



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Alginato gavimo optimizavimas iš *Azotobacter vinelandii*
bakterijų**

Baigiamasis magistro projektas

Vaiva Stapulionytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Alginato gavimo optimizavimas iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Vaiva Stapulionytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Doc. dr. Kristina Kantminienė

Recenzentė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Vaiva Stapulionytė

Alginato gavimo optimizavimas iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Vaivos Stapulionytės, baigiamasis projektas tema „Alginato gavimo optimizavimas iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų“ 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)

Stapulionytė, Vaiva. Alginato gavimo optimizavimas iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų. 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*, gavimo optimizavimas, anglies ir azoto šaltiniai.

Kaunas, 2019. 60 p.

Santrauka

Alginatas yra polisacharidas, kuris plačiai naudojamas svarbiose pramonės srityse. Šis polimeras yra išskiriamas *Azotobacter vinelandii* bakterijų fermentacijos metu. Pramonėje yra sunaudojami dideli alginato kiekiai, taigi siekiama padidinti polimero išeigą iš šių bakterijų. Siekiant pagerinti alginato gamybą yra optimizuojamos jo gamybos sąlygos, t.y. keičiami bakterijų mitybinės terpės pagrindiniai maistinių medžiagų šaltiniai, jų koncentracijos, taip pat mineralinių medžiagų koncentracijos. Tyrimų metu buvo keičiami anglies, azoto šaltiniai, jų koncentracijos, taip pat tokių druskų kaip $MgSO_4$ koncentracijos. Šiais pokyčiais buvo siekiama atrasti optimalias alginato gamybos sąlygas. Tyrimų metu taip pat buvo vertinamas angliavandenių kiekis gautame alginate ir nustatytas išgauto alginato antioksidacinis aktyvumas. Nustatyta, kad alginato gamyba optimizuojama, kai bakterijų mitybinėje terpėje anglies šaltiniu pasirenkama maltozė (30 g/L), azoto šaltiniu mielių ekstraktas (6 g/L), o $MgSO_4$ koncentracija lygi 3 %. Šiuo atveju alginato išeiga lygi 7,89 g/L. Taip pat alginato gamybos optimizavimui buvo naudoti alternatyvūs anglies šaltiniai – antrinės žaliavos. Didžiausia alginato išeiga gauta naudojant cukranendrių cukrų (30 g/L) ir lygi 11,86 g/L. Gautas alginatas pasižymėjo antioksidacinėmis savybėmis. Didžiausią antioksidacinį poveikį sukėlė alginatas, kurio gamybai, kaip azoto šaltinis, buvo naudojamas peptonas iš sojų, o mažiausią angliavandenių kiekį turėjo alginatas, gautas iš bakterijų, kurių mitybinėje terpėje anglies šaltiniu naudota fruktozė.

Stapulionytė, Vaiva. Optimization of Alginate Production by *Azotobacter vinelandii* Bacteria. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. Ilona Jonuškienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: Biotechnology, Technological sciences.

Keywords: alginate, *Azotobacter vinelandii*, optimization of production, carbon and nitrogen sources.

Kaunas, 2019. 60 p.

