceso sąnaudas tikslinga būtų rinktis trumpesnę fermentacijos trukmę – 24 valandas.
4. *Azotobacter vinelandii* bakterijų pagamintų alginatų antioksidacinio aktyvumo priklausomybės nuo anglies šaltinio rezultatai parodė, kad pagal geležies redukcijos antioksidacinę galią, didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo alginatas, pagamintas naudojant anglies šaltiniu obuolių žievelių hidrolizatą (8,73 $\mu\text{mol/l}$), o mažiausiu, kai anglies šaltiniu naudota fruktozė – 1,74 $\mu\text{mol/l}$. Redukciniu metodu gautais rezultatais nustatyta, kad didžiausiomis antioksidacinėmis savybėmis taip pat pasižymėjo alginatas, kai mitybinėje terpėje anglies šaltiniu buvo naudotas obuolių žievelių hidrolizatas (0,30 o.v.), o mažiausiomis – anglies šaltiniu naudojant gliukozę (0,02 o.v.).
5. Pagamintų alginatų struktūrai identifikuoti nubraižyti Furjė transformacijos infraraudonosios spinduliuotės spektrai, kurie buvo palyginti su komercinio natrio alginato spektru. Gautuose spektruose matomos absorbcijos juostos sutapo su komercinio alginato spektru esančiomis juostomis ir buvo priskirtos pagrindinėms funkcinėms grupėms, būdingoms alginato cheminei struktūrai. Visuose spektruose identifikuoti O-H, O-C-O, C-H, C-O ryšiams būdingi virpesiai.

Literatūros sąrašas

1. KUMAR NADDA, A., et al., eds. Biopolymers. Recent Updates, Challenges and Opportunities [interaktyvus]. 1st ed. Cham: Springer, 2022 [žiūrėta 2023-10-09]. ISBN 9783030983925. Prieiga per doi: 10.1007/978-3-030-98392-5.
2. BALART, R., et al. Biopolymers from Natural Resources. *Polymers* [interaktyvus]. 2021, 13(15), 2532 [žiūrėta 2023-10-09]. Prieiga per doi: 10.3390/polym13152532.
3. NORDGARD, C. T. and INGAR DRAGET, K., ed. Handbook of Hydrocolloids: Alginates [interaktyvus]. 4th ed. Woodhead publishing, 2021, p. 805-829 [žiūrėta 2023-10-11]. ISBN 9780128201046. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-820104-6.00007-3.
4. ZHANG, H., et al. Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine. *Marine drugs* [interaktyvus]. 2021, 19(5):264 [žiūrėta 2023-10-11]. Prieiga per doi: 10.3390/md19050264.
5. LIANG, Y., et al. Algal Biorefineries. *Industrial Biorefineries&White Biotechnology* [interaktyvus]. 2015, p. 35-90 [žiūrėta 2023-11-14]. ISBN 9780444634535. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-444-63453-5.00002-1.
6. ABKA-KHAJOU EI, R., et al. Structure, Properties and Applications of Alginates. *Marine drugs* [interaktyvus]. 2022, 20(6), 364 [žiūrėta 2023-11-14]. ISSN 1660-3397. Prieiga per doi: 10.3390/md20060364
7. BENNACEF, C., et al. Influence of Alginate Properties and Calcium Chloride Concentration on Alginate Bead Reticulation and Size: A Phenomenological Approach. *Polymers* [interaktyvus]. 2023, 15(20):4163 [žiūrėta 2023-11-17]. ISSN 2073-4360. Prieiga per doi: 10.3390/polym15204163
8. USAMAN, A., et al. Algal Polysaccharides, Novel Application, and Outlook. *Algae Based Polymers, Blends, and Composites* [interaktyvus]. Elsevier, 2017, p. 115-153 [žiūrėta 2023-11-17]. ISBN 978012812360. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-812360-7.00005-7
9. YARKENT, C., et al. Algal Alginate in Biotechnology: Biosynthesis and Applications. *Properties and Applications of Alginates* [interaktyvus]. 2021, p. 174 [žiūrėta 2023-11-17]. ISBN 9781839695018. Prieiga per doi: 10.5772/intechopen.101407
10. BOJORGES, H., et al. Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties. *Trends in Food Science&Technology* [interaktyvus]. 2023, 140, 104142 [žiūrėta 2023-12-12]. ISSN 0924-2244. Prieiga per doi: 10.1016/j.tifs.2023.104142
11. KAUR, N., and DEY, P. Bacterial exopolysaccharides as emerging bioactive macromolecules: from fundamental to applications. *Research in Microbiology* [interaktyvus]. 2023, 174(4), 104024 [žiūrėta 2023-12-12]. ISSN 0923-2508. Prieiga per doi: 10.1016/j.resmic.2022.104024
12. ERTESVAG, H. Alginate-modifying enzymes: Biological roles and biotechnological uses. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2015, 6(523) [žiūrėta 2023-12-15]. Prieiga per doi: 10.3389/fmicb.2015.00523
13. NETRUSOV, A. I., et al. Exopolysaccharides Producing Bacteria: A Review. *Microorganisms* [interaktyvus]. 2023, 11(6):1541 [žiūrėta 2023-12-15]. ISSN 2076-2607. Prieiga per doi: 10.3390/microorganisms11061541
14. DUDUN, A. A., et al. Competitive Biosynthesis of Bacterial Alginate Using *Azotobacter vinelandii* 12 for Tissue Engineering Applications. *Polymers* [interaktyvus]. 2022, 14(1):131 [žiūrėta 2023-12-16]. ISSN 2073-4360. Prieiga per doi: 10.3390/polym14010131

