



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Lina Enukskaitė

BIOPOLIMERŲ GAMYBOS OPTIMIZAVIMAS IŠ
BAKTERINIŲ LĄSTELIŲ

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

KAUNAS, 2017

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

BIOPOLIMERŲ GAMYBOS OPTIMIZAVIMAS IŠ
BAKTERINIŲ LĄSTELIŲ

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (kodas 621J70004)

Vadovė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Recenzentė

dr. Ingrida Tumosienė

Projektą atliko

Lina Enuksionaitė

KAUNAS, 2017



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Lina Euksonaitė

(Studento vardas, pavardė)

Pramoninė biotechnologija (kodas 621J70004)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Biopolimerų gamybos optimizavimas iš bakterinių ląstelių“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 17 m. birželio 9 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Linos Euksonaitės**, Projektas tema „Biopolimerų gamybos optimizavimas iš bakterinių ląstelių“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

IVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1 Biopolimerai išskiriami iš bakterijų	9
1.2 <i>Azotobacter vinelandii</i> apibūdinimas	9
1.3 Alginatai iš dumblių ir bakterijų	11
1.4 Alginatų struktūra.....	11
1.5 Fizikiniai parametrai, turintys įtakos alginatų išgavimui	12
1.6 Alginatų biosintezė.....	12
1.7 Alginatų panaudojimas.....	14
1.7.1 Alginatų panaudojimas farmacijoje.....	14
1.7.2 Alginatų panaudojimas maisto pramonėje	15
1.7.3 Alginatų panaudojimas plėvelėms.....	16
1.8 Ksantanas	16
1.9 <i>Xanthomonas campestris</i> apibūdinimas	17
1.10 Ksantano sintezė.....	19
1.11 Veiksniai, turintys įtakos ksantano išgavimo procese.....	20
1.11.1 Anglies šaltiniai	20
1.11.2 Azoto šaltinių įtaka.....	21
1.11.3 Temperatūros įtaka	21
1.11.4 pH įtaka	21
1.12 Ksantano panaudojimas	22
1.12.1 Maisto pramonėje	22
1.12.2 Pramoniniai panaudojimo būdai.....	22
1.12.3 Ksantano panaudojimas farmacijoje	23
1.13 Ateities tikslai	23
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	24
2.1 Medžiagos ir tyrimų metodai naudoti alginato išgavimo optimizavimui	24

2.1.1 Alginato išgavimo optimizavimui naudotos terpės ir medžiagos	24
2.1.2 Alginato gamybos optimizavimo metodai	26
2.2 Medžiagos ir tyrimų metodai naudoti ksantano išgavimo optimizavimui	29
2.2.1 Ksantano išgavimo optimizavimui naudotos terpės ir medžiagos	29
2.2.2 Ksantano gamybos optimizavimo metodai	30
2.2.3 Ksantano DPPH rodiklio slopinimas.....	32
2.3 Ksantano ir alginato išskyrimo metu naudotos aparatūros sąrašas	33
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	34
3.1 Alginato gamybos optimizavimas.....	34
3.1.1. <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijų augimo <i>Azotobacter</i> terpėje įvertinimas	34
3.1.2 <i>Azotobacter vinelandii</i> augimo skirtingose terpėse įvertinimas.....	35
3.1.3 Alginato koncentracijos priklausomybės nuo terpės įvertinimas.....	36
3.1.4. Alginato gamybos optimizavimas naudojant skirtingų šaltinių peptoną.....	36
3.1.5 Alginato gamybos optimizavimas naudojant fenolines rūgštis.....	38
3.1.6 Angliavandenių įvertinimas antrono reagentu	42
3.2 Ksantano gamybos optimizavimas.....	43
3.2.1 <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų YM terpėje augimo įvertinimas	43
3.2.2 Bakterijų koncentracijos nuo terpės priklausomybės įvertinimas.....	44
3.2.3 Ksantano gamybos optimizavimas naudojant skirtingus anglies šaltinius.....	45
3.2.4 Ksantano gamybos optimizavimas naudojant skirtingus tirpiklius.....	49
3.2.5 Išskirto ksantano DPPH radikalo slopinimo įvertinimas	50
4. REKOMENDACIJOS.....	51
IŠVADOS.....	54
LITERATŪROS SĄRAŠAS	55

Enuksonaitė, Lina. Biopolimerų gamybos optimizavimas iš bakterinių ląstelių. *Magistro Projektas / vadovas doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.*

Mokslo kryptis ir sritis: Biotechnologija, Technologijų mokslai

Reikšminiai žodžiai: *Biopolimerai, alginatas, ksantanas, Xanthomonas campestris, Azotobacter vinelandii.*

Kaunas, 2017. 58 p.

SANTRAUKA

Darbo metu buvo siekta išsiaiškinti optimalias biopolimerų išgavimo sąlygas iš bakterinių ląstelių. Augintos *Xanthomonas campestris* ir *Azotobacter vinelandii* bakterijų biomasės. Norint įvertinti ksantano ir alginato gavimo proceso sąlygas, prie kurių biopolimerų išskyrimas būtų optimalus, buvo atlikti tyrimai su skirtingais anglies šaltiniais, fenolinėmis rūgštimis, skirtingais azoto šaltiniais, antioksidacinis aktyvumas, DPPH slopinimo tyrimas. Darbe pateikiama ksantano, iš *Xanthomonas campestris* bakterijų, išskyrimo proceso aparatūrinė schema.

Enuksonaitė, Lina. *OPTIMIZATION OF BIOPOLYMERS PRODUCTION BY BACTERIAL CELLS: Master's thesis in industrial biotechnology/ supervisor assoc. prof. Ilona Jonuškienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.*

Research area and field: Biotechnology, Technological sciences

Key words: *Biopolymers, alginate, xanthan, Xanthomonas campestris, Azotobacter vinelandii*

Kaunas, 2017. 58 p.

SUMMARY

The purpose of this thesis was to find optimal conditions for biopolymers synthesis by bacterial cells. *Xanthomonas campestris* and *Azotobacter vinelandii* bacteria biomass were cultured. Optimal conditions for alginate and xanthan synthesis using different carbon sources, phenolic acids, nitrogen sources were examined. Also antioxidant activity, DPPH inhibition was determined. The principal flowsheet for xanthan production from *Xanthomonas campestris* is presented in this thesis.

SANTRUMPOS

FDA - Jungtinių Amerikos Valstijų Maisto ir vaistų administracija;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

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

YM - terpė (gliukozė – 3,0 g/L, peptonas – 3,0 g/L, mielių ekstraktas - 3,0 g/L, agaras – 20 g/L, pH=7);

YM-T – terpė (gliukozė – 12 g/L, peptonas – 2,5 g/L, mielių ekstraktas – 2,5 g/L, (NH₄)HPO₄ – 1,5 g/L, K₂HPO₄ – 2,5 g/L, MgSO₄ – 0,05 g/L, Ph=7);

NRP – terpė (gliukozė – 20 g/L, sacharozė – 20 g/L, peptonas – 2 g/L, MgSO₄·7H₂O – 2 g/L, NH₄NO₃ – 1,5 g/L, K₂HPO₄ – 1,2 g/L, CaCl₂ – 0,03 g/L, pH=7,2).

IVADAS

Iš bakterijų išskiriami biopolimerai yra vis dažniau naudojami įvairiose pramonės srityse. Jie yra naudojami farmacijoje, maisto, tekstilės, kosmetikos, popieriaus, dažų, naftos pramonėje. Biopolimerai išsiskiria įvairiomis savo savybėmis, kurios plečia jų panaudojimo galimybes. Taip pat šie polimerai tampa vis populiariesni dėl savo išgavimo būdo.

Vieni iš biopolimerų, kurių panaudojimo galimybės sparčiai plečiasi yra ksantanas ir alginatai. Šie biopolimerai yra gaunami naudojant *Azotobacter vinelandii* (alginatams) ir *Xanthomonas campestris* (ksantanui) bakterijas.

Alginatai yra polisacharidai sudaryti iš įvairiais santykiais sujungtų β – D- manurono rūgšties (M) ir jos C – 5 epimero – α – L- gulurono (G). Alginatų išskyrimui optimizuoti yra naudojamos skirtingos terpės. Norint pagerinti išskyrimo rezultatus yra tiriama skirtingų anglies ir azoto šaltinių įtaka išgaunamo alginato koncentracijai. Taip pat ištiriamas nesunaudotų angliavandenių kiekis fermentacijos terpėse.

Ksantanas – heteropolisacharidas, sudarytas iš pentasacharidų vienetų, kuriuose yra du gliukozės, du manozės ir vienas gliukurono rūgšties struktūriniai vienetai. Ksantano išskyrimo optimizavimui taip pat yra naudojamos skirtingos terpės, skirtingi anglies šaltiniai ir skirtingos jų koncentracijos. Taip pat pagerinti išskyrimą naudoti skirtingi tirpikliai.

Atradus kuo optimalesnes biopolimerų gamybos sąlygas ir metodus, biopolimerai taptų lengviau pritaikomi dėl gamybos kainų sumažėjimo ir trumpesnio išgavimo laiko, lengvesnio apdirbimo.

Darbo tikslas yra optimizuoti biopolimerų (ksantano ir alginato) gamybą.

Šiam tikslui pasiekti buvo keliami šie uždaviniai:

- Įvertinti *Azotobacter vinelandii* ir *Xanthomonas campestris* bakterijų augimą įvairiose maitinamosiose terpėse.
- Optimizuoti alginato išskyrimą naudojant fenolines rūgštis, skirtingus azoto šaltinius, palyginti išsiskyrusio alginato kiekius.
- Nustatyti likusių angliavandenių kiekį gautame alginate.
- Optimizuoti ksantano išskyrimą naudojant skirtingus anglies šaltinius, įvertinti ksantano antioksidacines savybes;
- Įvertinti tirpiklių įtaką išskiriamo ksantano kiekiui;
- Sudaryti ksantano gamybos principinę technologinę schemą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Biopolimerai išskiriami iš bakterijų

Naujausi biosintezės tyrimai atvėrė naujas galimybes biopolimerų, išgaunamų iš bakterijų, sintezei. Per pastarąjį dešimtmetį buvo atliekami molekulinų biopolimerų sintezės mechanizmų ir reguliavimo procesų tyrimai. Šios žinios lėmė bakterijų, kurios gali gaminti ne tik biopolimerus, bet ir modifikuotus nenatūralius polimerus, pridėtinės vertės bei platesnių naudojimo galimybių pritaikymą. Siekiama, kad išgaunamų biopolimerų gamyba būtų ekonomiškai naudinga, o atitinkamo biopolimero gamybos sąnaudos būtų mažesnės už sugeneruojamą pelną [1].

Bakterijos sugeba paversti skirtingus anglies šaltinius į įvairiausių savybių ir cheminės sudėties biopolimerus. Ląstelės viduje gali būti sintetinami kelių rūšių polimerai, tačiau ląstelės išorėje sintetinamų biopolimerų kiekis yra didesnis. Bakterijų sintetinami polimerai skirstomi į keturias pagrindines klases: polisacharidus, poliesterius, poliamidus ir neorganinius polianhidridus (polifosfatus). Šie polimerai turi įvairias biologines funkcijas. Jie naudojami kaip rezervinės medžiagos ar apsauginės išorinių ląstelių struktūrų dalys, kurios apsaugo nuo nepalankių sąlygų [1].

Keli iš bakterijų išgaunami polimerai yra gaminami vidutine ar didele gamybos apimtimi (nuo 2000 iki 100000 tonų dekstrano ir ksantano per metus). Svarbus rodiklis lyginant polimerus gautus iš bakterijų ir iš neatsinaujinančių gamtos šaltinių yra jų gamybos sąnaudos. Biopolimerai, kilę iš bakterijų ar atsinaujinančių gamtinių išteklių yra pranašesni dėl savo tvarių gamybos išteklių, biologinio skaidumo. Biopolimerai, patekę į aplinką, kurioje yra mikroorganizmų (dirvožemis, vanduo), visiškai degraduoja iki vandens ir anglies dvideginio.

Biopolimerų netoksiškos sudedamosios dalys lemia jų aukštą biosuderinamumą. Šis suderinamumas yra naudingas medicininuose procesuose (audinių inžinerijoje, žaizdų gydyme, veikliųjų medžiagų pernešime), kurių metu biopolimerai yra naudojami kaip matricos [1].

1.2 *Azotobacter vinelandii* apibūdinimas

Azotobacter vinelandii yra *Azotobacter* genties bakterija. Bakterijos yra lazdelės formos, gali būti vienos, grandinėlėse ar bakterijų gumulėliuose. Gramneigiamos, aerobinės – augimui ir dauginimuisi reikalaujančios deguonies. Jas galima rasti dirvožemyje ar gėlame vandenyje. Kai

kurios *Azotobacter* bakterijų grupės juda pasitelkdamos kūnelio gale esantį žiuželį, gamina pigmentus, kurie nudažo dirvožemį geltona, žalia, raudona, violetine ar rusva spalva [2].

Lyginant su kitomis bakterijomis *Azotobacter* yra gana didelės. Šios bakterijos gali būti beveik tokio pačio dydžio kaip mielių ląstelės - apie 2- 4 μm diametro [2].

Azotobacter turi keletą savybių, kurios padeda joms išgyventi atšiauriomis sąlygomis [2]. *Azotobacter* nesuformuoja endosporų, tačiau suformuoja cistas (žr. 1.1 pav.), kurios apsaugo nuo dehidratacijos, cheminių ir fizinių poveikių, ultravioletinės ir jonizuojančios spinduliuotės. Šios cistos nėra atsparios aukštomis temperatūroms. Cistos būsenoje bakterijos nefiksuoja azoto. Cistų dydis apie 3 μm [3]. Prisitaikyti prie aplinkos sąlygų padeda gleivių pavidalo medžiaga, kuri pasiskirsto aplink bakteriją ir išlaiko vandenį [2].

Bakterijos auga 20 – 30 °C laipsnių temperatūroje, pH 7,0 – 7,5 aplinkoje. Jos gali augti naudojant įvairius angliavandenius, alkoholius ir organines rūgštis, karbamidą, nitratus.



1.1 pav. Susidariusios *Azotobacter* cistos

A. vinelandii - azotą fiksuojančios bakterijos. Kadangi deguonis slopina nitrogenazės fermentą, tai bakterijų tikslas yra metabolizmo metu fiksuoti deguonį. Nitrogenazė yra apsaugoma dviem būdais: 1. Deguonis sulaikomas ląstelės paviršiuje; 2. Jei nepavyksta deguonies sulaikyti ląstelės paviršiuje, tada vyksta reakcija, kurios metu yra panaudojama dalis nitrogenazės, kuri sureaguotų su deguonimi ir apsaugotų likusią neaktyvintos nitrogenazės dalį [4].

1.3 Alginatai iš dumblių ir bakterijų

Alginatai pirmą kartą buvo atrasti rudųjų dumblių sudėtyje. Nuo pat jų atradimo jie tapo svarbiu produktu. Iš rudųjų dumblių išgauti alginatai turi skirtingas struktūras, kurias lemia sezoniškumas ir aplinkos pokyčiai [5].

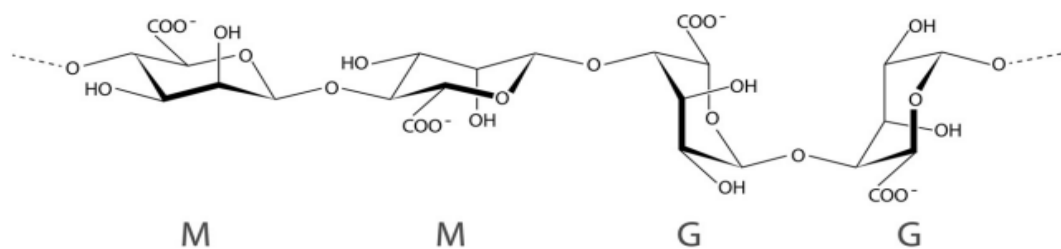
Iki šiol žinomos tik dvi bakterijų gentys, kurios gamina alginatus – *Pseudomonas* ir *Azotobacter*. Abi šios gentys alginatus išskiria polisacharidų pavidalu vegetatyvinėje augimo fazėje [5].

Alginatų, kurie buvo išskirti iš bakterijų ir iš dumblių, biologinės savybės skiriasi. Ruduosiuose dumbliuose alginatai yra struktūrą palaikantys komponentai. Tarpląstelinis alginatų matriksas suteikia dumbliams mechaninio stiprumo ir lankstumo (panašiai kaip pektinai aukštesnės klasės augaluose) [5].

Bakterijose alginatai atlieka įvairesnes funkcijas. Gramneigiamose dirvožemio bakterijose *Azotobacter vinelandii* alginatai supa kapsulę, dėl kurios bakterijos neišdžiūsta. Kitos alginatus gaminančios bakterijos – *Pseudomonas aeruginosa* išskiria alginatus gleivių pavidalu [6].

1.4 Alginatų struktūra

Alginatai yra polisacharidai sudaryti iš įvairiais santykiais 1,4 – jungtimis sujungtų β – D-manurono rūgšties (M) ir jos C – 5 epimero – α – L-gulurono (G) [6].



1.2 pav. Cheminė alginatų struktūra. M – manuronatų, G – guluronatų struktūros [6]

Skirtingas monomerų proporcijas ir išsidėstymą struktūroje turintys alginatai pasižymi skirtingomis cheminėmis ir fizikinėmis savybėmis [6]. Alginatų struktūroje gali vyrauti tiek G, tiek M blokai, tiek jų kompleksai – MG. G blokai yra svarbūs dėl savo galimybių sudaryti gelius reaguojant su $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ jonais žemoje temperatūroje [7]. Tie polisacharidai, kurių struktūroje yra daugiau G elementų, intensyviau sujungia divalenčius katijonus, to pasekoje susidarę geliai būna standesni [6]. MG blokai lemia polisacharidų grandinės lankstumą, tirpalų klampumą [7].

1.5 Fizikiniai parametrai, turintys įtakos alginatų išgavimui

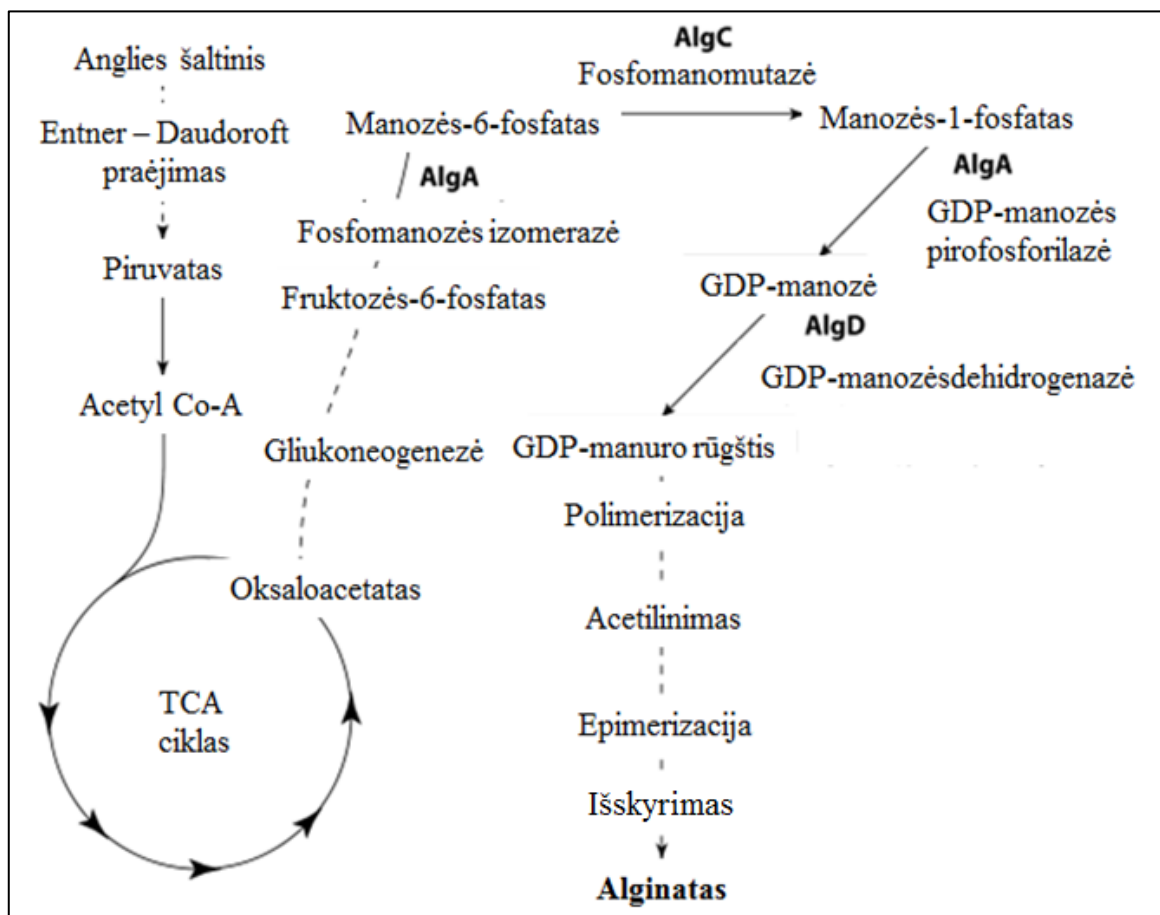
Tyrimų metu kolbos su auginama bakterijų kultūra buvo inkubuojamos skirtingose temperatūrose (nuo 25 iki 45 °C) ir skirtingus laiko intervalus (nuo 10 iki 120 val.). Geriausi rezultatai buvo gauti, kai inkubacijos laikotarpis buvo 110 val., o temperatūra 30 °C. Šiuos rezultatus lėmė tai, jog bakterijos yra jautrios temperatūros pokyčiams ir aukštoje temperatūroje sutrikdomas bakterijų metabolizmas [8].