Summary

Alginate is a polysaccharide, widely used in important industrial areas. It is produced by the fermentation of *Azotobacter vinelandii* bacteria. There are used big amounts of alginate in industry, so it is necessary to increase the yield of this biopolymer. On purpose to improve production of alginate, the conditions of its production are optimized. The sources of nutrients and their concentrations, also concentration of minerals in bacterial growth medium, are modified. In this research, there were changed carbon and nitrogen sources, their concentrations and concentration of mineral MgSO₄. By making these changes it was possible to obtain optimal conditions of alginate production. There was also analyzed the content of carbohydrates in produced alginate and its antioxidative effect. It was found that production of alginate is optimized, when as carbon source it is used maltose (30 g/L), as nitrogen source – yeast extract (6 g/L) and MgSO₄ concentration is 3 %. In this case yield of alginate was 7.89 g/L. To obtain the maximum yield of alginate alternative carbon sources were also used. Sugar cane sugar (30 g/L) gave the highest amount of alginate (11.86 g/L). It was also obtained that alginate has the antioxidative effect. The highest antioxidative effect has alginate obtained using soy peptone as nitrogen source and the minimum quantity of carbohydrates has the alginate, which was obtained, when fructose was used as a carbon source.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	7
Įvadas.....	8
1. Literatūros apžvalga	9
1.1. Biopolimeras alginatas	9
1.2. Alginato struktūra ir fizikocheminės savybės	9
1.3. Alginato molekulinė masė ir tirpumas	11
1.4. Alginato biosintezė.....	12
1.5. Alginato šaltiniai	13
1.5.1. Alginatas iš dumblių.....	13
1.5.2. Alginatas iš bakterijų.....	14
1.6. Alginatiniai geliai	15
1.7. Biologinis alginato suderinamumas	15
1.8. Alginato panaudojimas.....	16
1.8.1. Alginato panaudojimas medicininiais tikslams	17
1.8.2. Alginato taikymas osteoartrito gydyme	18
1.8.3. Antioksidacinės alginato savybės.....	19
1.8.4. Antibiotikams atsparių bakterijų veikimas, įkapsiliuojant ZnO nanodaleles į alginatą	19
1.9. Įvairių veiksnių įtaka alginato gamybos optimizavimui	20
1.9.1. Terpės komponentų (maistinių medžiagų) įtaka	20
1.9.2. Fosfato druskų poveikis alginato produkcijai iš bakterijų.....	20
1.9.3. Ištirpusio deguonies poveikis	20
1.9.4. Maišymo poveikis alginato produkcijos terpėje.....	20
1.10. Skirtingų anglies šaltinių įtaka alginato gamybos procese.....	21
1.11. Alginato gamyba, panaudojant antrines žaliavas	22
1.12. Inokulianto ir druskų koncentracijos įtaka alginato gamybai.....	23
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	24
2.1. Aparatūra	24
2.2. Medžiagos.....	24
2.3. Alginato gamyba	25
2.3.1. Naudotos bakterijos	25
2.3.2. Naudotos mitybinės terpės	27
2.3.3. <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijų sėjimas paviršiniu būdu Petri lėkštelėse	27
2.3.4. Bakterijų įnešimas į terpes.....	28
2.3.5. Alginato nusodinimas.....	28
2.3.6. Ląstelių biomasės nusodinimas	29
2.4. Angliavandenių kiekio nustatymas.....	31
2.5. Antioksidacinių savybių tyrimas. DPPH metodas.....	32
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	33
3.1. Alginato ir ląstelių biomasės gavimo iš <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterijų rezultatai	33
3.2. Angliavandenių kiekio nustatymas.....	50
3.3. Antioksidacinių savybių tyrimas	52
4. Rekomendacijų dalis	54
Išvados	57
Literatūros sąrašas	58

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

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

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis;

GDL – D-gliukono-5-laktonas;

HPMC – hidroksipropilmetilceliuliozė;

PHB – polihidroksibutiratas.

Terminai:

TCA ciklas – citrinos rūgšties ciklas.

Įvadas

Alginatai yra grupė polisacharidų, kurie yra išgaunami iš rudųjų jūros dumblių. Taip pat, kaip rišamąją ekstraląstelinę medžiagą, juos gamina ir kai kurios bakterijų rūšys. Dažniausiai pasitaikančios bakterijų rūšys, išskiriančios alginatą, yra *P. aeruginosa* ir *A. vinelandii*. Šios bakterijų rūšys alginatui gaminti naudoja labai panašius molekulinis mechanizmus. Tačiau reikia paminėti, kad jų išskirtas alginatas yra naudojamas skirtingiems tikslams, nes pasižymi skirtingomis savybėmis. Kai kurie *P. aeruginosa* kamienai gali išskirti didelį alginato kiekį, kuris yra naudojamas tankioms, gerai struktūrizuotoms bioplėvelėms gaminti. *Azotobacter* gamina stipresnę alginatą (su didele G blokų koncentracija), kuris lieka glaudžiai susijęs su ląstelėmis ir sudaro dehidratacijai atsparius darinius (cistas) [1].

Ištyrus unikalias alginatų biochemines ir biofizikines savybes, atsirado daugybė naujų galimybių panaudoti juos maisto pramonėje. Plačiausiai alginatai maisto pramonėje yra naudojami kaip standikliai, emulsikliai ir stabilizavimo agentai [1]. Taip pat alginatas naudojamas daugybėje biomedicinos ir inžinerijos sričių. Alginatai plačiai panaudojami dėl tokių savybių kaip biologinis suderinamumas ir sugebėjimas lengvai sudaryti gelius. Hidrogeliai, į kurių sudėtį įeina alginatai, yra ypač naudojami žaizdoms gydyti, vaistams gaminti ir audinių inžinerijoje. Šie hidrogeliai yra struktūriškai panašūs į ekstraląstelines audinių matricas ir gali būti modifikuojami, siekiant reikiamų rezultatų [2].