15. SUMBUL, A., et al. Azotobacter: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi Journal of Biological Sciences* [interaktyvus]. 2020, 27(12), p. 3634-3640 [žiūrėta 2023-12-16]. ISSN 1319-562X. Prieiga per doi: 10.1016/j.sjbs.2020.08.004
16. NUNEZ, C., et al. Genetic Regulation of Alginate Production in *Azotobacter vinelandii* a Bacterium of Biotechnological Interest: A Mini-Review. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2022, 13:845473 [žiūrėta 2023-12-16]. Prieiga per doi: 10.3389/fmicb.2022.845473
17. OLIVEIRA, J. M., RADHOUANI, H., REIS, L. R. eds. Polysaccharides of Microbial Origin. Biomedical applications [interaktyvus]. 2022, 1st ed [žiūrėta 2023-12-17]. ISBN 9783030422158. Prieiga per doi: 10.1007/978-3-030-42215-8
18. PACHECO-LEYVA, I., et al. Alginate Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*: Overview of Molecular Mechanisms in Connection with Oxygen Availability. *International Journal of Polymer Science* [interaktyvus]. 2016, p. 1-12 [žiūrėta 2023-12-18]. Prieiga per doi: [10.1155/2016/2062360](https://doi.org/10.1155/2016/2062360)
19. HAY, D. I., et al. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology* [interaktyvus]. 2013, 6(6), p. 637-650 [žiūrėta 2023-12-18]. Prieiga per doi: doi.org/10.1111/1751-7915.12076
20. HASNAIN, M. S., et al. Alginates: sources, structure, and properties. *Alginates in Drug Delivery* [interaktyvus]. Academic Press, 2020, p. 1-17 [žiūrėta 2023-12-19]. ISBN 9780128176405. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-817640-5.00001-7
21. HAFSA, P. V., Alginates in drug delivery systems. *Natural Biopolymers in Drug Delivery and Tissue Engineering* [interaktyvus]. Woodhead Publishing, 2023, p. 25-55 [žiūrėta 2024-01-09]. ISBN 9780323988278. Prieiga per doi: 10.1016/C2021-0-01130-5
22. NORDGARD, C. T. and INGAR DRAGET, K. Alginates. *Handbook of hydrocolloids* [interaktyvus]. Third edition, Woodhead Publishing, 2021, p. 805-829 [žiūrėta 2024-01-09]. ISBN 9780128201046. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-820104-6.00007-3
23. RODRIGUEZ-ARGUELLES, M. C. and SIMON-VAZQUEZ, R. Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine. *Marine drugs* [interaktyvus]. 2021, 19(5):264 [žiūrėta 2024-01-10]. ISSN 1660-3397. Prieiga per doi: 10.3390/md19050264
24. ROSIAK, P., et al. Modification of Alginates to Modulate Their Physic-Chemical Properties and Obtain Biomaterials with Different Functional Properties. *Molecules* [interaktyvus]. 2021, 26(23):7264 [žiūrėta 2024-01-10]. ISSN 1420-3049. Prieiga per doi: 10.3390/molecules26237264
25. NATARAJ, D. and REDDY, N. Chemical modifications of alginate and its derivatives. *International Journal of Chemistry Research* [interaktyvus]. 2020, 4(1) [žiūrėta 2024-01-11]. ISSN 0976-5689. Prieiga per doi: 10.22159/ijcr.2020v4i1.98
26. PUTRI, A. P., et al. Alginate Modification and Lectin-Conjugation Approach to Synthesize the Mucoadhesive Matrix. *Applied Sciences* [interaktyvus]. 2021, 11(24), 11818 [žiūrėta 2024-01-12]. ISSN 2076-3417. Prieiga per doi: 10.3390/app112411818
27. XING, M., et al. Advances in Research on the Bioactivity of Alginate Oligosaccharides. *Marine Drugs* [interaktyvus]. 2020, 18(3):144 [žiūrėta 2024-02-12]. ISSN 1660-3397. Prieiga per doi: 10.3390/md18030144
28. GUO, X., et al. Structures, properties and application of alginic acid: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [interaktyvus]. 2020, 162, p. 618-628 [žiūrėta 2024-02-12]. ISSN 0141-8130. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.180