Bakterijų augimas ir alginatų gavyba priklauso nuo terpės pH. Tiriant skirtingas augimo terpės pH vertes buvo pastebėta, jog esant pH 7,0 gaunama didžiausia alginatų koncentracija. pH verčių pokyčiai lemia sumažėjusią alginatų koncentraciją, kas parodo, jog bakterijos yra jautrios pH pokyčiams [9].

Tinkamas maišymo greitis yra svarbus tinkamam oro padavimui ir terpės komponentų pasiskirstymui. Greitis priklauso nuo mikroorganizmų ir fermentacijos terpės sudėties. Tyrimų metu buvo nustatyta, kad didžiausias kiekis alginatų buvo gautas, kai terpės maišymo greitis buvo 200 apm. Naudojamas intensyvesnis maišymas mažina alginatų koncentraciją, nes bakterijų sienelės gali būti pažeidžiamos. Naudojant mažesnę nei 200 rpm greitį alginatų koncentracija taip pat yra maža, nes terpės elementai tinkamai neišmaišomi [10].

1.6 Alginatų biosintezė

Pirmosios alginatų biosintezės, kurios metu alginatai buvo išskiriami iš bakterijų, metu buvo naudojamos bakterijos *A. vinelandii*. Biosintezės modelis buvo suskirstytas į keturias dalis: 1. Pirmtako sintezė; 2. Polimerizacija ir citoplazminės membranos transformacija; 3. Periplazminė transformacija ir modifikacija; 4. Išskyrimas per išorinę membraną [11].



1.3 pav. Bakterinės alginatų biosintezės schema

Pirmtako sintezės procesą sudaro penki etapai. BVP – manuro rūgšties sintezė vyksta bakterijų ląstelių citozolyje. Šioje biosintezėje tiesiogiai dalyvauja trijų rūšių fermentai. Bakterijose anglies šaltinis yra oksiduojamas į acetyl-CoA, kuris patenka į TCA ciklą, kuriame gliukoneozės metu iš oksaloacetato gaunamas fruktozės-6-fosfatas. Jis, veikiant fosfomanozės izomerazei (AlgA), paverčiamas į manozės-6-fosfatą, o toliau, veikiant fosfomanomutazei (AlgC), manozės-6-fosfatas paverčiamas į manozės-1-fosfatą. Tolesniame etape GMP ir AlgA fermentai manozės-1-fosfatą paverčia į GDP-manozę. Reakcijoje fermentai yra linkę suklikti reakciją atgal, tačiau guanozino-difosfomanosės dehidrogenazė veiksmingai pašalina GDP-manozę ir reakcija baigiasi išgavus GDP-manuronatą. Tarpininkaujant AlgD, GDP-manuronatas yra negrįžtamai oksiduojamas iki BVP-manurono rūgšties – pirmtako [11].

Antrajame alginatų biosintezės etape pirmtakas yra transportuojamas į citoplazminę membraną, kur yra polimerizuojamas iki polimanuronato. Tyrimų metu buvo pastebėta, jog ląstelių citoplazmos membranoje, perioplazmoje ir išorinėje membranoje yra aktyvių alginatų polimerazių, kurios kartu su baltymų nešėjų kompleksais, citoplazminės membranos ir perioplazmos baltymais transportuoja pirmtaką į citoplazminę membraną [11].

Trečio etapo metu vyksta periplazminė transformacija ir modifikacija. Kadangi alginatų savybės labiausiai priklauso nuo jų struktūros, tai šio etapo metu vyksta svarbus gulurono ir manurono rūgščių pasiskirstymas alginate. Bakterijų gaminamų alginatų modifikacijos vyksta tik periplazmoje [11].

Alginatų išskyrimas per išorinę membraną pirmą kartą buvo aprašytas 1990 m. ir prilygintas *P. aeruginosa* išorinės membranos gleivėms. Naudojant biocheminius ir elektrofiziologinius tyrimus buvo nustatyta, kad alginatai išskiriami pro anijonus atskiriančias poras išorinėje ląstelės sienelėje [11].

1.7 Alginatų panaudojimas

Alginatai plačiai naudojami kaip tirštikliai, stabilizatoriai, emulsikliai ir gelio struktūrą suteikiantys agentai. Šios alginatų savybės yra panaudojamos maisto, tekstilės, popieriaus pramonėse ir farmacijoje [12].

1.7.1 Alginatų panaudojimas farmacijoje

Alginatai farmacijoje naudojami kaip tirštikliai, stabilizavimo agentai. Dėl šių savybių alginatai naudingi kuriant naujas vaistų atpalaidavimo sistemas. Alginatų hidrogelių panaudojimas vaistų pernešimo sistemose sparčiai plečiasi [13].

Mažamolekulinių cheminių vaistų pernešime yra svarbus alginato ir vaisto cheminės jungties stiprumas, per kurią galima valdyti vaistų atsiskyrimą. Gelių nanoporos yra apie 5 nm dydžio. Dėl šios priežasties mažos molekulės iš gelio pasišalina greičiau. Kaip pavyzdys gali būti flurbiprofeno išsiskyrimas iš dalinai oksiduoto skersiniais ryšiais susijungusio gelio. Galutinai flurbiprofenas iš gelio išsiskiria per 1,5 val. Jeigu siekiama ilgesnio išsiskyrimo laiko yra naudojami granulių pavidalą įgavę oksiduoti kalcio jonų ir adipo rūgšties hidrazido alginatų junginiai [14].

Alginatų geliai naudojami pernešti baltymų pagrindo vaistines medžiagas. Pernašos metu baltymų molekulės lieka nepažeistos, į gelius baltymai įkomponuojami labai švelniomis sąlygomis. Tokiu būdu baltymai apsaugomi nuo denatūracijos [15].

Žaizdos padengtos alginatais yra apsaugomos nuo patogenų, bakterijų ir kitų mikroorganizmų, kurie galėtų sukelti uždegimą. Taip pat šis sluoksnis neleidžia žaizdai išdžiūti,

žaisda gyja be audinių surandėjimo. Pridėjus į šį gelį sidabro jonų, gaunamas antimikrobinis preparatas, turintis antioksidacinę poveikį [16].

Alginatai naudojami kaip priemonė pernešti ne tik baltymus, tačiau ir įvairaus pobūdžio ląsteles į pageidautinas organizmo vietas. Ši alginatų savybė lemia spartesnę audinių regeneravimą. Ląstelės atsilaisvinimas iš gelio priklauso nuo jos dydžio. Atsilaisvinimas iš gelio gali įvykti jam irstant, difuzijos būdu ar atsiskiriant iš gelio porų [17].

Alginato geliai padeda naujų kraujagyslių formavimuisi. Geliai lokalizuotai išlaiko hepariną, kuris veikia kaip antikoaguliantas. Šios procedūros metu alginatų geliai išvirkščiami tiesiai į raumens audinį, kuriame siekiama atkurti kraujotaką. Vyksta 14 – os dienų procesas, kurio metu gaminasi endotelis, leidžiantis susiformuoti naujiems kraujotakos kapiliarams. Taip yra užkertamas kelias audinių išemijai [18].

Geliai yra naudojami osteoindukcinių ir kaulus formuojančių ląstelių pernašai į lūžusių kaulų vietas. Alginatai yra tinkami šiam procesui dėl gebėjimo užpildyti įvairių formų pažeidimus ir dėl lengvo aktyviųjų medžiagų ir gelių sukibimo bei atpalaidavimo. Buvo atlikti *in vivo* tyrimai, kurių metu žiurkių osteoblastai buvo įterpti į pelių organizmus. Įterpimui naudoti alginatų ir medžiagos turinčios fibronektino junginiai. Šio tyrimo metu pelių organizmuose alginatų junginiai pradėjo formuoti „plokšteles“, kurios gali būti panaudojamos naujoms kaulinėms struktūroms susidaryti [19].

1.7.2 Alginatų panaudojimas maisto pramonėje

Maisto pramonėje alginatai naudojami kaip gelio struktūrą suteikiantys agentai. Gelinės struktūros stiprumas ir tankumas gali būti reguliuojami keičiant Ca^{2+} ir H^+ koncentraciją. Dažnai alginatai yra naudojami perdirbtų maisto gaminių gamyboje [20].

Alginatai naudojami kaip tirštikliai, stabilizatoriai, emulsikliai įvairiuose džemuose, marmeladuose, vaisių tyrėse. Alginatų ir pektino mišiniai yra termiškai patvarūs junginiai ir suteikia produktams klampą. Tokių junginių naudojimas yra paplitęs gaminant mažo kaloringumo apdirbtus produktus [20].

Dėl savo stabilumo esant aukštai temperatūrai ir žemam pH, alginatai naudojami kaip stabilizatoriai kepyklose naudojamiems kremams. Šiems kremams alginatai neleidžia suskystėti, pavandenyti. Alginatai stabilizuoja valgomuosius ledus, neleidžia juose atsirasti vandens kristalams [20].

1.7.3 Alginatų panaudojimas plėvelėms

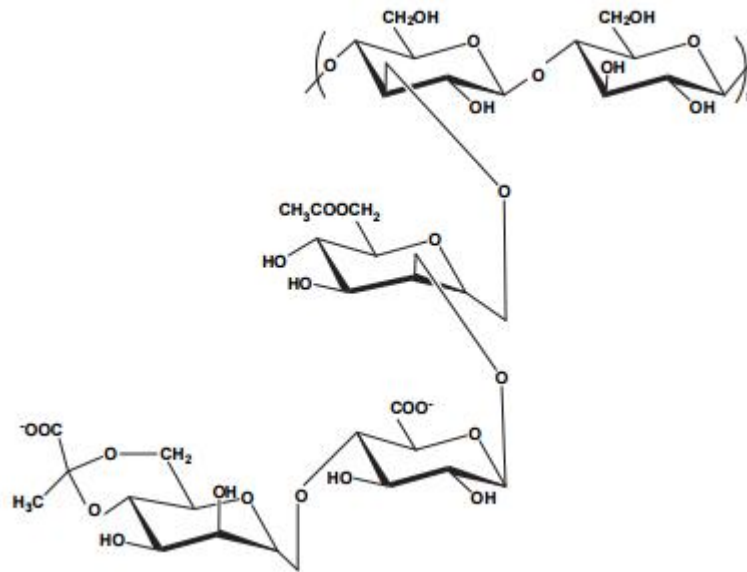
Greitai suyrantys ir netoksiški maisto produktų įpakavimai yra sparčiai besiplečianti technologijų dalis. Alginatų plėvelės suteikia gaminiams stabilumą, apsaugą, pailgina galiojimo laiką. Natrio alginato plėvelė pasižymi dideliu elastingumu, lankstumu, atsparumu pažeidimams, nepralaidumu aliejams, pralaidumu vandeniui ir deguoniui. Šios maistinės plėvelės gali būti panaudojamos plačiame maisto produktų spektre. Plėvelėse įkomponuoti antimikrobiniai agentai sukuria efektyvų barjerą mikrobiniam mėsos, daržovių, žuvies užterštumui. Pakuotes iš alginatų plėvelių galima formuoti žemoje temperatūroje. Taip apsaugomi produktai ir antimikrobiniai plėvelės agentai, kurie jautrūs aukštai temperatūrai [21].

1.8 Ksantanas

Ksantanas yra natūralus polisacharidas ir svarbus pramoninis biopolimeras. Ksantaną, gamina bakterijos *Xantomonas campestris*. Jis įdėmiai tiriamas dėl savo savybių, kurios leistų praplėsti natūralių ir sintetinių gumų panaudojimą ir gamybą [22].

Ksantanas – heteropolisacharidas, sudarytas iš pentasacharidų vienetų, kuriuose yra du gliukozės, du manozės ir vienas gliukurono rūgšties struktūriniai vienetai. Molinis šių vienetų santykis yra 2.8:2.0:2.0. Pagrindinė ksantano grandinė yra sudaryta iš β -D - gliukozės sujungtos 1 ir 4 padėtyse. Pagrindinės grandinės struktūra yra identiška celiuliozės grandinei. Trisacharido grandinė sudaryta iš D - gliukurono rūgšties vieneto, kuris yra tarp dviejų D – manozės vienetų, prijungtų O - 3 padėtyje, kiekvienoje gliukozės dalyje. Vidutiniškai pusėje D – manozių vienetų yra piruvo rūgšties likutis. D – manozės vienetas su pagrindine grandine sujungtas acetil grupėmis O – 6 pozicijose. Acetato ir piruvo rūgščių buvimas lemia polisacharido anijoniškumą [23].

Trisacharidai yra išsidėstę netoli pagrindinio polimero struktūros „kamieno“. Gauta standi grandinė gali būti vienguba, dviguba, triguba. Šios grandinės jungiasi su kitomis polimerų molekulėmis ir sudaro kompleksus. Molekulinis ksantano svoris priklauso nuo grandinių susijungimo, kompleksų susidarymo, atskirų grandinių. Taip pat molekulinį svorį lemia ksantano fermentacijos ir produkcijos sąlygos [24].



1.4 pav. Ksantano struktūrinė formulė

Ksantano biosintezės metu gali kisti ne tik acetilinių junginių ir piruvato kiekis, tačiau ir šių struktūrinių vienetų padėtys. Šiuos pokyčius lemia pakitusios fermentacijos sąlygos [24].

Ksantano toksiškumas ir saugumas yra intensyviai nagrinėjami. Ksantanas yra netoksiškas, neskatina augimo, yra nekeliantis jautrumo, nekelia odos suerzinimo ir akių sudirgimo. Šie požymiai lėmė, kad ksantanas buvo pripažintas saugiu Jungtinių Amerikos Valstijų Maisto ir vaistų administracijos (FDA), kaip saugus naudoti farmacijoje ir maisto pramonėje. Taip pat nebuvo nustatyta specialių naudojimo kiekių apribojimų [25].

Dėl savo gebėjimo stabilizuoti emulsijas, stabilumo įvairiose temperatūrose, suderinamumo su maisto ingredientais, pseudoreologinių savybių, ksantanas yra naudojamas maisto produktuose [26].

Kaip dispersinis agentas ir emulsijų ir suspensijų stabilizatorius ksantanas naudojamas kosmetikoje, agrokultūriniuose produktuose, tekstilės spausdinimo pastose, keramikos glazūrose, rūdžių naikikliuose [26].

1.9 *Xanthomonas campestris* apibūdinimas

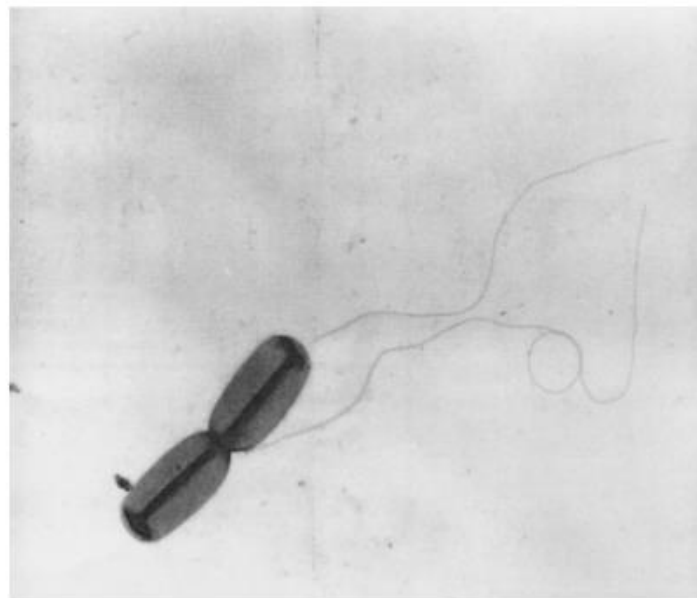
Xanthomonas campestris - *Pseudomonaceae* šeimos bakterijos. Visi šios šeimos mikroorganizmai pasižymi patogeninėmis savybėmis. Šios bakterijos gali užkrėsti augalus (kopūstus, pupeles, paprikas) [27]. *Xanthomonas campestris* išskiria polisacharidą – ksantaną [28]. Bakterijos yra aerobinės, Gramneigiamos, jų kamienas yra žinomas dėl savo sukeltų juodų puvinų ir patamsėjimų ant augalų lapų ir stiebų (žr. 1.5 pav.).

Šios bakterijos yra mezofilinės, optimali jų augimo temperatūra yra 25 – 30 °C, žemesnėje negu 10 °C jos tampa neaktyvios [29].



1.5 pav. *Xanthomonas campestris* sukelti lapo pakitimai

Bakterijos yra lazdelės formos 0,4 – 0,7 μm pločio ir 0,7 - 1,8 μm ilgio (žr. 1.6 pav.). Jos turi siūlines struktūras, kurios yra labai jautrios aplinkai ir yra atsakingos už bakterijos patogenų perdavimą per augalo ląstelių paviršių ir judėjimą vandenyje, kurios yra 1.7 - 3 μm ilgio [30]. Bakterijų kolonijos dažniausiai yra geltonos spalvos, tąsios [31].



1.6 pav. *Xanthomonas campestris*

Šios aerobinės bakterijos atlieka daugelio angliavandenių metabolizmą. Metabolizmo metu vyksta glikolizė, gliukoneogenazė, citrato ciklas ir kt. Vykdydamos oksidacinį fosforilinimą, anglies fiksaciją, metano, azoto ir sieros metabolizmo procesus bakterijos įgauna energijos [32].

Bakterijos turi III tipo sekrecijos sistemas, kurios reikalingos importuoti efektorinius baltymus į augalo ląsteles ir taip sumažinti jo pasipriešinimą. Taip pat *Xanthomonas campestris* sukuria bioplėvelę ant augalų paviršiaus per kurią, palaiko ryšį. Šis ryšys palaikomas difunduojančiais signalais [27].

Šios bakterijos yra patogeniškos ir lengvai plintančios. Jos gali išgyventi dirvožemyje metus ir plisti per judantį požeminį ar lietaus vandenį. Šių bakterijų plitimą stabdo sveikų augalų purškimas fungicidais turinčiais vario [33].

Bakterijos turi tris pagrindines padermes: L – didelės, Sm - mažos, Vs – labai mažos apimties. L padermės bakterijos dažniausiai sudaro ryškiai geltonos spalvos kolonijas, kurių skersmuo 4 - 5 mm. Iš šios padermės yra išskiriama daugiausiai ksantano ir jo piruvato. Sm padermė būna tamsiai geltonos spalvos, kolonijų dydis iki 2 mm. Iš jų išskiriamas mažesnis ksantano ir jo piruvato kiekis negu iš L padermės. Vs padermės kolonijos yra šviesiai geltonos spalvos ir jų kolonijų diametras siekia vos 1 mm. Ši padermė ksantano neišskiria [34].