Šiomis dienomis įvairūs alginato dariniai yra laikomi kaip patys vertingiausi ir labiausiai biologiškai suderinami polimerai, kurie taip pat naudojami fermentams imobilizuoti, onkologinėms ligoms gydyti, skrandžio reflukso prevencijai ir terapiniam ląstelių įsiskverbimui [3]. Svarbi fiziologinė alginato savybė yra ir visiškas arba dalinis jo tirpumas vandenyje bei organiniuose tirpikliuose. Alginatai gali reaguoti su dviem antrinėmis -OH grupėmis, pozicijose C-2 ir C-3 arba viena -COOH grupe C-6 pozicijoje. Taip pat alginatas pasižymi netoksiškumu [4].

Kiekvienais metais pagaminamo alginato kiekis yra apie 30 000 tonų. Šio biopolimero išgavimo šaltiniai yra apibrėžiami kaip neriboti [5]. Dėl tokio didelio alginato sunaudojimo kiekio, jo biosuderinamumo ir palankių fiziologinių savybių tampa aktualu optimizuoti polimero gamybą atrandant ir taikant optimalias gamybos sąlygas.

Darbo tikslas – optimizuoti polisacharido alginato gamybą iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų.

Darbo uždaviniai:

1. įvertinti alginato gamybą, pasirenkant skirtingus anglies šaltinius *Azotobacter vinelandii* bakterijų mitybinėje terpėje;
2. ištirti alginato gamybą, pasirenkant skirtingus azoto šaltinius *Azotobacter vinelandii* bakterijų mitybinėje terpėje;
3. atlikti alginato gamybos procesą, pasirenkant skirtingas Na_2HPO_4 ir MgSO_4 druskų koncentracijas *Azotobacter vinelandii* bakterijų mitybinėje terpėje;
4. alginto gamybai panaudoti antrines žaliavas ir įvertinti jų koncentracijos įtaką;
5. nustatyti angliavandenių kiekį gautame alginate;
6. nustatyti pagaminto alginato antioksidacinį aktyvumą;
7. pateikti rekomendacijas, susijusias su optimaliomis biopolimero alginato gamybos sąlygomis.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Biopolimeras alginatas

Alginatas yra natūralus polisacharidas, kuris išgaunamas iš dumblių ir bakterijų, priklausančių *Pseudomonas* ir *Azotobacter* rūšims. Dėl unikalų fizikocheminių savybių, alginatai yra plačiai panaudojami įvairiose pramonės srityse: maisto, žemės ūkio, kosmetikos, farmacijos ir biomedicinos. Per pastaruosius du dešimtmečius alginatai buvo pradėti naudoti pažangiose biomedicinos ir farmacijos srityse. Jie tapo labai paklausūs dėl jų biologinio suderinamumo ir netoksiškumo bei universalumo, kuris pastebėtas vykdant jų pakeitimus. Iki šiol, kaip komerciniai produktai įvairiais tikslais, buvo naudojami tik alginatai išgauti iš dumblių, o alginatų, kurių šaltinis yra bakterijos, panaudojimas buvo mažai taikomas. Svarbu tai, kad alginatai, gauti iš dumblių ir bakterijų, labai skiriasi vieni nuo kitų savo sudėtimi, modifikacijomis, molekuline mase, viskoelastinėmis savybėmis ir polidispersiškumu. Alginatai, gauti bakterijų biosintezės metu, gali atitikti reikalavimus, esančius šiuolaikinėse farmacijos ir biomedicinos inžinerijų srityse [6].