29. HOAN, N. X., et al. Antioxidant Activities, Anticancer Activity, Physico-Chemistry Characteristic, and Acute Toxicity of Alginate/Lignin Polymer. *Molecules* [interaktyvus]. 2023, 28(13):5181, [žiūrėta 2024-02-23]. ISSN 1420-3049. Prieiga per doi: 10.3390/molecules28135181
30. ASADPOOR, M., et al. Antimicrobial Activities of Alginate and Chitosan Oligosaccharides Against Staphylococcus aureus and Group B Streptococcus. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2021, 12:700605 [žiūrėta 2024-02-23]. Prieiga per doi: 10.3389/fmicb.2021.700605
31. HURTADO, A., et al. Alginate: Enhancement Strategies for Advanced Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2022, 23(9):4486 [žiūrėta 2024-02-25]. ISSN 1422-0067. Prieiga per doi: 10.3390/ijms23094486
32. GARCIA, A., et al. Metabolic flux analysis and the NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratios in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories* [interaktyvus]. 2018, 17(10) [žiūrėta 2024-02-25]. ISSN 1475-2859. Prieiga per doi: 10.1186/s12934-018-0860-8
33. SAEED, S., et al. Bioconversion of agricultural by-products to alginate by *Azotobacter vinelandii* physico-chemical optimization for hyper-production. *The Journal of Animal & Plant Sciences* [interaktyvus]. 2016, 26(5), p. 1516-1521 [žiūrėta 2024-02-26]. ISSN 1018-7081. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/310489142_Bioconversion_of_agricultural_by-products_to_alginate_by_Azotobacter_vinelandii_and_physicochemical_optimization_for_hyper-production
34. WANG, J., et al. Alginate: Microbial production, functionalization, and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [interaktyvus]. 2023, 242(3), 125048 [žiūrėta 2024-02-27]. ISSN 0141-8130. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125048
35. REVIN, V. V., Effect of Nutrient Sources on the Alginate Accumulation in the Culture Liquid of *Azotobacter vinelandii* D-05 and Obtaining Biocomposite Materials. *Brazilian archives of biology and technology* [interaktyvus]. 2018, 61 [žiūrėta 2024-03-02]. ISSN 1678-4324. Prieiga per doi: 10.1590/1678-4324-2018160406
36. SAEED, S., MEHMOOD, T., IRFAN, M. Statistical optimization of cultural parameters for the optimized production of alginic acid using apple (*Malus domestica*) peels through solid-state fermentation. *Biomass and Biorefinery* [interaktyvus]. 2020, 13, p. 1269-1277 [žiūrėta 2024-03-02]. Prieiga per doi: 10.1007/s13399-020-01143-9
37. MORAL, C. K. and YILDIZ, M. Alginate production from Alternative Carbon Sources and Use of Polymer Based Adsorbent in Heavy Metal Removal. *International Journal of Polymer Science* [interaktyvus]. 2016, [žiūrėta 2024-03-04]. Prieiga per doi: 10.1155/2016/7109825
38. HENDAWY, W., et al. Optimization the alginate production conditions in sweet whey medium by *azotobacter chroococcum*. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences* [interaktyvus]. 2019, 27(1), p. 479-489 [žiūrėta 2024-03-06]. Prieiga per doi: 10.21608/ajs.2019.43586
39. YOSHIDA, N., et al. Direct production of polyhydroxybutyrate and alginate from crude glycerol by *Azotobacter vinelandii* using atmospheric nitrogen. *Scientific reports* [interaktyvus]. 2022, 12:8032 [žiūrėta 2024-03-06]. ISSN 2045-2322. Prieiga per doi: 10.1038/s41598-022-11728-1
40. LETOCHA, A., MIASTKOWSKA, M., SIKORA, E. Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Polymers*