1.10 Ksantano sintezė

Gaminant ksantaną yra pasirenkama mikroorganizmų kultūra, kuri atitinkamai paruošiama. Nedidelis kiekis pasirinktos mikroorganizmų kultūros yra pasėjamas į kietą arba skystą maitinimosi ir augimo terpę. Šioje terpėje mikroorganizmų skaičius išauga. Mikroorganizmų augimas ir ksantano produkcija priklauso nuo naudojamo bioreaktoriaus tipo, reaktoriaus pamaitinimo tipo (periodinis ar nepertraukiamas pamaitinimas), terpės sudėties, temperatūros, pH, ištirpusio deguonies koncentracijos [35].

Tipiniame komerciniame produkcijos procese naudojamos *Xanthomonas campestris* bakterijos, kurios yra paruošiamos tinkamoje terpėje ir reaktoriuje. Aeruojama mikroorganizmų kultūra fermentuojama 28 – 30 °C temperatūroje, pH 7, aeracijos įsotinimas 0,3 v/v [36]. Fermentacijos procesas atliekamas vidutiniškai apie 100 valandų, kol į produktą konvertuojama apie 50% gliukozės [37].

Fermentacijos pabaigoje augimo terpėje yra bakterijų ląstelių, ksantano ir kitų cheminių junginių mišinys. Siekiant išgauti ksantaną iš šio mišinio pirmiausia yra pašalinamos bakterijų ląstelės. Jos yra centrifuguojamos arba nufiltruojamos. Švaresniam ksantanui gauti yra vykdomas nusodinimas naudojant izopropanolį, etanolį, acetoną, tam tikras druskas bei pH

nulemiančias medžiagas. Po nusodinimo produktas mechaniškai nuvandeninamas ir išdžiovinamas. Sausas produktas sumalamas ir supakuojamas į pakuotes, nepraleidžiančias drėgmės [37].

1.11 Veiksniai, turintys įtakos ksantano išgavimo procese

1.11.1 Anglies šaltiniai

Gliukozė ir sacharozė yra labiausiai paplitę anglies šaltiniai, kurie naudojami ksantano gamyboje. Anglies šaltinių koncentracija yra vienas iš veiksnių, kurie nulemia ksantano išėigą. Efektyviausia anglies šaltinių koncentracija yra nuo 2 iki 4%, didesnė koncentracija slopina augimą [38].

Atliekant fermentaciją, kurios metu buvo naudotos *X. campestris*, terpėje anglies šaltinis buvo gliukozė. Šio proceso metu buvo naudojamas periodinio pamaitinimo reaktorius, periodiškai į terpę buvo tiekama gliukozė. Proceso rezultatai parodė, kad šis anglies šaltinis žymiai pakėlė ksantano išėigą [38].

Kiti atlikti tyrimai parodė, kad sacharozė taip pat yra efektyvus anglies šaltinis. Tyrėjai nustatė, kad sukcinatai ir 2 - oksogliutaratai turi stimuliacinį efektą gaminant ksantaną, kai terpėje yra sacharozės [39].

Terpėje, kurioje naudojama laktozė, bakterijų kiekis yra mažas ir ksantano išėiga yra mažesnė, negu proceso metu naudojant gliukozę ar sacharozę (žr. 1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Ksantano išėiga naudojant įvairius anglies šaltinius

Anglies šaltinis	Ksantano išėiga (g L ⁻¹)
Gliukozė	14,744
Sacharozė	13,234
Maltozė	12,321
Fruktozė	5,232
Ksilozė	5,531
Arabinozė	10,958
Galaktozė	7,129
Laktozė	1,008
Inozitolis	1,502

1.1 lentelės tęsinys

Sorbitolis	1,401
Krakmolas	12,10

1.11.2 Azoto šaltinių įtaka

Azotas yra vienas iš pagrindinių maistinių medžiagų, naudojamų ksantano gamyboje. Azotas terpėje būna organinių arba neorganinių molekulių pavidalu. Azoto šaltiniai gali būti dviejų tipų - NH_4Cl arba NaNO_3 . Terpėje, kurioje buvo nitrato, ląstelės augo lėčiau, negu terpėje su amoniako junginiu. Azotą iš amoniako junginių atpalaiduojančioje terpėje vyko geresnis biomasės augimas, tačiau didesnė ksantano išeiga buvo kaip azoto šaltinį naudojant nitrata [40].

1.11.3 Temperatūros įtaka

Temperatūros įtaka ksantano gamyboje yra intensyviai nagrinėjama. Keli šaltiniai teigė, kad tinkamiausia temperatūra ksantano gamybai yra 28°C . Buvo iširta, kad didžiausia ksantano išeiga gauta mažinant temperatūrą nuo 30°C iki 25°C arba didinant nuo 33°C iki 35°C . Didesnė temperatūra auginant bakterijų kultūrą lemia didesnę ksantano kiekį, tačiau mažina ksantano piruvato kiekį. Optimalu, kai mikroorganizmų augimui yra naudojama 25°C temperatūra, o produkcijos metu - 30°C [41].

1.11.4 pH įtaka

Optimaliausias pH *X. campestris* augimui yra neutralus. Ksantano produkcijos metu, dėl susidarančių rūgšties funkcinų grupių, pH kinta nuo neutralaus iki 5. Atlikti tyrimai nustatė, jog po 24 val. terpės mišinio pH reikšmės buvo nuo 7 iki 8, po 48 val. - nuo 8 iki 9,5, o po 72 val. – nuo 8 iki 10. Šio tyrimo metu taip pat buvo nustatyta, jog optimalus pH yra nuo 6 iki 7,5. Taip pat buvo nustatyta, jog pH reikšmės turi įtakos ląstelių augimui mišinyje, tačiau neturi jokio poveikio ksantano išgavimui [42].

1.12 Ksantano panaudojimas

1.12.1 Maisto pramonėje

Ksantanas yra naudojamas maisto pramonėje kaip suspendavimo agentas, tirštiklis. Reikalaujama, kad daugelis maisto produktų turėtų tam tikras savybes – tekstūrą, klampumą, skonio atsiskleidimą, išvaizdą, vandens surišimo kontrolę. Ksantanas reguliuoja šias savybes.

Ksantanas naudojamas kepinuose atlieka vandens surišimo funkciją, jis pailgina keptų gaminių ir užšaldytų tešlų galiojimo laiką. Taip pat jis gali būti naudojamas kaip kiaušinių pakaitalas minkštiems kepiniams gaminti, neįtakojantis produkto išvaizdos ir skonio. Ksantanas suteikia kepiniams purumą, tekstūrą, sumažina kaloringumą, gali būti naudojamas gaminiuose be gliuteno. Jo naudojimas tiek šaltuose tiek karštuose kepinų užpilduose pailgina jų galiojimo laiką [43].

Gaiviuosiuose gėrimuose, kuriuose yra naudojami vaisių ir uogų ekstraktai ar gabalėliai, ksantanas padeda palaikyti suspensiją. Taip pat jis naudojamas siekiant išsaugoti skonio savybes ir tekstūrą. Ksantanas suteikia malonų jausmą burnoje ir yra suderinamas su daugeliu gėrimuose naudojamų komponentų. Gėrimams, paruošiamiems iš miltelių ksantanas suteikia klamos, sustiprina skonį [44].

Ksantanas naudojamas kaip stabilizatorius desertiniuose leduose, šaltuose pieno kokteiliuose, šerbetuose. Metilkarboksimetilceliuliozė kartu su ksantanu yra naudojama šaldytiems pieno produktams, o metilkarboksiceliuliozės ir ksantano mišinys – rūgšties jogurtams. Šie medžiagų mišiniai suteikia produktams optimalų klampumą, ilgalaikį stabilumą, apsaugą nuo staigių temperatūros pokyčių ir vandens kristalų susidarymo [45].

1.12.2 Pramoniniai panaudojimo būdai

Ksantanas pramonėje naudojamas palaikyti ilgalaikes suspensijas, emulsijų stabilumą rūgštinėje, šarminėje aplinkoje ar druskos tirpaluose, palaikyti atsparumą temperatūrai, plastiškumą [46].

Reologinės ksantano savybės lemia ksantano naudingumą naftos pramonėje. Degalų industrijoje jis yra naudojamas gręžiniams naudojamų grąžtų sutepimui, kaip gręžimo skysčių priedas [46].

Agrokultūroje ksantano derva naudojama pagerinti fungicidų, herbicidų, insekticidų išsiskyrimą iš kietų dalelių. Taip pat ji padeda prikibti ir išsilaikyti purškiamoms medžiagoms and pasėlių viršiaus [45].

Ksantano stabilumas esant įvairioms pH vertėms padaro jį puikiu tirštikliu stipriai šarminiuose vamzdžių, plytelių valikliuose ir rūgštiniuose tirpaluose rūdims valyti [46].

Plastinės ksantano savybės yra panaudojamos užtikrinti stabilią tekstūrą lubų, plytelių, kitų dangų dažuose. Taip pat ksantanas lemia šių dažų aplikacijos lengvumą ir išsilaikymą. Jis sutirština latekso pagrindo dažus ir stabdo cinko, vario ir kitų metalų koroziją [46].

1.12.3 Ksantano panaudojimas farmacijoje

Ksantanas yra puikus stabilizatorius, kuris gali būti naudojamas farmacijoje. Jis geba suspenduoti vandenyje netirpias medžiagas, tokias kaip bario sulfatą, kuris naudojamas rentgeno tyrimams, taip pat stabilizuoti įvairios paskirties medicininės emulsijas. Ksantanas pailgina pastilių galiojimo laiką ir išsaugo aktyvaus ingrediento savybes tabletėse. Taip pat jis naudojamas kurti lėto vaistų atpalaidavimo sistemas [47].

1.13 Ateities tikslai

Bakteriniai polisacharidai, tokie kaip ksantanas ar alginatai, yra alternatyva polisacharidams, gaunamiems iš neatsinaujinančių žaliavų. Kol kas polisacharidai, išskiriami iš bakterijų yra gana brangūs, tačiau turi savų privalumų: produkto kokybė gali būti reguliuojama keičiant fermentacijos sąlygas. Gamyboje didelis privalumas yra tai, jog bakterijos gali daugintis ir augti daugelyje substratų.

Ateities tikslai yra gauti ksantaną ir alginatus su naujomis savybėmis, keičiant jų grandinių struktūrą. Svarbus yra ir bakterinių biopolimerų panaudojimo sričių plėtimas.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1 Medžiagos ir tyrimų metodai naudoti alginato išgavimo optimizavimui

2.1.1 Alginato išgavimo optimizavimui naudotos terpės ir medžiagos

Alginato išgavimo procese buvo naudotos trys terpės (žr. 2.1, 2.2, 2.3 lenteles). Terpių paruošimui buvo atsverti tam tikri medžiagų kiekiai, užpilti atitinkamu kiekiu distiliuoto vandens (priklausomai nuo reikalingo terpės kiekio). Sureguliuotas atitinkamas terpių pH. Terpės autoklavuojamos.

Tyrimui, kurio metu norėta sužinoti kokią įtaką turi iš skirtingų šaltinių gautas peptonas buvo naudojami peptonas iš mėsos ir iš sojų. Į NRP terpę buvo dedami vienodi abiejų peptonų kiekiai, kita terpės sudėtis nesikeitė.

Tyrimo su fenolinėmis rūgštimis metu buvo naudotos produkcijos ir NRP terpės. Į abi terpes papildomai buvo įdėta po 0,01 M 4- hidroksifenilacto ir 3,4- dihidroksibenzoinės rūgščių. Toliau tyrimas buvo vykdomas su NRP terpe, kurioje keitėsi abiejų rūgščių koncentracija. Naudotos rūgščių koncentracijos – 0,01 M, 0,025 M, 0,05 M.

2.1 lentelė. Produkcijos terpė

Medžiaga:	Kiekis, g/L
Gliukozė	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6
Na ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄	0,3
Mielių ekstraktas	6
pH = 7,2	

Anglies šaltiniai autoklavuojami atskirai.

2.2 lentelė. NRP terpė

Medžiaga:	Kiekis, g/L
Gliukozė	20
Sacharozė	20
Peptonas (iš mėsos ir sojų)	2,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,0
NH ₄ NO ₃	1,5
K ₂ HPO ₄	1,2
CaCl ₂	0,03
pH= 7,2	

Anglies šaltiniai autoklavuojami atskirai.

2.3 lentelė. Azotobacter terpė

Medžiaga:	Kiekis, g/L
Gliukozė	5
Manitolis	5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,005
K ₂ HPO ₄	0,9
KH ₂ PO ₄	0,1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
CaCO ₃	5
Agaras (kietai terpei)	16
pH=7,3	

Anglies šaltiniai autoklavuojami atskirai.

Azotobacter terpė buvo gaminama kietos ir skystos būsenos. Norint išgauti kietą terpę į mišinį buvo įmaišyta agaras.

Medžiagos: Izopropanolis, Na₂-EDTA, H₂SO₄ 95%, antronas, NaOH, HCl, Na₂CO₃, NaCl, 4- hidroksifenilacto rūgštis, 3,4- dihidroksibenzoinė rūgštis.

2.1.2 Alginato gamybos optimizavimo metodai

Inokulianto gamybos procesas

Inokulianto paruošimui atgaivintos *Azotobacter vinelandii* bakterijos pasėtos į 5 ml *Azotobacter* terpę. Bakterijos terpėje auginamos 24 valandas, palaikant 28 °C temperatūrą ir 160 aps/min sukimo greitį. Bandinys buvo laikomas termostatuojamame kratytuve. Po 24 valandų iš bandinio buvo paimta po 100 µl bakterijų inokulianto ir supilta į šešis mėgintuvėlius, kurie buvo inkubuojami tokiomis pačiomis sąlygomis kaip ir pirminis bandinys ir buvo pripildyti po 5 ml *Azotobacter* terpės. Prieš gautus inokuliantus naudojant fermentacijai buvo išmatuotos kiekvieno inokulianto šviesos sugertys 540 nm bangos ilgyje. Fermentacijai buvo naudojami panašiausias šviesos sugertis turintys inokuliantai. Fermentacijos proceso metu į vieną produkcijos terpės kolbą buvo pilamas vienas mėgintuvėlis (5,1 ml) inokulianto.

Fermentacija

Fermentacijos procese buvo naudota 100 ml produkcijos ir NRP terpių, į kurias supilta po 5,1 ml inokulianto. Išmatuojama pradinė terpės šviesos sugertis 540 nm bangos ilgyje. Po pradinės terpės šviesos sugerties išmatavimo kolbos su inokuliantais patalpinamos į termostatuojamą kratytuvą, kuriame palaikoma 28 °C temperatūra ir 160 aps/min sukimo greitis. Fermentacijos trukmė - 168 valandos. Fermentacijos metu buvo periodiškai matuojama šviesos sugertis (po 24, 96 ir po 168 valandų).

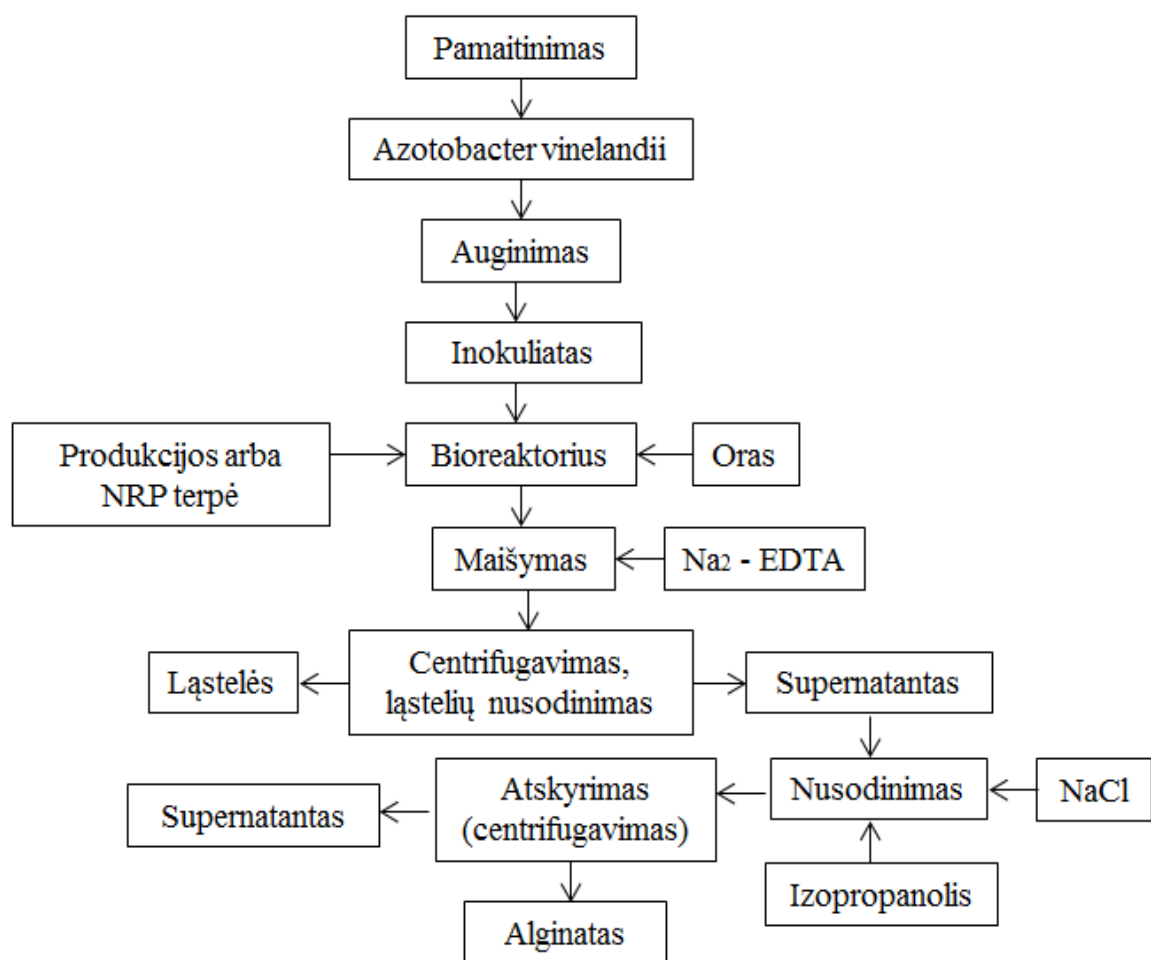
Alginato išskyrimas

Norint išskirti alginatą visų pirma reikia sužinoti ląstelių kiekį inokuliate. Jam nustatyti 20 ml inokulianto buvo praskiesta 100 ml distiliuoto vandens, į praskiestą mėginį buvo įpilta 6 ml 20% Na₂-EDTA tirpalo. Suspensija buvo centrifuguota 9000 aps/min jėgos lauke 30 minučių. Gautos nuosėdos buvo praplautos 120 ml distiliuoto vandens ir centrifuguotos 15 minučių 9000 aps/min jėgos lauke. Norint sužinoti biomasės kiekį (naudojama (1) formulė), nuosėdos buvo perkeltos į pasvertus mėgintuvėlius ir džiovinamos 105 °C temperatūroje tol, kol masė nebekito.

$$m_{bio} = m_{išdžiovinto\ mėgintuvėlio\ masė} - m_{tuščio\ mėgintuvėlio\ masė} \quad (1)$$

Išskyrinėjant alginatą į 20 ml inokuliatu buvo įpilta 1 ml 20% NaCl tirpalo ir 40 ml 95 % izopropanolio. Norint, kad mišinyje nebeliktų vandens nuosėdos buvo dehidratuotos 10 ml tos pačios koncentracijos izopropanoliu. Nuosėdos centrifuguotos 9000 aps/min jėgos lauke 15 minučių. Centrifuguotos nuosėdos buvo perkeltos į žinomos masės mėgintuvėlį ir džiovinamos 105 °C temperatūroje iki tol, kol masė nebekito. Alginato koncentracija apskaičiuojama pagal (2) formulę.

$$X_{alg} = \frac{m_{biomasė \text{ ir alginatas}} - m_{biomasė}}{V} \quad (2)$$



2.1 pav. Alginato išskyrimo principinė schema

Angliavandenių kiekio nustatymas

Nustatant angliavandenių kiekį gautame alginate buvo naudojamas antrono reagentas, kuris buvo paruoštas 200 mg antrono reagento ištirpinus 100 ml 95 % sieros rūgšties (H₂SO₄). Tai pat kalibravimo kreivei buvo paruoštas standartinis gliukozės tirpalas, kuriame 100 mg gliukozės buvo ištirpinta 100 ml distiliuoto vandens. Paėmus 10 ml šio standartinio tirpalo ir praskiedus jį iki 100 ml buvo gautas darbinis tirpalas. Standartiniai kalibracinės kreivės tirpalai buvo paruošti naudojant 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ir 1 ml darbinio gliukozės tirpalo, visi mėginiai buvo užpildyti iki 1 ml tūrio distiliuotu vandeniu. 1 ml distiliuoto vandens buvo kaip kontrolinis palyginamasis tirpalas. Į mėgintuvėlius supilta po 4 ml antrono reagento ir kaitinta 8 minutes verdančio vandens vonelėje. Po to, kai mėginiai buvo atvėsinti jie išmatuoti spektrofotometru 630 nm bangos ilgyje, pagal gautus rezultatus sudaroma kalibracinė kreivė.