Komercinis alginatas yra dažniausiai išskiriamas iš šių rudųjų dumblių: *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, ir *Macrocystis pyrifera* [7]. Alginatai išskiriami naudojant vandeninius šarmų tirpalus, pavyzdžiui, NaOH [8]. Gautas ekstraktas yra filtruojamas siekiant nusodinti alginatą. Gauta alginato druska gali būti verčiama į rūgštį skiedžiant nuosėdas druskos rūgštimi. Po tolimesnio išvalymo ir perdirbimo gaunami vandenyje tirpūs natrio alginato milteliai [9]. Iš viso išskirto sauso alginato sudėtyje pagal masę yra 22–30 % *A. nodosum* ir 25–44 % *L. digitata* rūšies dumblių [10]. Alginato biosintezės, kurią atlieka bakterijos, metu galima gauti produktą, kurio cheminė struktūra ir fizikinės savybės yra labiau apibrėžtos negu tada, kai produktas gaunamas iš jūros dumblių. Alginato sintezę atlieka *Azotobacter* ir *Pseudomonas* bakterijos. Alginato biosintezė yra skirstoma į keturis etapus:

1. pirminio substrato sintezė;
2. polimerizacija ir išskyrimas iš citoplazminės membranos;
3. periplazminis perdavimas ir modifikacija;
4. išskyrimas per išorinę membraną [11].

Yra pasiekta didelė pažanga atliekant alginatų sintezės iš bakterijų tyrimus. Taikant biosintezės modifikacijas atrasti būdai leidžiantys gaminti alginatus pasižyminčius individualiomis savybėmis, kurios leidžia plačiai taikyti juos biomedicinoje [2].

1.2. Alginato struktūra ir fizikocheminės savybės

Alginatas yra nešakotas polisacharidas. Alginato struktūra susideda iš dviejų urono rūgšties likučių, įskaitant β -D-manurono rūgštį (M) ir jos C5 epimerą α -L-gulurono rūgštį (G), kurie yra sujungti 1,4-glikozidiniais ryšiais. Gamtoje dažniausiai randamas alginatas, kurio struktūra yra heteropolimerinė, t. y. jį sudaro abiejų M ir G likučių derinys [12].

Polimerinėje struktūroje esantys M ir G likučiai lemia skirtumus tarp alginatų. Alginatų struktūrą gali sudaryti skirtingas skaičius, nevienodų ilgių M, G arba MG blokų. Alginatų sudėtis ir molekulinė masė gali labai skirtis, priklausomai nuo to, iš kur alginatas buvo išgaunamas, taip pat nuo jo produkcijos sąlygų. Alginatai, gauti iš dumblių, dažniausiai sudaryti iš G blokų, o alginatai, išskirti iš *P. aeruginosadoes* bakterijų, G blokų sudėtyje neturi. Kitas svarbus struktūros modifikavimas yra alginato acetilinimas O-2 ir/arba O-3 pozicijose, kurios yra randamos tik iš bakterijų išgautame

alginate. Iš dumblių išgautas alginatas taip pat gali būti acetilinamas naudojant cheminius metodus [3].

Polimerų sudėtis apibrėžia jų fizikochemines savybes. Alginatų vidinis elastingumas priklauso nuo blokų sudarymo dažnio. Alginatų elastingumas mažėja tokia tvarka: MG blokas > MM blokas > GG blokas. Svarbiausios alginato savybės yra susijusios su jo gebėjimu efektyviai ir selektyviai surišti divalentių katijonus. Nuo to priklauso hidrogelio ir polimerinio pluošto formavimasis. Nustatyta, kad alginatų giminingumas skirtingiems divalentiniams jonams didėja tokia tvarka: $Mg^{2+} \ll Mn^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+} < Cu^{2+} < Pb^{2+}$. Stiprumo, stabilumo, mechaninių hidrogelio savybių ir matmenų skirtumus nulemia sąveikaujančio katijono tipas, G blokų kiekis ir jų kintamumas polimere [3].

Yra gerai žinoma, kad alginato sudėtis, M/G blokų santykis ir jų acetilinimas bei molekulinė masė lemia jo reologines savybes [13]. Bakterijų išskirto alginato savybes lemia jame esančios O-acetilo grupės. Jos gali pakeisti šias alginatų savybes: polimero konformaciją, grandinės išsiplėtimą, tirpumą, vandens talpą, viskoelastingumą ir molekulinę masę. Acetintas alginatas absorbuoja daugiau vandens dėl geresnės grandžių sąveikos su vandens molekulėmis. Tai lemia grandinės išsiplėtimą ir geresnį tirpumą [12].