- [interaktyvus]. 2022, 14(18), 3834 [žiūrėta 2024-03-07]. ISSN 2073-4360. Prieiga per doi: 10.3390/polym14183834
41. YANG, J., et al. Characterization of a novel PL 17 family alginate lyase with exolytic and endolytic cleavage activity from marine bacterium *Microbulbifer* sp. SH-1. *International Journal of Biological Macromolecules* [interaktyvus]. 2021, 169, p. 551-563 [žiūrėta 2024-03-07]. ISSN 0141-8130. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.196
 42. AKBAR, M., YAQOUB, A., AHMAD, A., et al., eds. Sodium alginate: an overview. *Sodium Alginate-Based Nanomaterials for Wastewater Treatment* [interaktyvus]. Elsevier, 2023, p. 1-17 [žiūrėta 2024-03-09]. ISBN 9780128235515. Prieiga per doi: 10.1016/C2019-0-05102-3
 43. ADAMIAK, K., and SIONKOWSKA, A. State of Innovation in Alginate-Based Materials. *Marine Drugs* [interaktyvus]. 2023, 21(6), 353 [žiūrėta 2024-03-09]. ISSN 1660-3397. Prieiga per doi: 10.3390/md21060353
 44. PUSCASELU, R. G., et al. Alginate: From Food Industry to Biomedical Applications and Management of Metabolic Disorders. *Polymers* [interaktyvus]. 2020, 12(10), 2417 [žiūrėta 2024-03-09]. ISSN 2073-4360. Prieiga per doi: 10.3390/polym12102417
 45. RAUS, R. A., et al. Alginate and alginate composites for biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2021, 16(3), p. 280-306 [žiūrėta 2024-03-10]. ISSN 1818-0876. Prieiga per doi: 10.1016/j.ajps.2020.10.001
 46. GAO, Q., KIM, B. S., GAO, G. Advanced Strategies for 3D Bioprinting of Tissue and Organ Analogs Using Alginate Hydrogel Bioinks. *Marine Drugs* [interaktyvus]. 2021, 19(12), 708 [žiūrėta 2024-03-10]. ISSN 1660-3397. Prieiga per doi: 10.3390/md19120708
 47. DIAZ-TORRES, R.D.C., et al. Bioactive compounds obtained from plants, their pharmacological applications and encapsulation. *Phytomedicine*. [interaktyvus]. Academic Press, 2021, p. 181-205 [žiūrėta 2024-03-11]. ISBN 9780128241097. Prieiga per doi: 10.1016/C2020-0-00347-6
 48. LAI, J., et al. Alginate-Based Encapsulation Fabrication Technique for Drug Delivery: An Updated Review of Particle Type, Formulation Technique, Pharmaceutical Ingredient, and Targeted Delivery System. *Pharmaceutics* [interaktyvus]. 2024, 16(3), 370 [žiūrėta 2024-03-15]. ISSN 1999-4923. Prieiga per doi: 10.3390/pharmaceutics16030370
 49. MUTLU, B., ERCI, F., KOC, R. C. Production of alginate films containing *Hypericum perforatum* extract as an antibacterial and antioxidant wound dressing material. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* [interaktyvus]. 2022, 37(2), p. 134-148 [žiūrėta 2024-03-15]. Prieiga per doi: 10.1177/08839115211073155
 50. BI, D., et al. Potential Food and Nutraceutical Applications of Alginate: A Review. *Marine Drugs* [interaktyvus]. 2022, 20(9), 564 [žiūrėta 2024-03-18]. ISSN 1660-3397. Prieiga per doi: 10.3390/md20090564
 51. QIN, Y., et al. Applications of Alginate as a Functional Food Ingredient. *Biopolymers for Food Design* [interaktyvus]. Academic Press, 2018, p. 409-429 [žiūrėta 2024-03-18]. ISBN 9780128114490. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-811449-0.00013-X
 52. KHAN, S. and KHAN, M. Applications of Sodium Alginate in Science. *Sodium Alginate-Based Nanomaterials for Wastewater Treatment* [interaktyvus]. Elsevier, 2023, p. 161-182. [žiūrėta 2024-03-20]. ISBN 9780128235515. Prieiga per doi: 10.1016/C2019-0-05102-3
 53. CHEN, Z., WEI, W., NI, B. J. Algae-based alginate biomaterial: Production and applications. *Biomass, Biofuels, and Biochemicals* [interaktyvus]. 2022, p. 37-66 [žiūrėta 2024-03-20]. ISBN 9780323961424. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-323-96142-4.00004-X