Proceso pradžioje buvo atlikta hidrolizė. Jos metu 25 mg gauto alginato buvo įdėta į mėgintuvėlį, kur buvo įpilta 0,625 ml 2,5 N HCl ir hidrolizuota 3 valandas. Po hidrolizės mėgintuvėliai atvėsinti iki kambario temperatūros. Gautas reakcijos mišinys buvo neutralizuotas Na₂CO₃. Reagentas bertas į mėgintuvėlį tol, kol nebesiskyrė dujos. Po neutralizacijos į mėgintuvėlius buvo įpilta po 12,5 ml distiliuoto vandens ir centrifuguota 15 minučių 9000 aps/min jėgos lauke. Tolesniam tyrimui buvo imta po 0,5 ml gauto supernatanto. Į supernatantą buvo pilta po 4 ml antrono reagento ir kaitinta 8 minutes verdančio vandens vonelėje. Atvėsintus mėginius buvo išmatuota šviesos sugertis 630 nm bangos ilgyje. Mėginiuose esanti angliavandenių koncentracija apskaičiuota pagal formulę (3).

$$\frac{OD_{630_{m\acute{e}g.}}}{C_{m\acute{e}g.}} = \frac{OD_{630_{stand.}}}{C_{stand.}} \quad (3)$$

čia: $OD_{630_{m\acute{e}g.}}$ – mėginio šviesos sugertis 630 nm bangos ilgyje,

$OD_{630_{stand.}}$ – standartinio tirpalo šviesos sugertis 630 nm bangos ilgyje,

$C_{m\acute{e}g.}$ – mėginyje esančių angliavandenių koncentracija,

$C_{stand.}$ – standartiniame tirpale esančių angliavandenių koncentracija.

2.2 Medžiagos ir tyrimų metodai naudoti ksantano išgavimo optimizavimui

2.2.1 Ksantano išgavimo optimizavimui naudotos terpės ir medžiagos

Ksantano gamybos procese buvo naudotos trys terpės (žr. 2.4, 2.5, 2.6 lenteles).

Tyrimui, kurio metu buvo norėta sužinoti kokią įtaką ksantano gamyboje daro skirtingi anglies šaltiniai buvo naudota produkcijos terpė, kurioje vietoj sacharozės buvo įdėta gliukozė ir kitame bandinyje – maltozė. Tolesniame tyrime buvo naudotos skirtingos sacharozės ir gliukozės koncentracijos (30g/L, 40g/L, 50g/L).

2.4 lentelė. YM terpė

Medžiaga:	Kiekis, g/L
Gliukozė	3,0
Peptonas	3,0
Mielių ekstraktas	3,0
Agaras	20
pH= 7,0	

Anglies šaltiniai autoklavuojami atskirai.

2.5 lentelė. YM-T terpė

Medžiaga	Kiekis, g/L
Gliukozė	12,0
Peptonas	2,5
Mielių ekstraktas	1,5
Salyklo ekstraktas (tamsių miežių)	1,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,5
K ₂ HPO ₄	2,5
MgSO ₄	0,05
pH = 7	

Anglies šaltiniai autoklavuojami atskirai.

2.6 lentelė. Produkcijos terpė

Medžiaga	Koncentracija, g/L
Sacharozė	40,0
Citrinos rūgštis	2,1
NH ₄ NO ₂	1,14
KH ₂ PO ₄	2,86
MgCl ₂	0,5
Na ₂ SO ₄	0,08
H ₃ BO ₃	0,006
ZnO	0,006
FeCl ₃	0,02
CoCO ₃	0,02
HCl	0,136
pH = 7	

Anglies šaltinis autoklavuojamas atskirai.

Medžiagos: NaOH, izopropanolis, acetonas, bioetanolis, metanolis, bioetanolio ir acetono mišinys santykiu 1:1.

2.2.2 Ksantano gamybos optimizavimo metodai

Bakterijų auginimas

Bakterijos *Xanthomonas campestris* buvo pasėtos ant kietos YM terpės. Bakterijos inkubuojamos 3 dienas 27 °C temperatūroje.

Inokulianto gamybos procesas

Bakterijos nuo kietos terpės buvo perkeltos į mėgintuvėlius su 7 ml YM terpės. Šie mėgintuvėliai buvo laikomi termostatuojamame kratytuve, kuriame palaikoma 28 °C temperatūra ir 160 aps/min sukimo greitis. Mėgintuvėliai buvo inkubuojami 12 valandų. Po auginimo buvo išmatuota mėginių šviesos sugertis spektrofotometru 540 nm bangos ilgyje. Po

12 – os valandų mėginys, kuriame buvo didžiausia šviesos sugertis buvo supiltas į kolbą, kurioje buvo paruošta 43 ml YM-T terpės. Ši kolba, patalpinama termostatuojamame kratytuve palaikant tokias pačias sąlygas kaip ir mėgintuvėliams. Kolboje bakterijos auginamos 6 valandas.

Po 6 valandų yra matuojama inokulianto šviesos sugertis 540 nm bangos ilgyje ir apskaičiuojama biomasės koncentracija pagal formulę (4).

$$C\beta = 0,2845 \times OD_{540} \quad (4)$$

čia: $C\beta$ – biomasės koncentracija (g/L),

OD_{540} – mėginio šviesos sugertis 540 nm bangos ilgyje.

Fermentacija

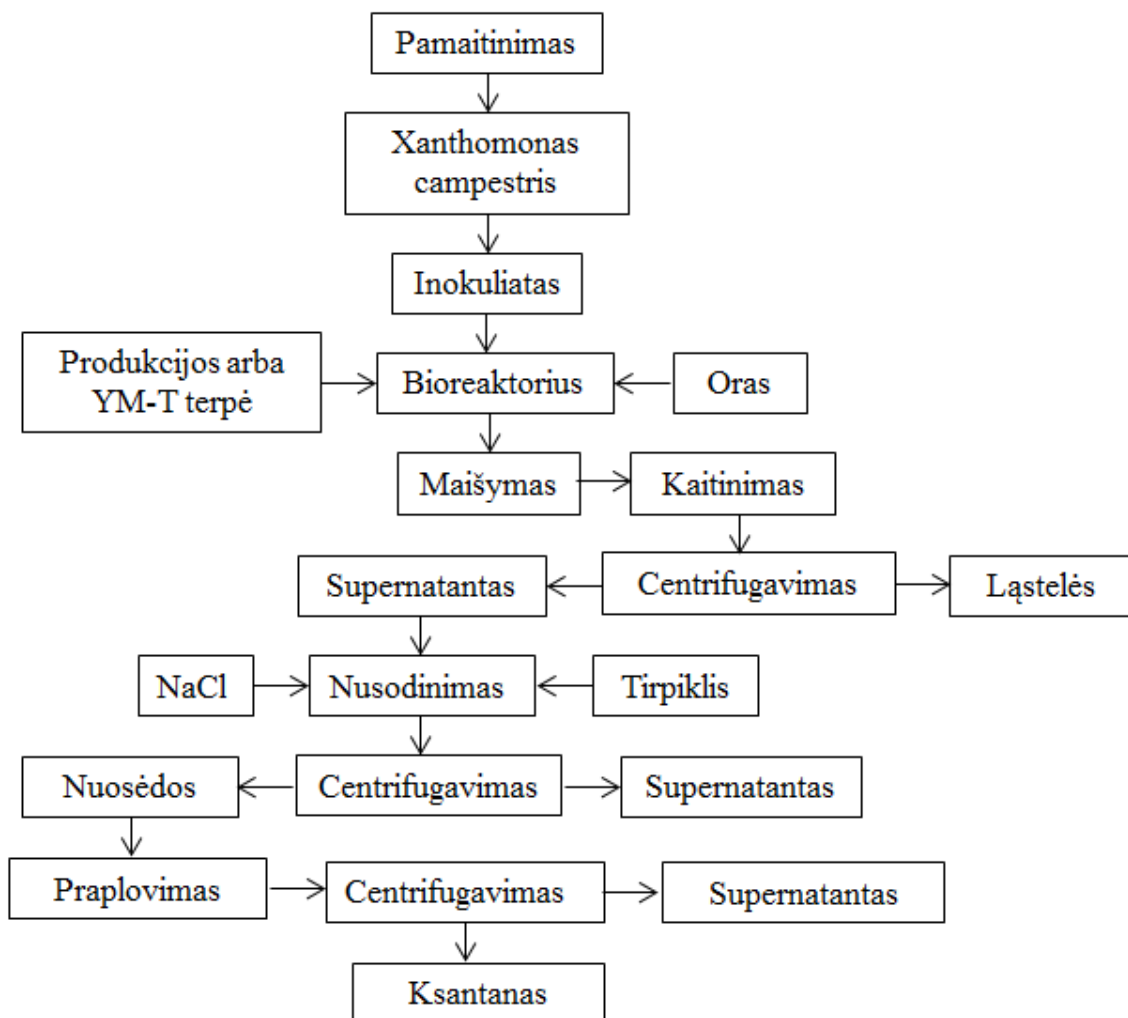
Fermentacijos metu į 200 ml produkcijos ir YM-T terpių buvo įpilta po 10 – 15 % užauginto inokulianto. Fermentacijos mišiniai buvo inkubuojami termostatuojamame maišytuve 28 °C temperatūroje, esant 160 aps/min sukimo greičiui. Bakterijų inokuliatų šviesos sugertis buvo matuojama 540 nm bangos ilgyje 48, 96 ir 144 valandomis. Po fermentacijos proceso buvo įvertinta biomasės koncentracija pagal (4) formulę.

Ksantano išskyrimas

Išskyrinėjant ksantaną, gautas fermentacijos inokuliatas buvo kaitinamas 15 minučių 90 °C naudojant magnetinę šildančią maišyklę. Šildymas buvo atliekamas siekiant paskatinti ksantano tirpimą, suardyti bakterijų ląsteles ir sumažinti klampumą. Po šildymo fermentacijos mišinys buvo centrifuguojamas 15 minučių 9000 aps/min jėgos lauke. Gautos nuosėdos buvo perkeltos į žinomo svorio mėgintuvėlius ir išdžiovintos. Ląstelių biomasė buvo apskaičiuota pagal formulę (1).

Į gautą supernatantą buvo įdėta 0,1 g (0,5 g/L) NaCl ir ištirpinta maišant. Norint nusodinti ksantaną, į mišinį buvo įpilta izopropanolio. Ksantano nusodinimui buvo naudoti ir kiti tirpikliai (izopropanolis, acetonas, bioetanolis, metanolis, bioetanolio ir acetono mišinys santykiu 1:1). Pilamo tirpiklio kiekis turi būti didesnis už fermentacijos mišinio kiekį tris kartus, išskyrus bioetanolį, kurio reikia šešis kartus daugiau. Po nusodinimo mišinys buvo centrifuguotas 15 minučių 9000 aps/min jėgos lauke. Po centrifugavimo gautos nuosėdos buvo praplautos distiliuotu vandeniu ir vėl centrifuguotos. Po centrifugavimo nuosėdos perkeltos į žinomos

masės mėgintuvėlių ir džiovinamos 105 °C temperatūroje iki tol, kol masė nebekito. Ksantano kiekis buvo nustatytas pagal (1) formulę.



2.2 pav. Principinė ksantano išskyrimo schema

2.2.3 Ksantano DPPH rodiklio slopinimas

DPPH radikalo slopinimo tyrimo metu buvo norima sužinoti kiek 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizuoja ksantanas. Buvo paruošta emulsija, kurioje buvo supilta 10 g saulėgražų aliejaus, 0,66 g Tween 20 reagento, kuris atliko emulsiklio funkciją ir 22,3 g fosfato buferio, kurio pH buvo 7,0. Emulsija buvo maišoma 1 minutę.

2 ml polisacharidų tirpalo buvo supilta į mėgintuvėlį, į jį taip pat įpilta 1 ml metanolio ir DPPH tirpalo. Antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas išmatavus mėginių šviesos sugertį 515 nm bangos ilgyje. Kaip kontrolinis bandinys buvo naudotas etanolio ir DPPH tirpalas. DPPH slopinimas apskaičiuotas pagal (5) formulę [48].

$$\text{slopinimas (\%)} = \left(\frac{A_B - A_A}{A_B} \right) \times 100 \quad (5)$$

čia: A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje,

A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje.

2.3 Ksantano ir alginato išskyrimo metu naudotos aparatūros sąrašas

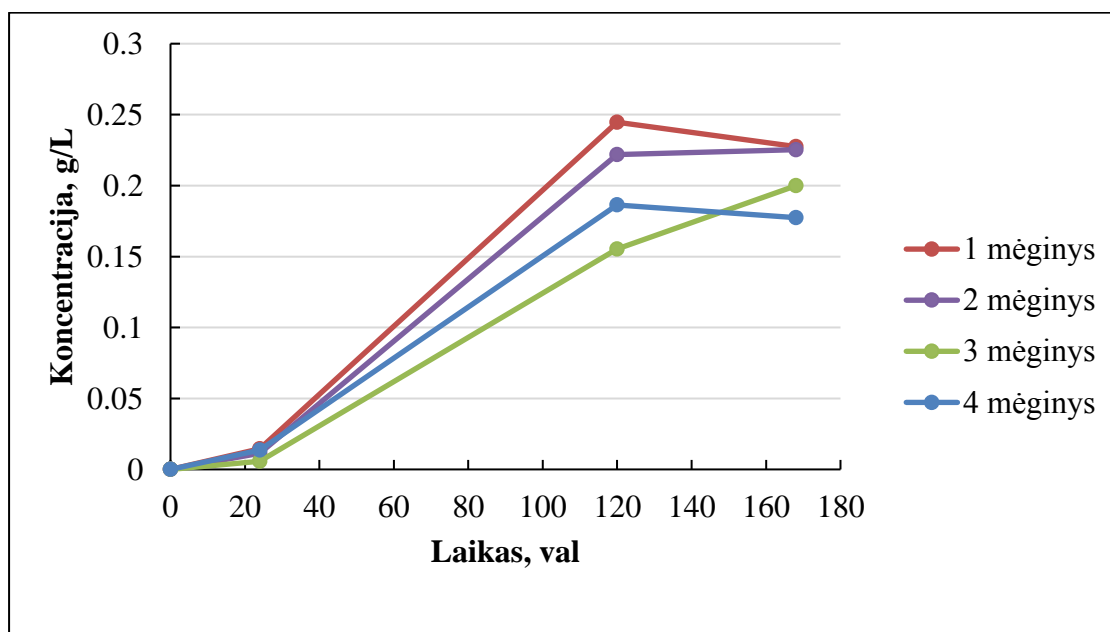
- Centrifuga „Universal 320 R“;
- Autoklavas „Certoclav“;
- Termostatuojamas kratytuvas „Biosan ES-20“;
- Spektrofotometras „Shimadzu UV-1280“;
- pH-metras „Winlab“;
- Termostatas „Binder“;
- Laminaras „Telstar BV-100“;
- 8. Termostatuojama vandens vonelė „Biosan“;
- Magnetinė maišyklė „Heidolph“;
- Svarstyklės „Shimadzu“.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Alginato gamybos optimizavimas

3.1.1. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo *Azotobacter* terpėje įvertinimas

Buvo atliktas tyrimas, kurio metu išsiaiškinome kokių intensyvumu auga *Azotobacter vinelandii* bakterijos *Azotobacter* terpėje. Tam buvo panaudoti keturi bakterijų mėginiai, kurie buvo perkelti į mėgintuvėlius su *Azotobacter* terpe ir inkubuojami termostatuojamame kratytuve 7 paras, 28 °C temperatūroje. Jų šviesos sugertis buvo matuota 540 nm ilgio bangoje, po 24, 96 ir po 168 valandų, o gauti rezultatai pavaizduoti paveiksle (žr. 3.1 pav.). Iš gautų rezultatų matyti, kad bakterijų mėginių augimas skyrėsi, nors jos ir buvo augintos toje pačioje terpėje. Tai galėjo nutikti dėl netolygaus terpės medžiagų pasiskirstymo mėgintuvėliuose. Mikroorganizmų koncentracija 1 mėginyje, praėjus 168 val. nuo inkubacijos pradžios – 0,228 g/L, o 2 mėginyje – 0,225 g/L, 3 mėginyje – 0,22 g/L, 4 mėginyje – 0,177 g/L. Tolesniems tyrimams buvo pasirinkti 1 ir 2 mėginiai, nes pagal šviesos sugertį juose mikroorganizmų koncentracija išaugo labiausiai.

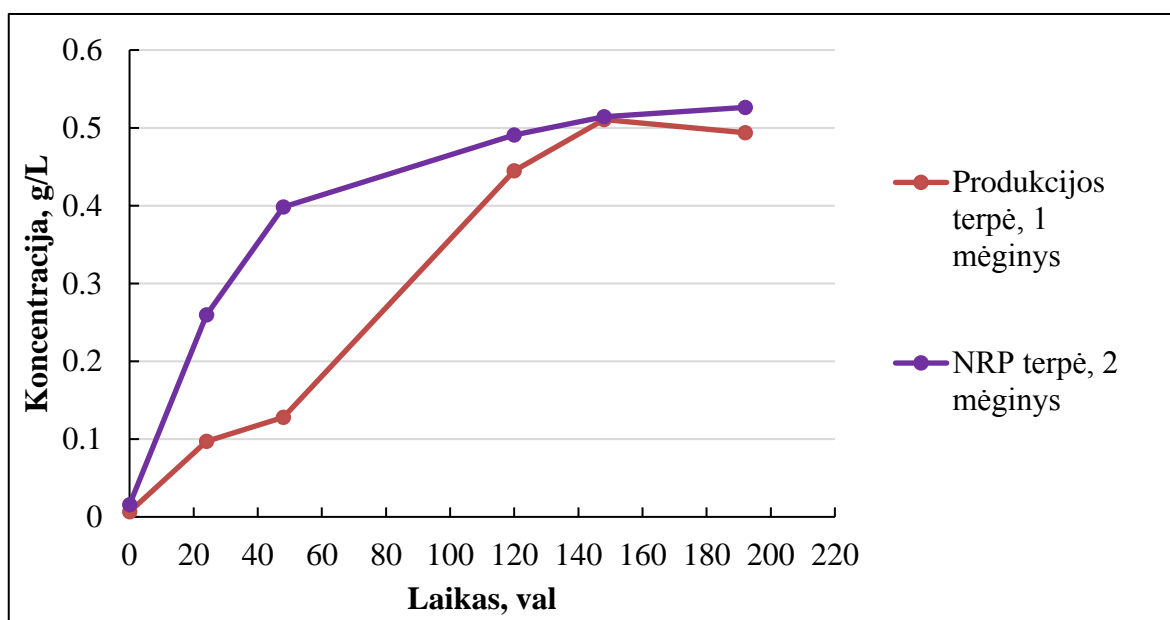


3.1 pav. *Azotobacter vinelandii* augimas *Azotobacter* terpėje

3.1.2 *Azotobacter vinelandii* augimo skirtingose terpėse įvertinimas

Siekiant palyginti *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo intensyvumą ir susidariusio alginato koncentraciją skirtingose terpėse buvo pasirinktos NRP ir produkcijos terpės.

Tiriant abiejų terpių poveikį buvo paimti 3 ml 1 mėginio ir supilta į 100 ml NRP terpės ir 3 ml 2 mėginio ir supilta į 100 ml produkcijos terpės. Terpės su inokuliais buvo inkubuotos termostatuojamame kratytuve 192 valandas, palaikant 28 °C temperatūrą ir 160 aps/min apsisukimo greitį. Bakterijų koncentracija buvo stebėta matuojant šviesos sugertį 540 nm ilgio bangoje. Produkcijos terpėje augusios bakterijos iš 1 mėginio per inkubacijos laikotarpį pasiekė 0,53 g/L, o NRP terpėje augusios 2 mėginio bakterijos – 0,49 g/L koncentracijas.