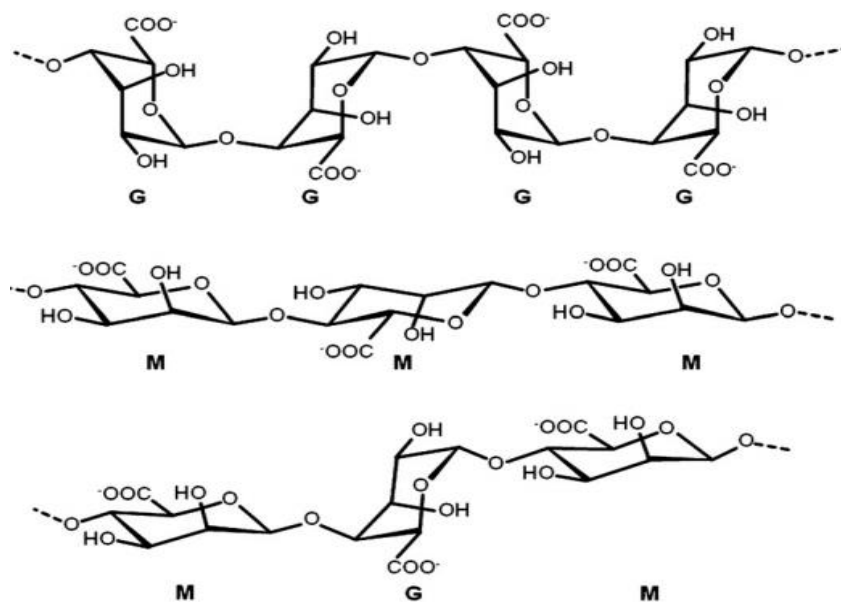
Iš bakterijų išskirtas alginatas yra labai acetintas, o iš jūros dumblių išskirto alginato acetilinimas yra lygus 0. M/G blokų santykis bakteriologiniame alginate yra kiek didesnis, kai alginatas yra išskirtas iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų. Gelių sudarymo savybėms yra svarbūs G blokų vienetai, kurie sąveikauja su divalentišiais jonais (Ca^{2+}). Šie jonai naudojami sudaryti matricoms, kurios reikalingos gelių, plėvelių ir mikrodalelių formavimui. Alginatas išgautas iš *Azotobacter vinelandii* yra sudarytas iš G blokų ir formuoja stiprius gelius, kai naudojami Ca^{2+} jonai. Šių alginatų tirpalų klampa yra didesnė nei tų, kuriuose yra mažiau G blokų. Mažiau G blokų turintys alginatai sudaro lanksčius gelius kartu su Ca^{2+} jonais ir jų tirpalų klampa yra mažesnė. Tokius alginatus gamina *Pseudomonas* spp. Alginatinių gelių stiprumas priklauso ne tik nuo M/G blokų santykio, bet ir nuo G subvienetų pasikartojimo dažnumo [13].

1.1 lentelė. Alginato cheminė sudėtis ir struktūra

Alginato šaltinis	Blokų pasikartojimas			Santykis M/G	Acetilinimas, %
	F _M	F _G	F _{GG}		
<i>A. vinelandii</i>	0,44-0,92	0,08-0,56	0,03-0,37	0,79-5,66	11-30
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,60-0,84	0,16-0,37	0	1,50-5,25	4-57
<i>M. pyrifer</i>	0,59-0,62	0,38-0,41	0,16-0,24	1,44-1,63	0

Iki tada, kai mokslininkai Fischeris ir Dörfelis atrado ir ištyrė l-guluronatą, d-manuronatas buvo laikomas pagrindiniu alginato komponentu. Vykdamt dalinį nusodinimą naudojant magnio ir kalcio druskas, buvo įrodyta, kad alginatas iš tiesų yra blokinių kopolimeras ir, kad guluronato ir manuronato santykis alginate keičiasi priklauso nuo natūralaus šaltinio, iš kurio buvo išgautas alginatas [14]. Alginatai, gauti iš skirtingų šaltinių skiriasi, M ir G blokų turiniu, taip pat kiekvieno bloko ilgiu. Atsižvelgiant į šiuos skirtumus jau yra pagaminta daugiau nei 200 skirtingų alginato rūšių [15]. Kopolimero sekos sudėtis (t. y. M/G santykis sekoje), taip pat G-bloko ilgis ir molekulinė masė yra kritiniai faktoriai, kurie veikia fizikines alginato savybes ir jo sudaromų hidrogelių savybes [16]. Mechaninės alginato gelių savybės yra tuo stipresnės, kuo ilgesni G-blokai ir didesnė molekulinė

masė. Svarbu paminėti, kad nuo to, iš kokio šaltinio yra išgaunamas alginatas, priklauso jo cheminė struktūra [17].