54. SHARMA, V., et al. Alginate-based bionanocomposites in dental applications. *Bionanocomposites in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [interaktyvus]. Woodhead Publishing, 2021, p. 309-326 [žiūrėta 2024-03-20]. ISBN 9780128212806. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-821280-6.00011-8
55. FEATHERSTONE, S. Ingredients used in the preparation of canned foods. *A Complete Course in Canning and Related Processes* [interaktyvus]. Woodhead Publishing, 14 th. edts. 2015, p. 147-211 [žiūrėta 2024-03-21]. ISBN 9780857096784. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-85709-678-4.00008-7
56. LEVANTOVSKY, R., ALLEN-BLEVINS, C. R., SELA, D. A. Nutritional Requirements of Bifidobacteria. *The Bifidobacteria and Related Organisms* [interaktyvus]. Academic Press, 2018, p. 115-129 [žiūrėta 2024-03-21]. ISBN 9780128050606. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-805060-6.00006-5
57. STYLIANOPOULOU, C. Carbohydrates: Chemistry and classification. *Encyclopedia of Human Nutrition* [interaktyvus]. Elsevier, 2023, p. 114-125 [žiūrėta 2024-03-23]. ISBN 9780323908160. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-821848-8.00172-4
58. WRAGE, J., et al. Coconut sugar (*Cocos nucifera* L.): Production process, chemical characterization, and sensory properties. *LWT* [interaktyvus]. 2019, 112, 108227 [žiūrėta 2024-03-23]. ISSN 0023-6438. Prieiga per doi: 10.1016/j.lwt.2019.05.125
59. CIFUENTES, J., et al. Antioxidant and Neuroprotective Properties of Non-Centrifugal Cane Sugar and Other Sugarcane Derivatives in and In Vitro Induced Parkinson's Model. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2021, 10(7), 1040 [žiūrėta 2024-03-26]. ISSN 2076-3921. Prieiga per: 10.3390/antiox10071040
60. FANYIN-MARTIN, A., et al. Modeling optimization of reducing sugar concentration of SternEnzym hydrolyzed fruit peels via response surface methodology. *Scientific African* [interaktyvus]. 2023, 20, e01741 [žiūrėta 2024-03-26]. ISSN 2468-2276. Prieiga per doi: 10.1016/j.sciaf.2023.e0174
61. Reviving Freeze-Dried Microorganisms. *Instructional Guide* [interaktyvus]. American Type Culture Collection, 2014 [žiūrėta 2024-03-26]. Prieiga per: RevivingFreeze-DriedMicroorganismsATCC
62. MURAKAMI, K. and YOSHINO, M. Prooxidant of aminophenol compounds: copper-dependent generation of reactive oxygen species. *BioMetals* [interaktyvus]. 2022, 35(2), p. 329-334 [žiūrėta 2024-03-26]. Prieiga per doi: 10.1007/s10534-022-00367-8
63. SANTOS, C. M. M. and SILVA, A. M. S. The Antioxidant activity of Prenylflavonoids. *Molecules* [interaktyvus]. 2020, 25(3), 696 [žiūrėta 2024-03-28]. ISSN 1420-3049. Prieiga per doi: 10.3390/molecules25030696
64. GAO, H., KHERA, E. LEE, J. K. Immobilization of Multi-biocatalysts in Alginate Beads for Cofactor Regeneration and Improved Reusability. *Journal of Visualized Experiments* [interaktyvus]. 2016, 110 [žiūrėta 2024-03-28]. Prieiga per doi: 10.3791/53944
65. DOBROSLAVIC, E., ZORIC, Z., DRAGOVIC-UZELAC, V. and et al. Microencapsulation of *Laurus nobilis* L. Leaf Extract in Alginate-Based via Electrostatic Extrusion. *Foods* [interaktyvus]. 2023, 12(17), 3242 [žiūrėta 2024-04-20]. ISSN 2304-8158. Prieiga per doi: 10.3390/foods12173242
66. FERTAH, M., BELFKIRA, A., DAHMANE, E. M. and et al. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *Arabian Journal of Chemistry* [interaktyvus]. 2017, p. S3707-S3714 [žiūrėta 2024-04-19]. ISSN 1878-5352. Prieiga per doi: 10.1016/j.arabjc.2014.05.003

Publikacijų sąrašas

Šio projekto tyrimų rezultatai buvo pristatyti konferencijoje „Chemija ir cheminė technologija 2024“.

1. AUGUSTINAITYTĖ, L., JONUŠKIENĖ, I. Anglies šaltinių įtaka alginato gamybai iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų. Respublikinės studentų mokslinės konferencijos „Chemija ir cheminė technologija 2024“ pranešimų medžiaga. 2024, p. 73-75. ISSN 2538-7332.

Priedai

1 priedas. Komercinio natrio alginato FT-IR spektras