3.2 pav. *Azotobacter vinelandii* augimas NRP ir produkcijos terpėse

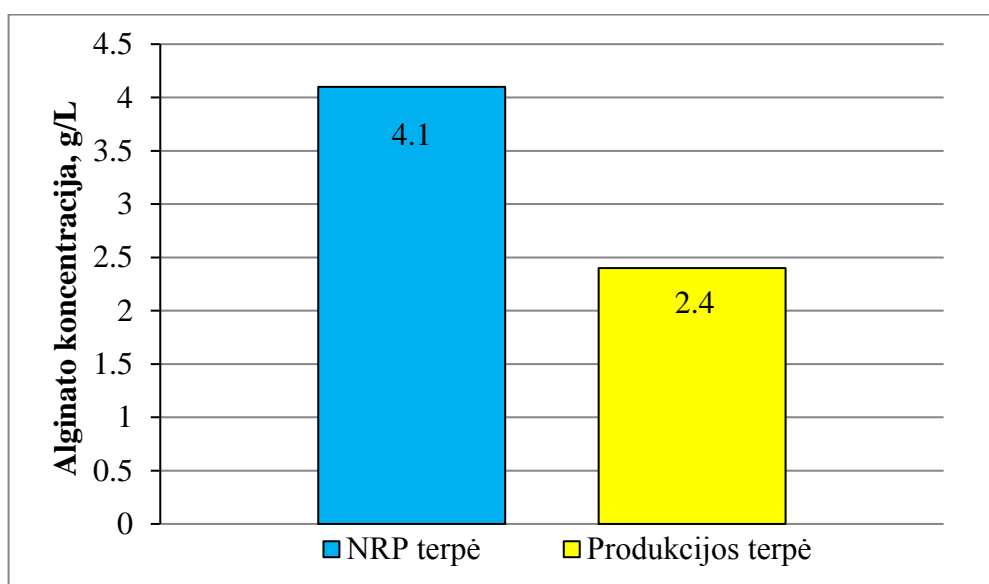
NRP terpėje dvi paras bakterijų augimas buvo gana intensyvus, tačiau paskui jų augimas pradėjo lėtėti ir lėtėjo iki pat tyrimo pabaigos.

Produkcijos terpėje augusių bakterijų koncentracija intensyviai ir tolygiai didėjo nuo antros iki šeštos paros. Tačiau paskui buvo pasiekta stacionarioji augimo fazė ir bakterijų koncentracija pradėjo mažėti.

Iš rezultatų (žr. 3.2 pav.) matyti, jog didesnė bakterijų koncentracija tyrimo pabaigoje buvo gauta naudojant NRP terpę.

3.1.3 Alginato koncentracijos priklausomybės nuo terpės įvertinimas

Norint įvertinti alginato koncentracijos priklausomybę nuo naudojamos terpės, iš dviejų mėginių, kurie buvo auginti skirtingose (NRP ir produkcijos) terpėse vienodomis sąlygomis, buvo išskirtas alginatas. Iš rezultatų (žr. 3.3 pav.) matyti, kad išskirto alginato koncentracijos skirtingose terpėse skyrėsi. Iš 1 litro NRP terpėje augusių bakterijų inokulianto buvo išgauta 4,1 g alginato. Iš 1 litro produkcijos terpėje augusių bakterijų inokulianto - 2,4 g. Galime daryti išvadą, kad naudojant NRP terpę buvo gauti geresni rezultatai.



3.3 pav. Gauto alginato koncentracijos priklausomybė nuo skirtingų terpių

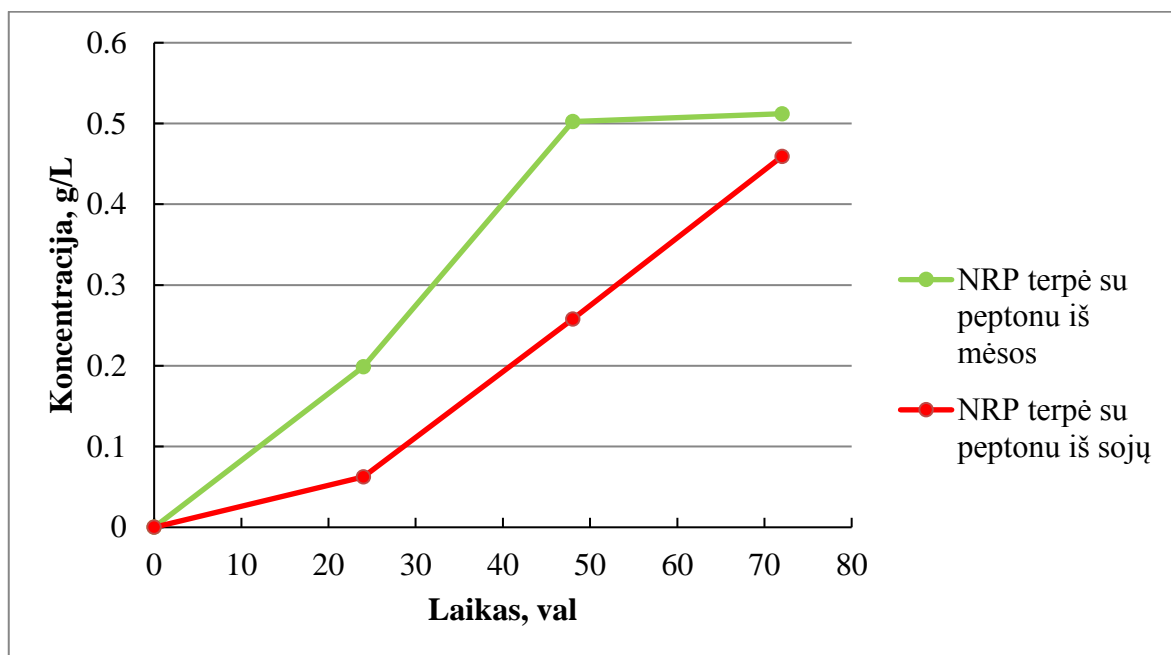
3.1.4. Alginato gamybos optimizavimas naudojant skirtingų šaltinių peptoną

Norint sužinoti, kokią įtaką alginato koncentracijai daro iš skirtingų šaltinių gautas peptonas, buvo atliktas tyrimas, kurio metu buvo paruošti du NRP terpės mėginiai. Viename naudotas peptonas iš mėsos, o kitame - iš sojų. Peptono koncentracija abiejuose mėginiuose buvo vienoda.

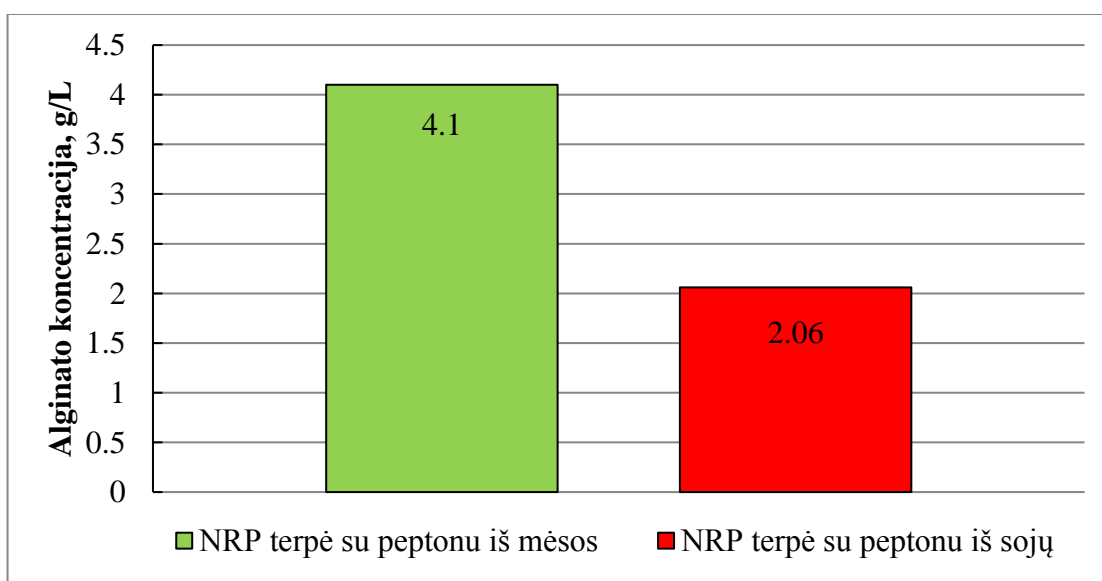
Mėginyje, kuriame buvo naudojamas peptonas iš mėsos iki 48 val. bakterijų koncentracija didėjo tolygiai, o po to buvo pasiekta stacionarioji augimo fazė. Galutinė bakterijų koncentracija šiame mėginyje buvo 0,51 g/L.

Terpėje su peptonu iš sojų inkubavimo pradžioje bakterijų koncentracija didėjo lėtai, tačiau paskui augimas vyko tolygiai. Galutinė bakterijų koncentracija šiame mėginyje buvo 0,46 g/L.

Iš rezultatų, pavaizduotų 3.4 pav. galime matyti, jog bakterijų koncentracija terpėje, kurioje buvo naudojamas peptonas iš mėsos buvo didesnė.



3.4 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų koncentracijos priklausomybė nuo NRP terpėje naudoto peptono

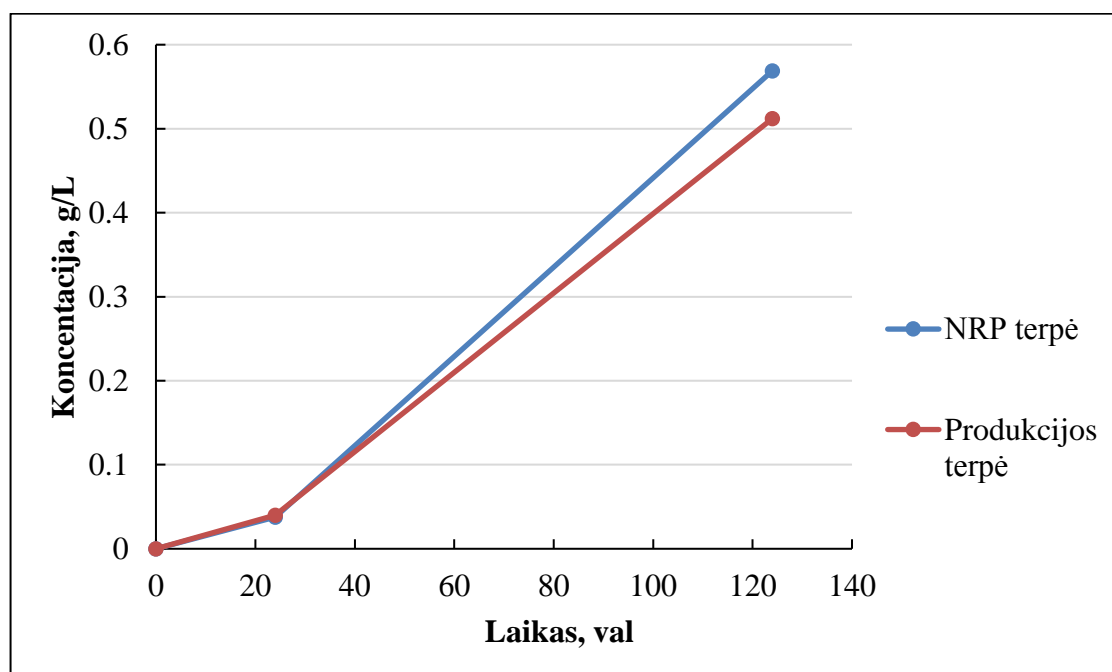


3.4 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo NRP terpėje naudojamo peptono

Iš rezultatų pavaizduotų 3.4 pav. aiškiai matyti, jog didesnę alginato koncentraciją gavome naudodami peptoną iš mėsos. Alginato, gauto iš terpės su peptonu iš mėsos, koncentracija (4,1 g/L) buvo beveik du kartus didesnė negu iš terpės, kurioje buvo naudotas peptonas iš sojų (2,06 g/L).

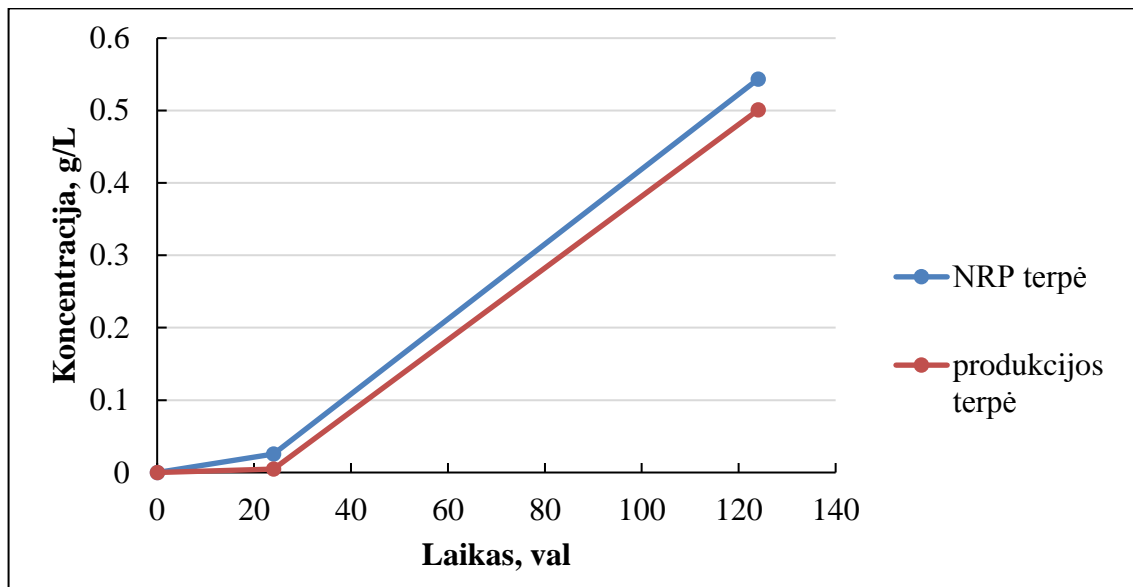
3.1.5 Alginato gamybos optimizavimas naudojant fenolines rūgštis

Siekiant optimizuoti alginato gamybą buvo atlikti tyrimai su fenolinėmis rūgštimis. Šios rūgštys buvo naudotos kaip papildomi anglies šaltiniai NRP ir produkcijos terpėse. Šiam tyrimui buvo pasirinktos dvi fenolinės rūgštys – 4- hidroksifenilacto ir 3,4- dihidroksibenzoinė rūgštys.



3.5 pav. *Azotobacter vinelandii* augimas NRP ir produkcijos terpėse su 4- hidroksifenilacto rūgšties 0,01 M koncentracija

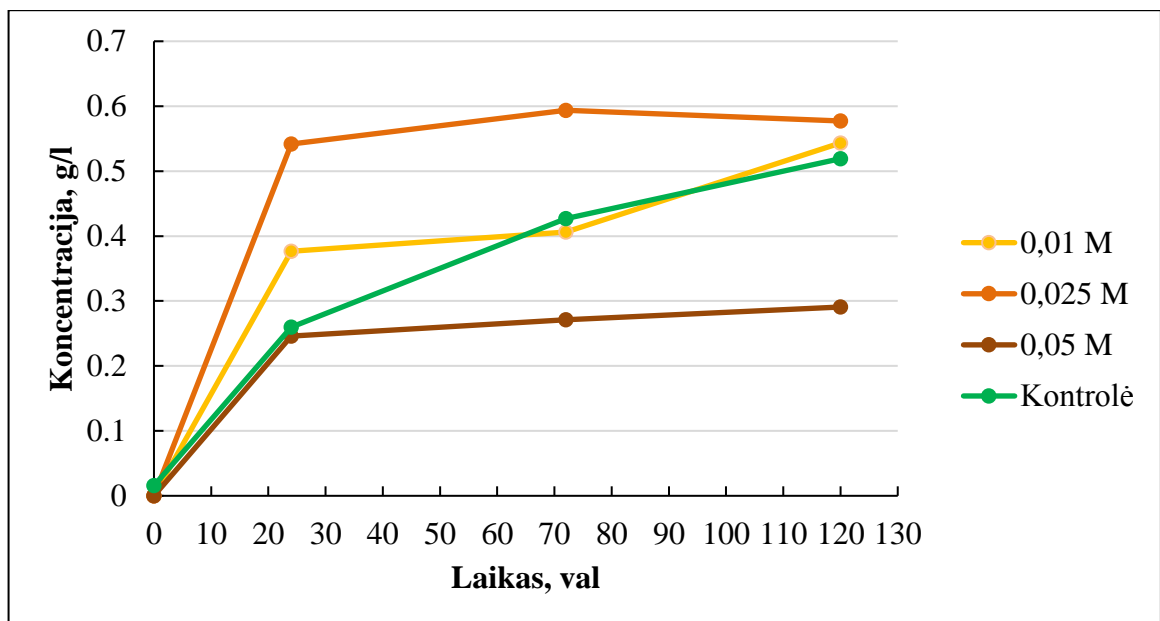
Bandiniuose su 4- hidroksifenilacto rūgštimi pirmąją inkubavimo parą bakterijos abiejose terpėse augo labai panašiai, tačiau vėliau galime matyti, jog NRP terpėje su fenolinės rūgšties priedu bakterijų augimas buvo intensyvesnis (žr. 3.5 pav.).



3.6 pav. *Azotobacter vinelandii* augimas NRP ir produkcijos terpėse su 0,01 M 3,4-dihidroksibenzoine rūgštimi

Bandiniuose, kuriuose kaip priedas buvo naudota 3,4- dihidroksibenzoinė rūgštis ir naudota NRP terpė parodė geresnius bakterijų koncentracijos augimo rezultatus (0,54 g/L). Nuo pat inkubavimo pradžios bakterijų koncentracija šiame mėginyje buvo didesnė nei produkcijos terpėje (0,50 g/L).

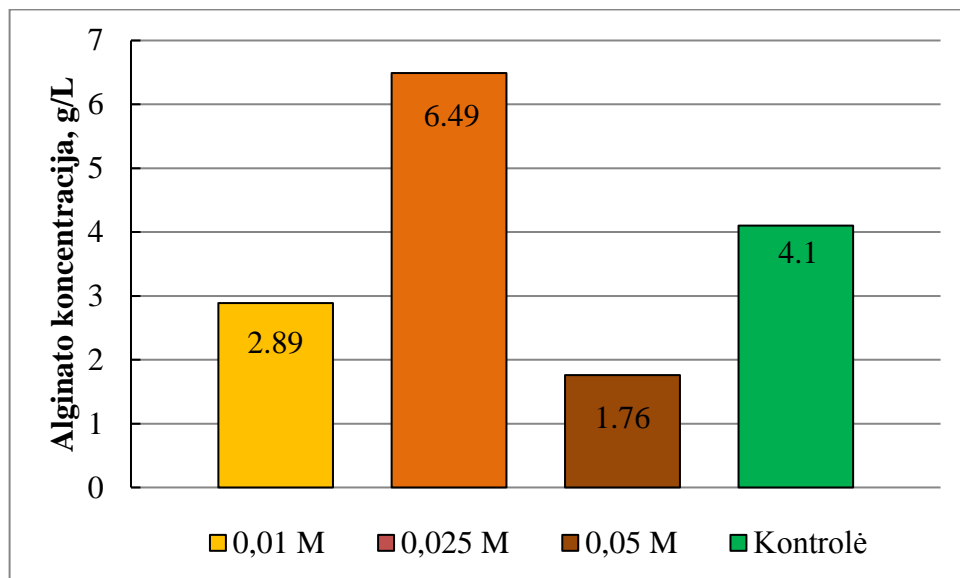
Įpylus į bandinius fenolinių rūgščių tirpalus buvo pastebėta, jog didesnė mikroorganizmų koncentracija naudojant abi fenolines rūgštis išliko didesnė NRP terpėje. Buvo nutarta tolimesnius tyrimus su fenolinėmis rūgštimis atlikti naudojant NRP terpę.



3.7 pav. *Azotobacter vinelandii* augimas NRP terpėje su skirtingomis 4- hidroksifenilacto rūgšties koncentracijomis

Tiriant alginato koncentracijos priklausomybę nuo fenolinių rūgščių koncentracijos terpėje, buvo pagaminti trys NRP terpės mėginiai, į kuriuos buvo įpilti skirtingų koncentracijų rūgščių tirpalai (0,01 M, 0,025 M, 0,05 M). Šio tyrimo metu buvo stebimas biomasės augimas šiuose trijuose mėginiuose, taip pat buvo stebimas kontrolinis bandinys, kuriame NRP terpė buvo be priedų (žr. 3.7 pav.).