1.1 pav. Cheminės G-bloko, M-bloko ir kintamojo bloko struktūros

1.3. Alginato molekulinė masė ir tirpumas

Komercinio natrio alginato molekulinė masė siekia nuo 32 000 iki 400 000 g/mol. Alginato tirpalų klampa didėja, kai terpės pH mažėja. Esant pH vertei nuo 3 iki 3,5 tirpalų klampa pasiekia maksimumą. Tuomet pagrindinėje grandinėje karboksilinės alginato grupės prisijungia protoną ir formuoja vandenilinius ryšius. Alginato molekulinės masės didėjimas pagerina fizikines alginatų sudaromų gelių savybes. Tačiau, alginatų tirpalai, kurie yra pagaminti iš didelės molekulinės masės polimero, pasižymi labai didele klampa, o tai dažnai yra nepageidautinas reiškinys gamyboje. Pavyzdžiui, baltymai arba ląstelės, kurios yra sumaišytos su didelės klamos alginato tirpalu, gali būti pažeidžiami dėl didelės šlyties jėgos, naudojamos tirpalui maišyti ir injekcijai į kūną atlikti. Elastinis gelio modulis gali daug padidėti, kai tirpalo klampa didėja minimaliai. Tai pasiekama naudojant polimerų kombinaciją iš mažos ir didelės molekulinės masės alginatų [2].

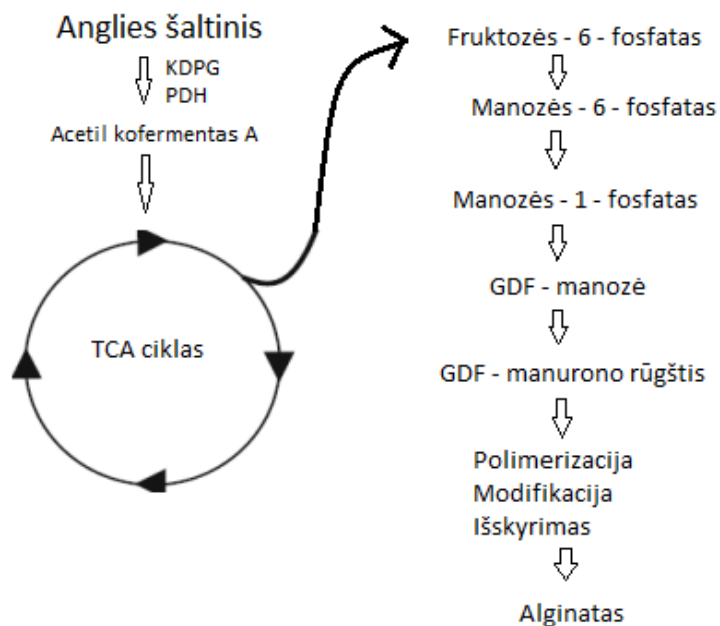
Atliekant įvairius tyrimus buvo bandyta nustatyti kultūros augimo sąlygas, kurias reikėtų naudoti laboratoriniame fermentoriuje, siekiant pagaminti alginatą, pasižymintį panašia molekuline mase skirtingose gamybos skalėse. Gauti rezultatai parodo, kad maišant kolbas galima išgauti alginatą su didesne molekuline mase (nuo 1750 iki 1980 kDa) ir gauti didesnę jo koncentraciją (nuo 4,3 iki 5,5 g/L). Yra nustatyta, kad atliekant alginato produkciją iš *A. vinelandii* polimero molekulinė masė priklauso nuo kultūros amžiaus. Mokslininkas Trujillo-Roldánis ir kt. nustatė, kad alginato molekulinė masė gali siekti nuo 900 iki 1250 kDa. Šis molekulinės masės intervalas susidaro, nes *A. vinelandii* genomas koduoja šešis fermentus, kurie pasižymi alginato liazės aktyvumu. Pagrindinė problema, kuri egzistuoja alginato gamybos iš bakterijų metu pramoniniu lygiu, yra pastovios alginato molekulinės masės išlaikymas bakterijų augimo metu. Alternatyva, leidžianti išspręsti šią problemą, galėtų būti alginato gamyba naudojant nenutrūkstamą gamybos procesą. Nuolatinis kultivavimas, vykstantis pastovioje būsenoje, yra geriausias būdas leidžiantis valdyti augimo greitį. Tai leidžia pasiekti fiziologinę būklę, kuri yra išlaikoma pastovi viso kultivavimo metu. Be to, vykdant nenutrūkstamą gamybos procesą yra gaunamas pastovios sudėties ir charakteristikų

produktas, kai tuo tarpu vykdančią periodinę ar periodinę su pamaitinimų procesą kiekviena alginato gamybos partija gali skirtis produkto kokybe. Tyrėjas Sabras ir kt. nustatė, kad yra įmanoma padidinti alginato molekulinę masę, esant pastovioms sąlygoms, nuo 400 iki 800 kDa keičiant ištirpusio deguonies kiekį (nuo 1 iki 10 %). Diaz – Barreras ir kt. bandė padidinti alginato molekulinę masę nuo 800 iki 2500 kDa didinant sacharozės koncentraciją pamaitinimo tirpale nuo 5 iki 20 g/L. Visais šiais atvejais molekulinė alginato masė nepasikeitė esant pastovioms būsenos sąlygoms. Naudojant nepertraukiamą procesą yra pasiekiamas didesnis specifinis alginato gamybos greitis (0,233 g/h) lyginant su periodiniu režimu, kurio metu šis greitis lygus 0,070 g/h [13].

1.4. Alginato biosintezė

Alginato biosintezė prasideda, kai anglies šaltinis yra oksiduojamas į acetilo kofermentą A. Šis fermentas įeina į TCA ciklą, kuriame yra paverčiamas į fruktozės-6-fosfatą per gliukoneogenezę. Fruktozės-6-fosfatas pereina daug biosintezės transformacijų, kurių metu jis yra paverčiamas į GDF-manurono rūgštį. Ši rūgštis yra alginato sintezės pirmtakas. Bendrai alginato biosintezę galima skirstyti į 4 etapus: (1) pirmtako GDP-manurono rūgšties biosintezė, (2) citoplazminės membranos poveikis ir polimerizacija, (3) periplazminės membranos perkėlimas ir modifikacija bei (4) produkto išskyrimas per išorinę membraną. Po polimerizacijos vykdoma alginato modifikacija ir tai atliekama 3 etape. Šiame etape polimanurono rūgštis yra acetilinama O-2 ir/arba O-3 pozicijose, dalyvaujant transacetilazėms. Epimerizacija yra atliekama naudojant epimerazių fermentus. Šio proceso metu kai kurie neacetilinti M blokų likučiai yra paverčiami į G blokų likučius. Alginatas yra išskiriamas iš ląstelių per transmembranų poras. Reguliacinis alginato produkcijos mechanizmas yra identiškas tiek alginato produkcijoje iš bakterijų, tiek iš dumblių. Nors alginato išskyrimas iš bakterijų ir iš dumblių yra beveik vienodas, išgauto produkto savybės yra skirtingos [24].

Aktyvuotojo pirmtako guanozino difosfato-manurono rūgšties susidarymas yra gerai žinomas procesas. Jo sintezė prasideda šešių anglies substratų patekimu į *Entner-Doudoroff* kelią, kur susidaro piruvatas, kuris yra sujungtas per trikarboksirūgšties tinklą. Vėliau oksaloacetatas per gliukoneogenezę yra paverčiamas fruktozės-6-fosfatu. Trys gerai žinomi fermentai – AlgA, AlgC ir AlgD katalizuoja kitus keturis biosintezės etapus, kurių metu fruktozės-6-fosfatas yra verčiamas į GDF manurono rūgštį. Pirmiausia, fruktozės-6-fosfato virtimas manozės-6-fosfatu, katalizuojamas bifunkcinio baltymo AlgA fosfomanozės izomeraze. Toliau AlgC (fosfomanozės mutazė) paverčia manozės-6-fosfatą į manozės-1-fosfatą. Kitas žingsnis – pavertimas į GDF manozę, kuri yra katalizuojama GDF-manozės piro fosforilaze iš AlgA. Šis „AlgA“ fermento katalizuojamas žingsnis palankiai veikia atvirkštinę reakciją, tačiau vėlesnis AlgD katalizuojamas žingsnis pakeičia reakciją į GDF-manozės gamybą. Paskutinis etapas yra katalizuojamas AlgD (GDF manozės dehidrogenazė) ir yra negrįžtamas, dėl to susidaro manurono rūgštis, kuri yra pagrindinis substratas alginato polimerizacijos mechanizme. Manoma, kad AlgD katalizuojamas oksidacijos etapas yra pagrindinė greitį ribojanti reakcija alginatų sintezės procese. Nustatyta, kad AlgA yra bifunkcinis monomerinis fermentas, kuris pasižymi fosfomanozės izomerazės ir GDF-manozės pirofosforilazės aktyvumais [3].