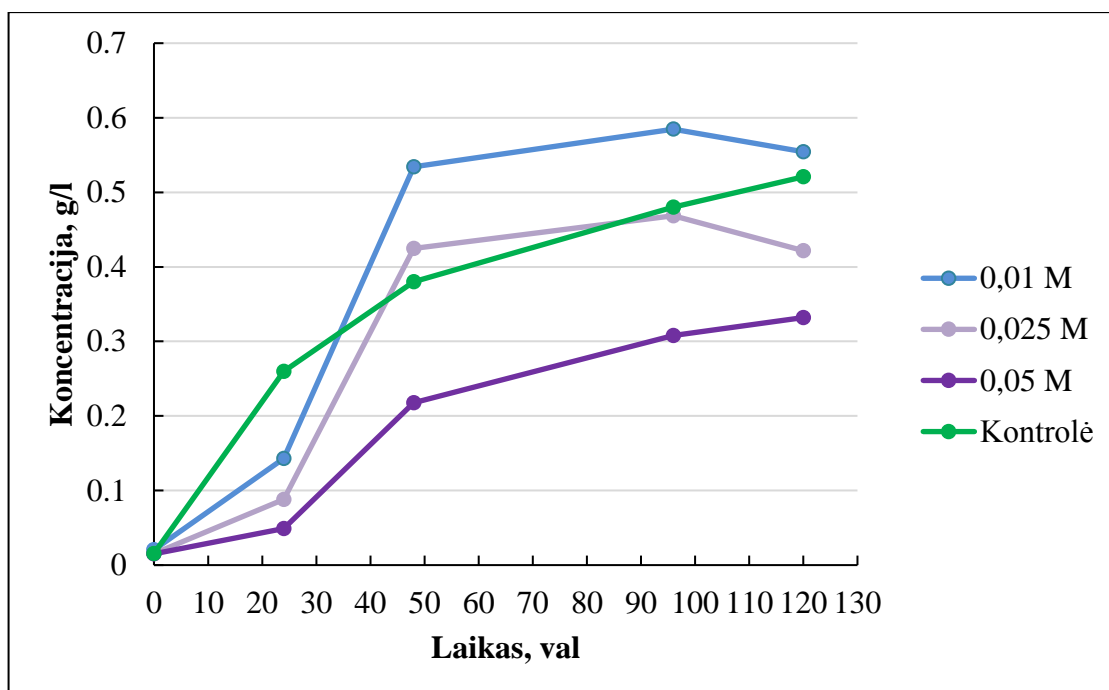
Gauti rezultatai rodo, kad bakterijų augimas mėginiuose, kuriuose yra 0,01 M ir 0,025 M 4-hidroksifenilacto rūgšties koncentracijos, buvo intensyvesnis negu kontroliniame bandinyje. Mėginyje, kuriame fenolinės rūgšties koncentracija buvo 0,01 M, po 120 valandų inkubacijos buvo pasiekta 0,58 g/L bakterijų koncentracija. Mėginyje, kuriame rūgšties koncentracija buvo 0,025 M – 0,54 g/L. Didžiausią rūgšties koncentraciją (0,05 M) turinčiame mėginyje vyko mažiausias bakterijų koncentracijos augimas (0,29 g/L), jame bakterijų koncentracija buvo mažesnė negu kontroliniame mėginyje – 0,51 g/L.



3.8 pav. Alginato koncentracija mėginiuose su skirtingomis 4- hidroksifenilacto rūgšties koncentracijomis

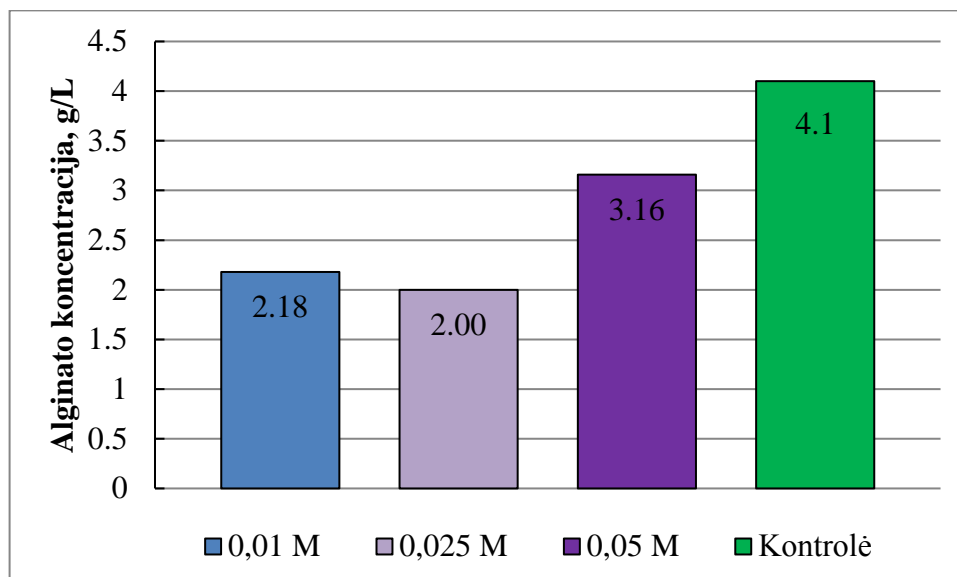
Išskiriant alginatą iš mėginių, kuriuose buvo įmaišyti skirtingų koncentracijų 4-hidroksifenilacto rūgšties, buvo gauti rezultatai, kuriuose galime įžvelgti dėsningumą, jog kuo didesnė bakterijų koncentracija užaugo mėginyje, tuo daugiau iš mėginių išskyrėme alginato (žr. 3.8 pav.). Remiantis tuo, kad *Azotobacter vinelandii* geriausiai augo NRP terpėje, kurioje buvo įmaišyta 0,025 M koncentracijos 4- hidroksifenilacto rūgšties, išskiriant alginatą iš šio mėginio jo koncentracija buvo gauta didžiausia – 6,49 g/L. Su mėginiais, turinčiais savo sudėtyje kitų koncentracijų rūgšties, dėsningumas išlieka – iš bandinio, kur bakterijų koncentracija buvo

mažiausia (rūgšties koncentracija 0,05 M), buvo išskirtas mažiausias alginato kiekis -1,76, o iš bandinio, kuriame buvo mažiausia rūgšties koncentracija išskyrėme alginato 2,89 g/L. Palyginus gautus rezultatus su kontroliniu bandiniu, galime padaryti išvadą, jog 0,025 M koncentracijos rūgštis bandinyje turėjo teigiamą įtaką alginato koncentracijai – ji padidėjo 2,39 g/L. Lyginant kitus du mėginius su kontroliniu mėginiu matosi, jog juose rūgštis sumažino alginato koncentraciją.



3.9 pav. *Azotobacter vinelandii* augimas NRP terpėje su skirtingomis 3,4- dihidroksibenzoinės rūgšties koncentracijomis

Iš rezultatų, pateiktų paveiksle (žr. 3.9 pav.) galime matyti, jog didžiausia bakterijų koncentracija buvo pasiekta naudojant 0,01 M koncentracijos 3,4- dihidroksibenzoinės rūgšties tirpalą (0,55 g/L), naudojant 0,025 M rūgšties koncentraciją bakterijų kiekis mėginyje buvo 0,42 g/L, o mažiausia bakterijų koncentracija (0,33 g/L) gauta naudojant 0,05 M koncentracijos rūgštį. Visų trijų mėginių kreivės panašios į standartines mikroorganizmų augimo kreives – iki 48 valandos vyksta gana intensyvus augimas, nuo 48 valandos iki 95 valandos augimas lėtas, o po 95 val. vyksta stacionarioji fazė. Lyginant su kontroliniu bandiniu visi trys mėginiai su rūgšties tirpalu stacionariąją fazę pasiekė greičiau. Taip pat tik mėginyje, kuriame rūgšties koncentracija buvo 0,01 M bakterijų kiekis buvo didesnis negu kontroliniame mėginyje.

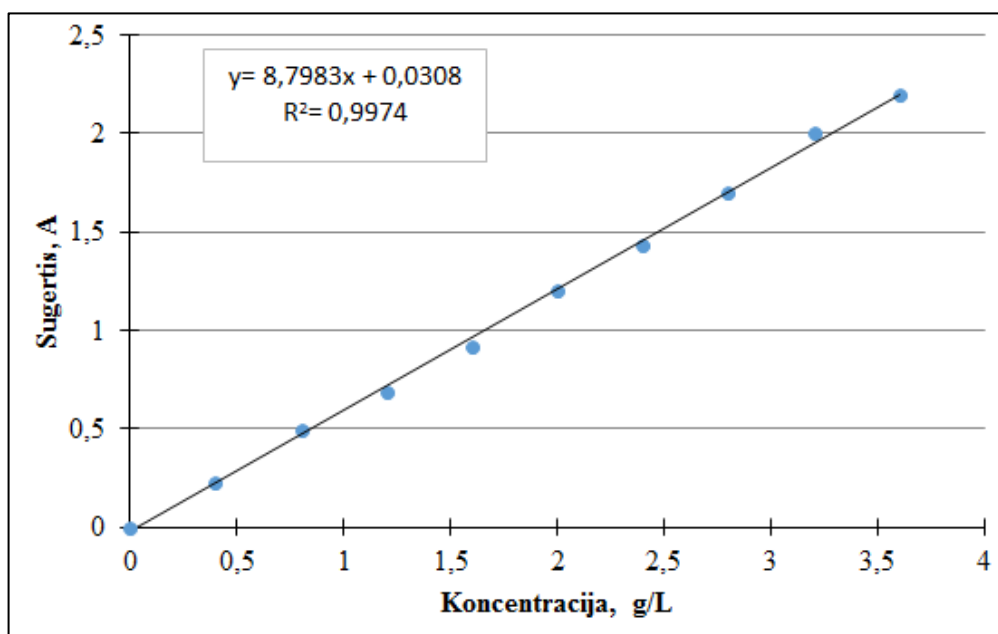


3.10 pav. Alginato koncentracija mėginiuose su skirtingomis 3,4- dihidroksibenzoinės rūgšties koncentracijomis.

Iš rezultatų (žr. 3.10 pav.) matome, kad alginato koncentracija, naudojant 3,4- dihidroksibenzoinę rūgštį kaip papildomą anglies šaltinį, nei su viena rūgšties koncentracija nebuvo pasiekusi kontrolinio bandinio alginato kiekio. Iš visų mėginių buvo gautas mažesnis alginato kiekis. Lyginant skirtingų koncentracijų bandinius geriausi rezultatai buvo gauti naudojant 0,05 M rūgšties koncentraciją, iš šio mėginio buvo gauta 3,16 g/L alginato. Mažesni alginato kiekį (2,18 g/L) išskyrėme naudodami 0,01 M koncentraciją, o mažiausią kiekį (2,00 g/L) - 0,025 M koncentracijos rūgštį.

3.1.6 Angliavandenių įvertinimas antrono reagentu

Buvo atliktas tyrimas, kurio metu siekta nustatyti likusių anglies šaltinių koncentracijas išdžiovinto alginato mėginiuose. Šiam tyrimui buvo paruoštas ir naudotas antrono reagentas. Alginato mėginiai buvo hidrolizuojami 3 valandas 2,5 N druskos rūgštimi, atvėsinti iki kambario temperatūros. Toliau mėginiai neutralizuoti Na_2CO_3 ir praskiedus distiliuotu vandeniu nucentrifuguoti. Į 0,5 ml nucentrifuguotų mėginių supernatantus buvo supilta po 4 ml antrono reagento ir mėginiai kaitinti verdančio vandens vonelėje 8 minutes. Atvėsinus mėginius spektrofotometru buvo išmatuota šviesos sugertis 630 nm ilgio bangoje. Angliavandenių kiekis nustatytas naudojant kalibracinę kreivę (žr. 3.11 pav.), kaip standartą naudojant 0,1 g/L gliukozės tirpalą.



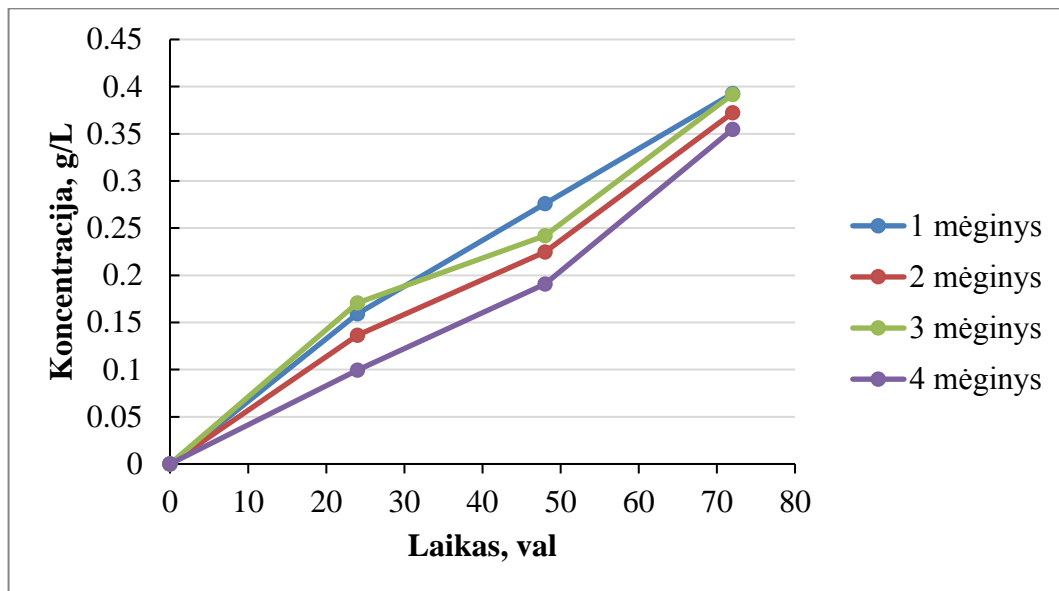
3.11 pav. Kalibracinė kreivė angliavandenių nustatymui antrono reagentu

Buvo gautos likusių angliavandenių koncentracijos. Produkcijos terpėje iš 40 g/L buvo likę 0,32 g/L, NRP - 0,14 g/L, o terpėje, kurioje papildomai buvo naudota 0,25 g/L 4-hidroksifenilacto rūgšties - 0,63 g/L angliavandenių.

3.2 Ksantano gamybos optimizavimas

3.2.1 *Xanthomonas campestris* bakterijų YM terpėje augimo įvertinimas

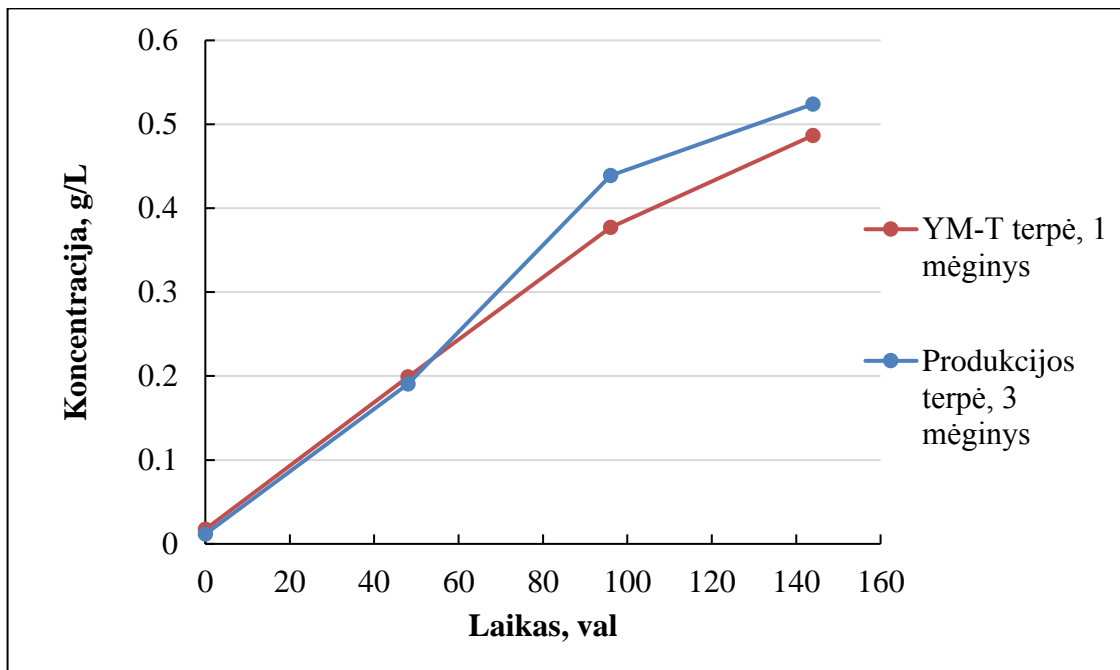
Buvo atliktas tyrimas, kurio tikslas buvo nustatyti koku intensyvumu auga *Xanthomonas campestris* bakterijos YM terpėje. Šio tyrimo metu bakterijų mėginiai buvo perkelti į YM terpę. Keturi mėginiai buvo laikomi termostatuojamame kratytuve, 28 °C temperatūroje, terpės pH=7. Šie mėginiai kratytuve buvo laikomi 72 valandas, matuojant jų šviesos sugertį 540 nm bangos ilgyje kas 24 val. Grafike (žr. 3.12 pav.) matyti, jog bakterijų augimas skirtinguose mėginiuose minimaliai skiriasi, nors mėginiai ir buvo inkubuoti vienodomis sąlygomis, identiškose sudėties terpėje. 1 mėginyje po 72 valandų inkubavimo buvo nustatyta 0,392 g/L bakterijų koncentracija, o 3 mėginyje – 0,391 g/L. Dėl šiųose mėginiuose esančių bakterijų koncentracijos panašumo nutarta šiuos mėginius naudoti tolesniuose tyrimuose.



3.12 pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimas YM-T terpėje

3.2.2 Bakterijų koncentracijos nuo terpės priklausomybės įvertinimas

Tam, kad galėtume nusakyti kokią įtaką *Xanthomonas campestris* bakterijų augimui turi skirtingos augimo terpės buvo atliktas tyrimas su produkcijos ir YM-T terpėmis. Į YM-T terpę buvo perkeltas **1** mėginys, o į produkcijos terpę – **3**. Bakterijų inokuliatų šviesos sugertis buvo matuojama 540 nm bangos ilgyje 48, 96 ir 144 valandomis. Paruošti inokuliatai laikomi termostatuojamame kratytuve, 28 °C temperatūroje. Kadangi bakterijų koncentracijos mėginiuose buvo labai panašios, tyrimo metu buvo tikimasi, jog bakterijoms augant skirtingose terpėse bus galima nusakyti terpės įtaką jų koncentracijai. 3.13 pav. pateikti duomenys rodo, kad bakterijos iki 48 valandos augo tolygiai, beveik vienodu intensyvumu ir jų koncentracija buvo labai panaši, praėjus daugiau laiko produkcijos terpėje koncentracija pradėjo didėti ir rodė pranašumą prieš YM-T terpę. Galutinė bakterijų koncentracija YM-T terpėje buvo 0,52 g/L, o produkcijos terpėje - 0,48 g/L.

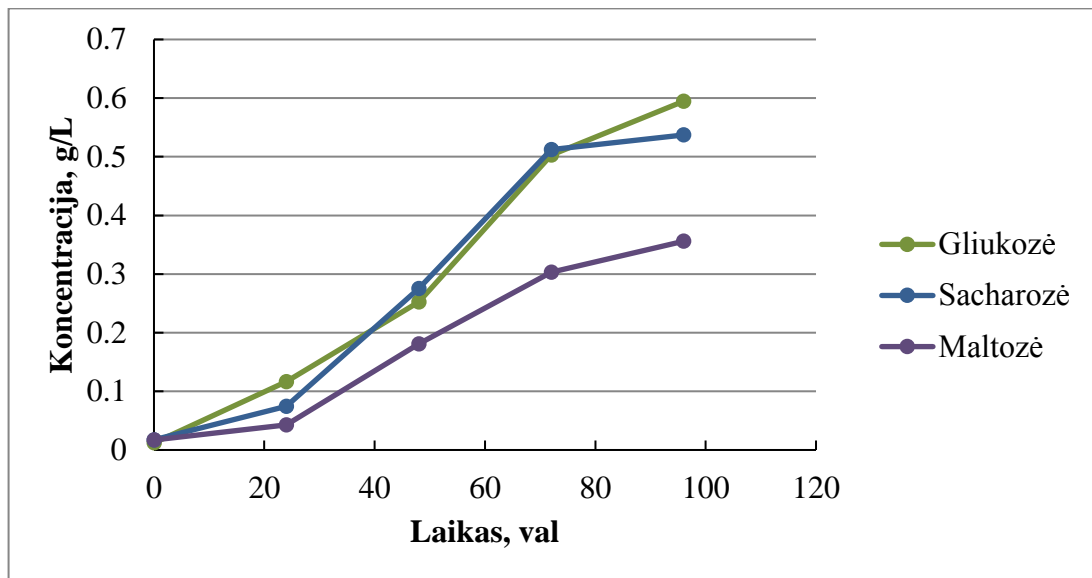


3.13 pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimas YM-T ir produkcijos terpėse

3.2.3 Ksantano gamybos optimizavimas naudojant skirtingus anglies šaltinius

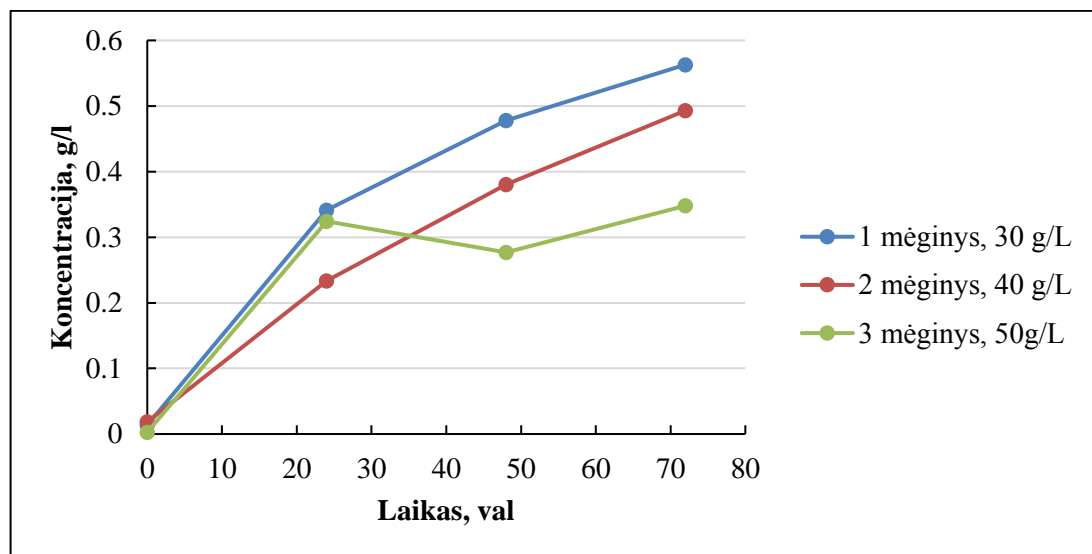
Buvo atliktas tyrimas, kurio metu buvo siekiama nustatyti kokį anglies šaltinį naudojant galima gauti didžiausią *Xanthomonas campestris* bakterijų koncentraciją. Šiam tyrimui buvo pasirinkta produkcijos terpė, paruošti trys mėginiai, kuriuose skyrėsi tik anglies šaltinis tačiau jo koncentracija mėginiuose buvo vienoda - 40 g/L. Kaip anglies šaltiniai buvo naudojama gliukozė, sacharozė ir maltozė. Į mėginius buvo patalpinti bakterijų mėginiai, jie stebėti 96 valandas, matuojant šviesos sugertį kas 24 val., 540 nm bangos ilgyje. Paruošti inokuliatų laikomi termostatuojamame kratytuve, 28 °C temperatūroje.

Tyrimas parodė, jog didžiausia bakterijų koncentracija buvo gauta naudojant gliukozę – 0,59 g/L. Naudojant sacharozę bakterijų koncentracija buvo 0,54 g/L, o maltozė 0,36 g/L (žr. 3.14 pav.).



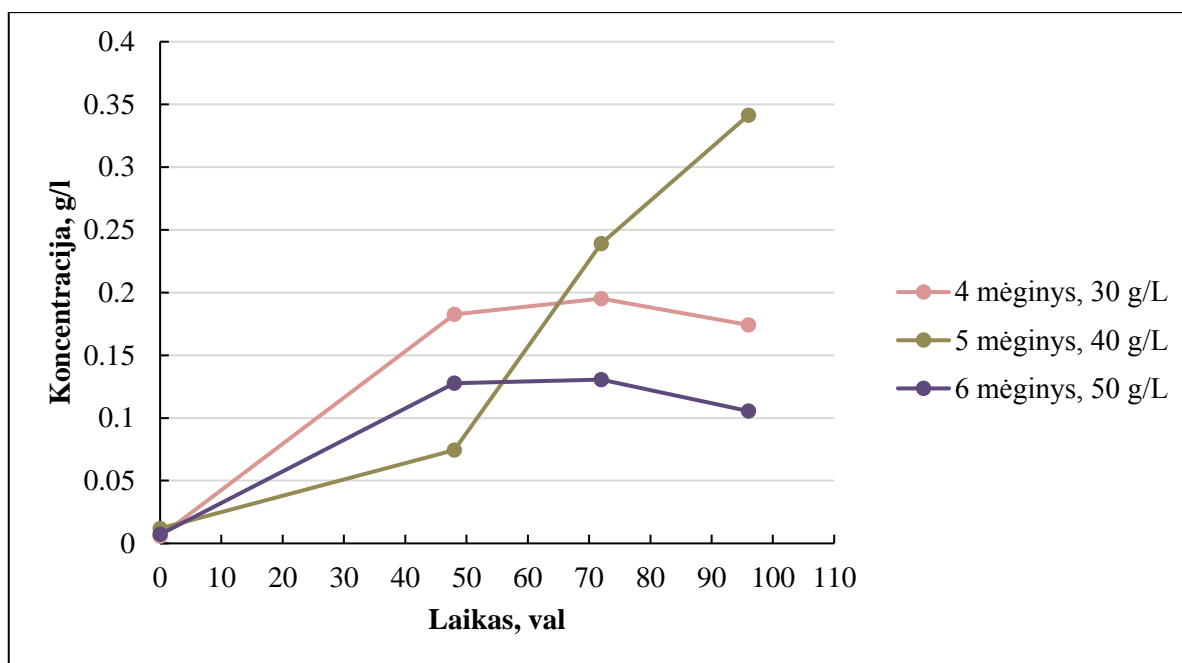
3.14 pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų koncentracijos priklausomybė nuo anglies šaltinių

Norint sužinoti, kaip *Xanthomonas campestris* bakterijų augimą lemia skirtingi anglies šaltiniai ir jų skirtingos koncentracijos, buvo atliktas tyrimas, kurio metu bakterijų mėginiai buvo patalpinti produkcijos terpėje, kurioje skyrėsi anglies šaltinių koncentracija. Šiam tyrimui, kaip anglies šaltiniai, buvo naudojamos gliukozė ir sacharozė. Buvo paruošti šeši mėginiai: **1** - gliukozės koncentracija terpėje 30 g/L; **2** - gliukozės koncentracija terpėje 40 g/L; **3** - gliukozės koncentracija terpėje 50 g/L; **4** - sacharozės koncentracija terpėje 30 g/L; **5** - sacharozės koncentracija terpėje 40 g/L; **6** - sacharozės koncentracija terpėje 50 g/L. Naudojant šias terpes buvo gauti rezultatai, kurie atsispindi 3.15 ir 3.16 paveiksluose.



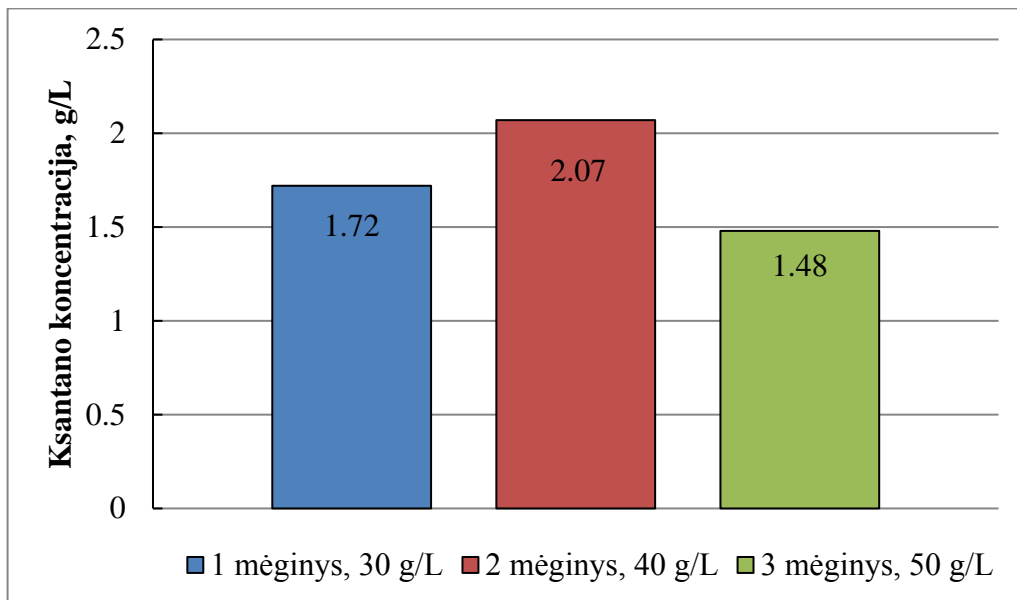
3.15 pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimas produkcijos terpėje, naudojant skirtingų koncentracijų anglies šaltinį – gliukozę

Rezultatuose, kurie pavaizduoti 3.15 pav. matoma, kad naudojant gliukozę kaip anglies šaltinį didžiausia bakterijų koncentracija (0,56 g/L) buvo pasiekta kai anglies šaltinio koncentracija terpėje buvo 30 g/L. 30 g/L ir 40 g/L gliukozės koncentracijas turinčiuose mėginiuose bakterijos augo panašiu pobūdžiu, tačiau **2** mėginyje bakterijų koncentracija išliko mažesnė (0,49 g/L). **3** mėginyje pirmąją parą bakterijų koncentracija buvo panaši kaip ir **1** bei **2** mėginyje, tačiau po pirmosios paros bakterijų kiekis terpėje pradėjo mažėti, vėliau vėl šiek tiek pakilo, tačiau išliko mažiausias (0,34 g/L).



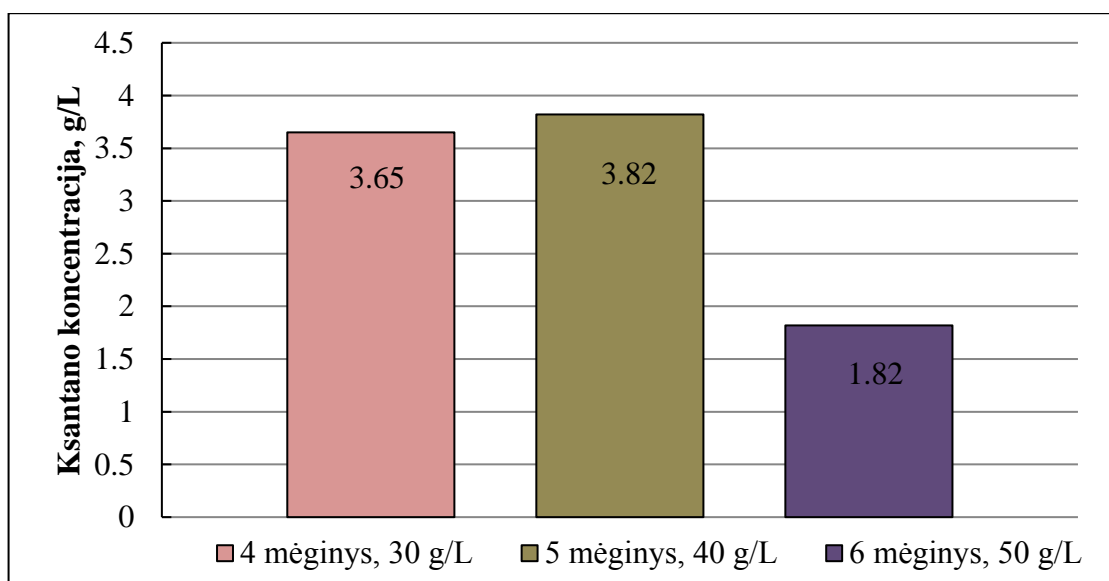
3.16 pav. *Xanthomonas campestris* bakterijų augimas produkcijos terpėje, naudojant skirtingų koncentracijų anglies šaltinį – sacharozę

Didžiausia *Xanthomonas campestris* bakterijų koncentracija (0,34 g/L), naudojant sacharozę kaip anglies šaltinį, buvo **5** mėginyje, kuriame sacharozės koncentracija buvo 40 g/L. Šiame mėginyje bakterijos augimo pradžioje dauginosi lėčiau negu **4** ir **6** mėginiuose. Nuo 48 valandos bakterijų koncentracija **5** mėginyje smarkiai išaugo. **4** ir **6** mėginiuose bakterijų koncentracija buvo mažesnė ir ties trečia para buvo pasiekta stacionarioji augimo stadija ir bakterijų dauginimasis ir augimas sustojo, o bėgant laikui bakterijų pradėjo mažėti. Paveiksle matyti, jog mažiausia bakterijų koncentracija (0,1 g/L) buvo pasiekta ten, kur buvo didžiausia sacharozės koncentracija – **6** mėginyje. **5** mėginyje bakterijų koncentracija pasiekė 0,17 g/L (žr. 3.16 pav.).



3.17 pav. Ksantano koncentracija naudojant skirtingas gliukozės koncentracijas produkcijos terpėje

Kadangi produkcijos terpėje buvo naudotos skirtingos gliukozės koncentracijos, iš šių terpių išskiriant ksantaną buvo gautos skirtingos jo koncentracijos. 3.17 pav. galima matyti, jog didžiausią (2,07 g/L) ksantano koncentraciją pavyko išskirti, kai terpėje buvo 40 g/L gliukozės koncentracija, t.y. iš 2 mėginio. Mažiausias ksantano kiekis (1,48 g/L) buvo išskirtas naudojant didžiausią gliukozės koncentraciją - 50 g/L, tai atspindi mėginys 3. Iš 1 mėginio buvo išskirta 1,72 g/L ksantano.



3.18 pav. Ksantano koncentracija naudojant skirtingas sacharozės koncentracijas produkcijos terpėje

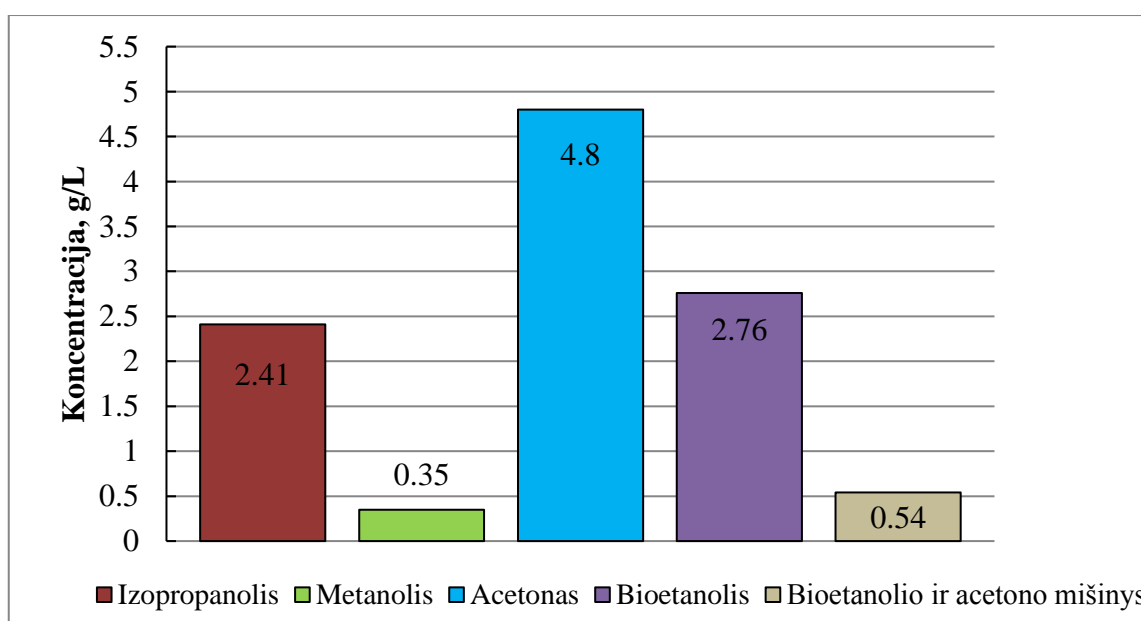
Naudojant skirtingas sacharozės koncentracijas produkcijos terpėje galima matyti, jog didžiausią ksantano koncentraciją pavyko išskirti iš 5 mėginio, kuriame buvo 40 g/L sacharozės (žr. 3.18 pav.). Išskirtas ksantano kiekis buvo 3,82 g/L. Panašūs rezultatai buvo gauti ksantaną išskyrinėjant iš 4 mėginio, iš jo išskirta 3,65 g/L ksantano. Mažiausias ksantano kiekis buvo išskirtas iš 6 mėginio, kuriame sacharozės koncentraciją - 50 g/L, jame ksantano koncentracija buvo 1,82 g/L.

Apibendrinant 3.17 pav. ir 3.18 pav. paveikslus galima teigti, jog didžiausia bakterijų koncentracija terpėje nebūtinai lemia didžiausią išskirto ksantano kiekį. Taip pat aiškiai matyti, jog didesnės ksantano koncentracijos buvo gautos naudojant sacharozę. Tinkamiausia anglies šaltinio koncentracija, kurią naudojant buvo išskirti didžiausi ksantano kiekiai - 40 g/L.

3.2.4 Ksantano gamybos optimizavimas naudojant skirtingus tirpiklius

Norint sužinoti su koku reagentu iš inokuliatų buvo išskirtas didesnis ksantano kiekis, buvo atliktas tyrimas su skirtingais tirpikliais (izopropanoliu, acetonu, bioetanoliu, metanoliu, bioetanolio ir acetono mišiniu santykiu 1:1). Tyrimui buvo naudoti mėginiai, kurie buvo auginami standartinėje produkcijos terpėje naudojant sacharozę kaip anglies šaltinį.

Iš rezultatų, pavaizduotų grafike 3.19 pav. galima daryti išvadą, jog didžiausias ksantano kiekis buvo išskirtas naudojant acetoną (4,8 g/L), toliau – izopropanolį (2,41 g/L), bioetanolį (2,76 g/L). Mažiausiai ksantano buvo išskirta naudojant metanolį (0,35 g/L) ir bioetanolio ir acetono mišinį (0,54 g/L).

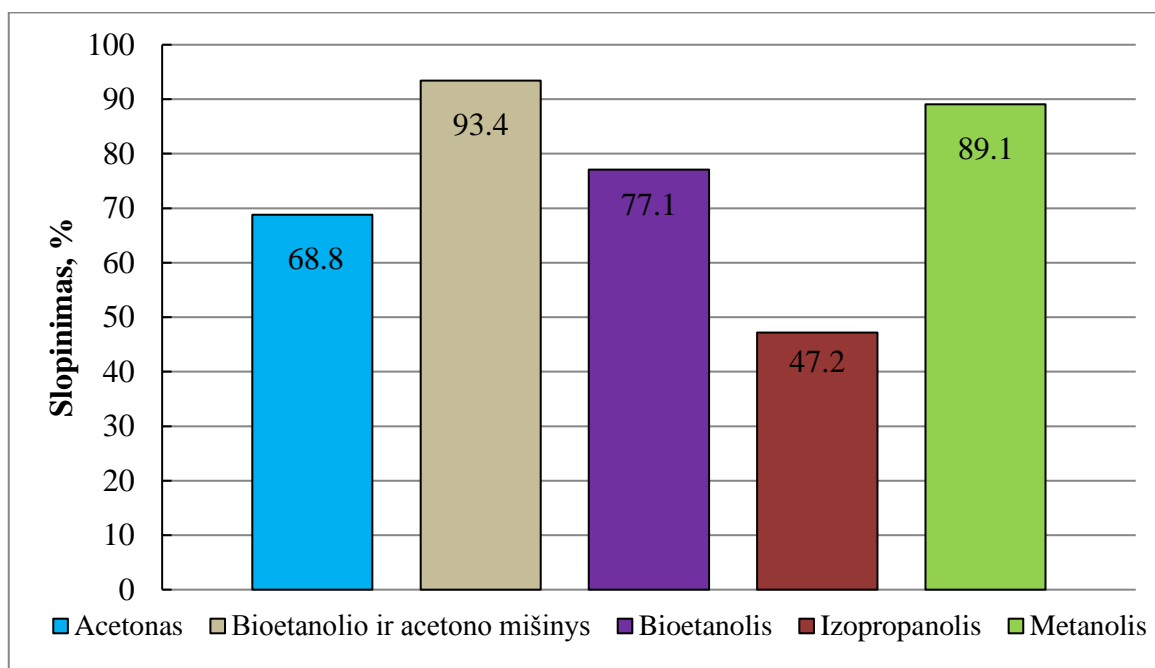


3.19 pav. Ksantano koncentracija naudojant skirtingus reagentus išgavimo metu

3.2.5 Išskirto ksantano DPPH radikalo slopinimo įvertinimas

Norint nustatyti ksantano aktyvumą buvo atliktas DPPH radikalo slopinimo tyrimas. Šio tyrimo metu ankstesniuose tyrimuose išskirtas ksantanas naudojamas matuojant ir įvertinant kiek procentų stabilaus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo jis neutralizuoja.

Šiam tyrimui buvo naudoti ksantano milteliai, kurie buvo išgauti naudojant skirtingus reagentus – acetoną, bioetanolio ir acetono mišinį santykiu 1:1, bioetanolį, izopropanolį ir metanolį. Rezultatuose (žr. 3.20 pav.) matoma, jog didžiausias antioksidacinis aktyvumas (93,4%) buvo gautas tyrimui naudojant ksantaną išskirtą su bioetanolio ir acetono mišiniu. Ksantano, kuris išskirtas naudojant metanolį antioksidacinis aktyvumas buvo 89,1%, ksantano, išskirto naudojant bioetanolį - 77,1%, acetoną - 68,8%, izopropanolį - 47,2 %.

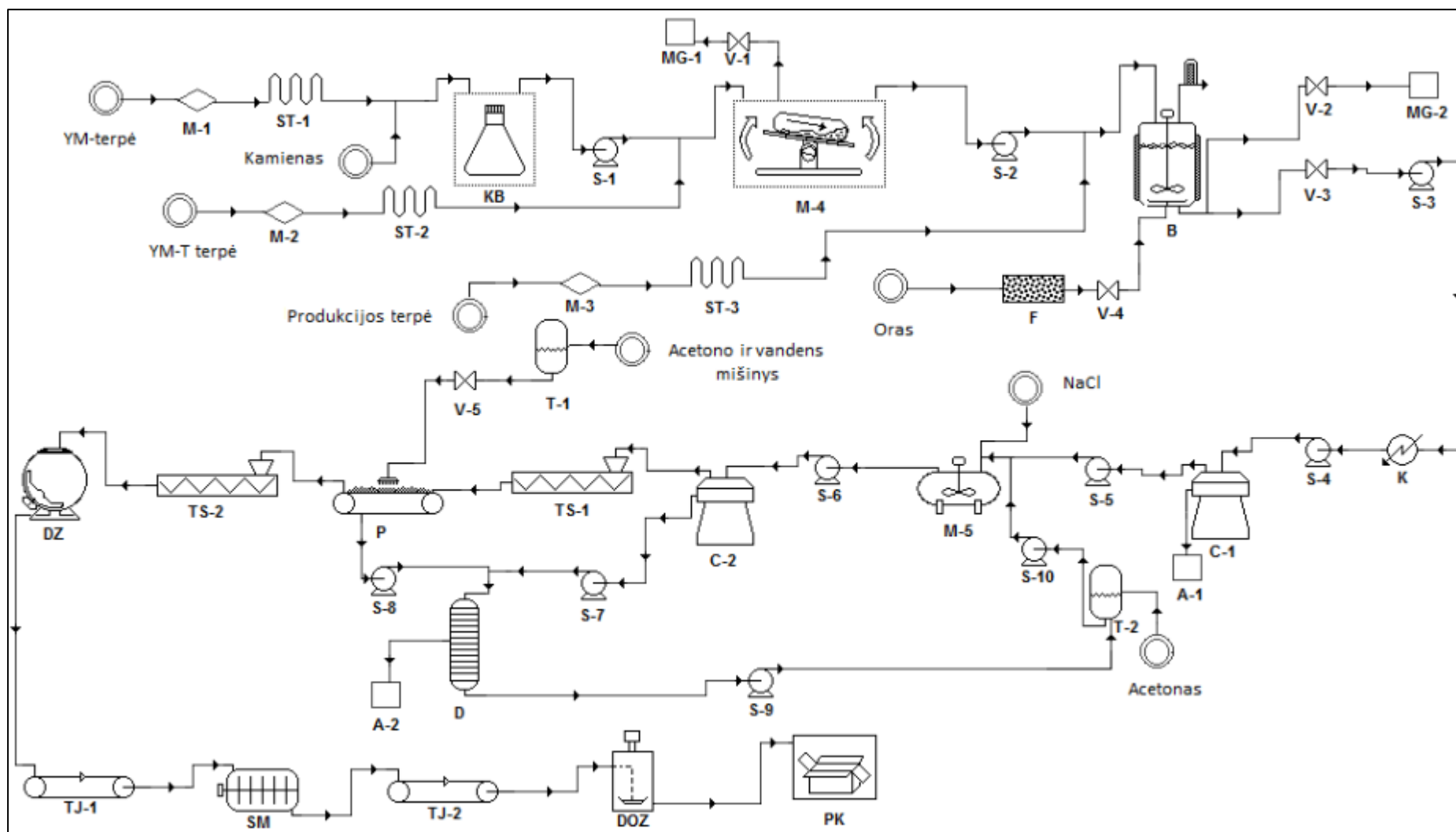


3.20 pav. Ksantano DPPH radikalo slopinimas

4. REKOMENDACIJOS

Atlikus tyrimus ir įvertinus optimalias ksantano išskyrimo sąlygas sudaryta aparatūrinė gamybos schema. Šią schemą rekomenduojama naudoti pramoniniam ksantano išskyrimui.

Schemoje (žr. 4.1 pav.) pavaizduotas ksantano išskyrimas iš *Xanthomonas campestris* bakterijų. Išskyrimo proceso pradžioje yra paruošiamos YM, YM - T, produkcijos terpės. YM terpė yra sumaišoma magnetine maišykle (M-1), sterilizuojama autoklave (ST-1). Po sterilizacijos YM terpė įpilama į kolbą (KB), į kurią tiekiamas bakterijų suspensija. Iš šios kolbos inokuliatas išcentrinu siurbliu (S-1) yra tiekiamas į talpą (M- 4), kurioje vyksta maišymas ir inokulianto augimas. Į tą pačią kolbą yra tiekiamas YM –T terpė, kuri prieš tiekiant yra sumaišoma maišykle (M-2) ir sterilizuojama autoklave (ST-2). Iš talpos (M- 4) yra imami mėginiai (MG -1), kuriuos periodiškai imant reikalingas vožtuvas (V-1). Pasiėkus reikalingą bakterijų koncentraciją, inokuliatas išcentrinu siurbliu (S-2) yra tiekiamas į bioreaktorių (B). Į bioreaktorių taip pat yra tiekiamas produkcijos terpė, kuri prieš tai yra išmaišoma maišykle (M-3) ir sterilizuojama autoklave (ST-3). Į bioreaktorių yra tiekiamas oras. Oras yra išvalomas filtru (F). Oro tiekimui yra naudojamas vožtuvas (V-4). Iš bioreaktoriaus imant mėginius yra naudojamas vožtuvas (V-2), mėginiai surenkami talpoje (M-2). Kai mėginiuose pasiekiamas reikalinga bakterijų koncentracija, inokuliatas, naudojant vožtuvą (V-3) ir išcentrinį siurbli (S-3), yra transportuojamas į kaitinimo įrenginį (K). Kaitinimo įrenginyje inaktyvuojamos bakterijų ląstelės. Iš kaitinimo įrenginio, išcentrinu siurbliu (S-4), terpė yra perkeliama į centrifugą (C-1), kurioje nusodinamos inaktyvuotos bakterijų ląstelės ir kitos dalelės. Nuosėdos perkeliama į atliekas (A-1). Supernatantas, likęs po centrifugavimo išcentrinu siurbliu (S-5) yra tiekiamas į maišyklę (M-5), į kurią tiekiamas tam tikras kiekis NaCl. Taip pat į tą pačią maišyklę išcentrinu siurbliu (S- 10) iš talpos (T-2) yra tiekiamas acetonas. Mišinys išcentrinu siurbliu (S- 6) yra tiekiamas į centrifugą (C-2), kur atskiriamas nusodintas ksantanas. Panaudotas acetonas išcentrinu siurbliu (S-7) yra tiekiamas į distiliatorių, kuriame išgryninamas ir naudojant siurbli (S-9) grąžinamas į talpą (T-2) pakartotiniam naudojimui. Po centrifugavimo ir distiliavimo likusios atliekos yra pašalinamos (A-2). Išsėdęs ksantanas sraigtiniu transporteriu (TS-1) yra transportuojamas į plovimo mašiną (P), kur iš talpos (T-1), naudojant vožtuvą (V-5), yra tiekiamas acetono ir vandens mišinys. Po plovimo likęs acetonas ir vanduo siurbliu (S-8) yra tiekiami į distiliatorių ir išgrynintas acetonas yra grąžinamas į procesą. Išplautas ksantanas sraigtiniu transporteriu yra transportuojamas į džiovinimo mašiną (DZ), kurioje yra išdžiovinamas ir juostiniu transporteriu (TJ-1) tiekiamas į smulkintuvą (SM). Iš smulkintuvo juostiniu transporteriu (TJ-2) ksantanas tiekiamas į dozavimo mašiną (DOZ), suduotas ksantanas pakuojamas (PK).



4.1 pav. Principinė aparatinė ksantano išskyrimo schema

4.1 lentelė. Aparatūrinės schemos įrengimų žymėjimas

Žymėjimas	Įrenginys
M-1 – M-3	Magnetinės maišyklės
M-4	Rezervuaras su maišykle
M-5	Rezervuaras su maišykle
ST-1 – ST-3	Autoklavai
KB	Kolba
S-1 – S10	Išcentriniai siurbliai
V-1 – V-5	Vožtuvai
MG-1, MG-2	Mėginių talpos
B	Bioreaktorius
F	Filtrai
K	Kaitinimo įrenginys
C-1, C-2	Centrifuga
A-1, A-2	Atliekų rezervuarai
T-1, T-2	Talpos
TS-1, TS-2	Sraigtiniai transporteriai
TJ-1, TJ-2	Juostiniai transporteriai
P	Plovimo įrenginys
D	Distiliacinis įrenginys
DZ	Džiovinimo įrenginys
DOZ	Dozavimo įrenginys
PK	Pakavimo įrenginys

IŠVADOS

- Nustatyta, jog *Azotobacter vinelandii* bakterijos geriausiai augo NRP terpėje, o *Xanthomonas campestris* – produkcijos terpėje.
- Optimizuojant alginato išskyrimą geriausi rezultatai buvo pasiekti naudojant 0,025 M koncentracijos 4-hidroksifenilacto rūgštį, ją naudojant buvo išskirta 6,49 g/L alginato, o naudojant 0,05 M koncentracijos 3,4-dihidroksibenzoinę rūgštį - 3,16 g/L alginato. Naudojant peptoną, išskirtą iš mėsos, gauta alginato koncentracija 4,1 g/L - beveik du kartus didesnė negu iš terpės, kurioje buvo naudotas peptonas iš sojų - 2,06 g/L.
- Nustatyta išskirtame alginate likę angliavandenių kiekiai. Produkcijos terpėje iš 40 g/L angliavandenių buvo likę 0,32 g/L, NRP terpėje - 0,14 g/L, o terpėje, kurioje papildomai buvo naudota 0,25 g/L 4-hidroksifenilacto rūgšties - 0,63 g/L.
- Didžiausią ksantano koncentraciją pavyko išskirti iš mėginio, kuriame buvo 40 g/L sacharozės - 3,82 g/L, o naudojant tos pačios koncentracijos gliukozę buvo išskirta 2,07 g/L ksantano. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas (93,4%) buvo gautas naudojant ksantaną išskirtą su bioetanolio ir acetono mišiniu. Ksantano, kuris išskirtas naudojant metanolį antioksidacinis aktyvumas buvo 89,1%, ksantano, išskirto naudojant bioetanolį - 77,1%, acetoną - 68,8%, izopropanolį - 47,2 %.
- Nustatyta, jog didžiausias ksantano kiekis buvo išskirtas naudojant acetoną (4,8 g/L), toliau – izopropanolį (2,41 g/L), bioetanolį (2,76 g/L). Mažiausiai ksantano buvo išskirta naudojant metanolį (0,35 g/L) ir bioetanolio ir acetone mišinį (0,54 g/L).
- Atlikus tyrimus buvo sudaryta aparatūrinė ksantano išskyrimo schema. Pagal šią schemą išskirtas ksantanas gali būti panaudojamas kaip tirštiklis stipriai šarminiuose vamzdžių, plytelių valikliuose ir rūgštiniuose tirpaluose rūdims valyti, taip pat ksantanas gali būti panaudojamas dažuose ir dangose, kurios stabdo koroziją.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. REHM, B. H. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Applied and industrial microbiology*. 2010, 8 (8), 578-592. ISSN 1367-5435.
2. SETUBAL, J. C. and SANTOS, P. Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *Journal of Bacteriology*. 2009, 191 (14), 4534-4545.
3. HAMILTON, T. and LUDWIG, M. Transcriptional Profiling of Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 2011, 193 (17), 4477- 4486.
4. BUTT, Z. A. and QADEER, M. A. Alginate production by mutant strain of *Azotobacter vinelandii* using shake flask fermentation. *Institute of Industrial Biotechnology*. 2011, 43 (2), 1053 – 1067.
5. REMMINGHORST, U. and REHM, H. A. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett*. 2006, 28, 1701 – 1712.
6. HAY, I. D. and WANG, Y. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial biotechnology*. 2013. 6, 637 – 650.
7. REHM, Bernd H. A. Alginates: Biology and Applications. New York, 2009. ISBN 9783540926788.
8. PHIROMTAN, M. and MALA, T. Effect of Various Carriers and Storage Temperatures on Survival of *Azotobacter vinelandii* NDD-CK-1 in Powder Inoculant. *Modern Applied Science*. 2013, 6 (7), 81 – 89. ISSN 1913 – 1844.
9. THEN, Ch. and OTHMAN, Z. Production of Alginate by *Azotobacter vinelandii* in semi-industrial scale using batch and fed-batch cultivation systems. *Journal of Advanced Scientific Research*. 2012, 3 (4), 45-50. ISSN 0976 – 9595.
10. MONSALVE-GIL, J. F. and CUESTA-ALVAREZ, A. M. The production, molecular weight and viscosifying power of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* is affected by the carbon source in submerged cultures. *SciELO*. 2015, 194. ISSN 0012 -7353.
11. IAIN, D. and REHMAN, Z. Bacterial biosynthesis of alginates. *J Chem Technol Biotechnol*. 2010, 85 (6), 752–759.
12. MOONEY, D. J. and LEE, K. Y. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2012, 1 (37), 106-126.
13. MOONEY, D. J. and LEE, K. Y. Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromolecular Bioscience*. 2006, 6, 623-633.
14. TONNESEN, H. H. and KARLSEN, J. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2002, 28 (6), 621-630. ISSN 0363-9045.

-
15. GOMBOTZ, W. R. and WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, 64, 194-205.
 16. PAUL, V. and SHARMA, Ch. P. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. *Trends Biomater. Artif. Organs*. 2004, 18 (1), 18-23.
 17. REIS, C. and VEIGA, F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation*. 2006, 23 (3), 245-257.
 18. HATCH, A. and HANSMANN, G. Engineered Alginate Hydrogels for Effective Microfluidic Capture and Release of Endothelial Progenitor Cells from Whole Blood. *Langmuir*. 2011, 27 (7), 4257-4264.
 19. WONG, M. Alginates in Tissue Engineering. *Biopolymer Methods in Tissue Engineering*. 2004, 238, 77-86. ISSN 1064-3745.
 20. BRONLEE, I. A. and DETTMAR, W. P. Applications of Alginates in Food. *Microbiology Monographs*. 2009, 13, 211-228.
 21. BENAVIDES, S. and REYES, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*. 2012, 110 (2), 232-239.
 22. PALANIRAJ, A. and JAYARAMAN, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*. 2011, 106, 1-12.
 23. GARCIA-OCHOA, F. And SANTOS, V. E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*. 2000, 18 (7), 549-579.
 24. WJITCOMB, P. J. Rheology of Xanthan Gum. *Journal of Rheology*. 2000, 5, 493.
 25. SHARMA, B. R. and DHULDHOYA, N. C. Xanthan Gum - A Boon to Food Industry. *Food Promotion Chronicle*. 2006, 1, 27-30.
 26. LACHKE, A. Xanthan — A versatile gum. *Resonance*. 2004, 10, 25-33.
 27. WEBER, E. And HUGUET, E. The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J Bacteriol*. 2005, 187 (7), 58-68.
 28. PAPAGIANNI, M. And PSOMAS, S. K. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. *Process Biochemistry*. 2001, 23 (1), 73-80.
 29. RYAN, R. P. and POTNIS, N. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*. 2011, 9, 344-355.

-
30. FOUHY, Y. and CROSSMAN, L. Cell–cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *PNAS*. 2006, 17, 6712–6717.
31. UEHARA, K. and NISHIYAMA, K. Bacterial Blight of Welsh Onion : A New Disease Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *allii* pv. nov. *Journal of General Plant Pathology*. 2000, 66 (4). 310–315.
32. SCHNEIKER, S. and GOESMANN, A. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *Journal of Biotechnology*. 2008, 134 (1-2), 33–45.
33. GILBERTSON, R. L. and KOIKE, S. T. Movement of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in the stems of lettuce and seed contamination. *Plant Pathology*. 2002, 51 (4), 506–512.
34. MASSOMO, M. S. and NIELSEN, H. Identification and Characterisation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Strains from Tanzania by Pathogenicity Tests, Biolog, rep-PCR and Fatty Acid Methyl Ester Analysis. *European Journal of Plant Pathology*. 2003, 109 (8),775-789.
35. ROSALAM, S. and ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas compestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006, 39 (2), 197-207.
36. OCHOA, G. F. and CASTRO, E. G. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 27 (9), 680-690.
37. LEELA, K. J. and SHARMA, G. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Engineering*. 2000, 23 (6), 687-689.
38. FERNANDES, S. M. and REJANE, C. G. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*. 2009, 90 (1), 119-123.
39. LETISSE, F. and CHEVALLEREAU, P. Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, 55 (4), 417-422.
40. ENSHASY, E. and OTHMAN, N. Enhanced xanthan production process in shake flasks and pilot scale bioreactors using industrial semidefined medium. *African Journal of Biotechnology*. 2011, 10 (6).
41. CASAS, A. and SANTOS, V. E. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 26 (2-4), 282-291.

-
42. MORAINÉ, R. A. and ROGOVIN, P. Xanthan biopolymer production at increase concentration by pH control. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, 13 (3), 381-391.
43. ROSELL, C. M. AND ROJAS, J. A. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids*. 2001, 15 (1), 75-81.
44. TAHERIAN, A. and FUSTIER, P. Effects of added weighting agent and xanthan gum on stability and rheological properties of beverage cloud emulsions formulated using modified starch. *Journal of Food Process Engineering*. 2007, 30 (2), 204-224.
45. HUBLIK, G. Xanthan. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. 2012, 10, 221-229.
46. BECKER, A. and KATZEN, F. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical /genetic perspective. 1998, 50, 145-152.
47. PETRI, D. F. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *J. APPL. POLYM. SCI.* 2015, 1-13.
48. YASSER, F. M. and HANAN, M. A. Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. *LWT*. 2007. 40 (2). 270–277.