1.2 pav. Alginato biosintezė iš jūros dumblių arba bakterijų

1.5. Alginato šaltiniai

1.5.1. Alginatas iš dumblių

Iki šiol jūros dumbliai buvo vienintelis ir pigus alginato šaltinis. Dažniausiai, kaip išteklių buvo naudojami rudieji dumbliai iš genčių *Laminaria*, *Macrocystis*, *Ascophyllum*, *Ecklonia*, *Lessonia* ir *Durvillaea*. Kintama alginatų sudėtis yra susijusi su jų natūraliu biologiniu gamintoju (žr. 1.3 pav.). Sezoninės ir augimo sąlygos, taip pat geografinė augimo padėtis yra labai svarbūs faktoriai nustatant alginatų sudėtį ir alginatų procentą skirtingose dumblių dalyse. Jūros dumbliams, augantiems prie pakrantės zonų, sudėtyje reikalingas alginatas, kuris suteikia didelį mechaninį standumą, lyginant su srautiniuose vandenyse augančiais dumbliais, kurių lankstumas yra didesnis [3].

Buvo analizuojama įvairių, iš dumblių išskirtų, alginatų sudėtis. Taip pat laboratorijos sąlygomis buvo atliktos alginato modifikacijos, siekiant išplėsti alginatų pramoninį panaudojimą. Vienas iš pirmųjų alginato biosintezės iš rudųjų dumblių analizės metodas parodė, kad dėl polimerizacijos lygiavertės biocheminės reakcijos gali egzistuoti ir rudoosiuose dumbliuose, ir bakterijose. Esminiai skirtumai egzistuoja modifikacijos lygmenyje ir baltymų sąveikos tinkle [3].

Dumblių rūšis	F_G	F_M	F_{GG}	F_{MM}	F_{GMAG}	Act. (%)
<i>Laminaria hyperborea</i>	0.49–0.63	0.37–0.51	0.31–0.52	0.26–0.32	0.11–0.19	–
<i>Laminaria japonica</i>	0.35	0.65	0.18	0.48	0.17	–
<i>Laminaria digitata</i>	0.41–0.59		0.25	0.43	0.16	–
<i>Ascophyllum nodosum</i>			0.22	0.38	0.21	–
<i>Macrocystis pyrifera</i>			0.20	0.37	0.21	–
<i>Lessonia nigrescens</i>			0.22	0.40	0.19	–
<i>Durvillaea Antarctica</i>	0.32	0.68	0.16	0.51	0.17	–
Bakterijų rūšis						
<i>P. aeruginosa</i>	0.3	0.7	–	0.40	0.30	28
<i>P. fluorescens</i>	0.40	0.60	–	0.2	0.4	12–
	0.27–	0.65–		0.30–	0.40	17.5
	0.35	0.73		0.46		
<i>P. putida</i>	0.22–	0.78–	–	0.56–	0.22–	18–
	0.37	0.63		0.26	0.37	21
<i>P. mendocina</i>	0.26	0.74	–	0.48	0.26	nd
<i>A. vinelandii</i>	0.25–	0.75–	0.07–	nd	nd	nd
	0.75	0.25	0.65			
	0.45–	0.55–	0.43–	0.52–	0.02–	nd
	0.94	0.06	0.93	0.04	0.01	

1.3 pav. Alginatų, išskirtų iš skirtingų šaltinių, sudėtis [3]

1.5.2. Alginatas iš bakterijų

Bakterijų rūšys, kurios priklauso *Pseudomonas* ir *Azotobacter* gentims, kaip ir skirtingų rūšių dumbliai, gamina įvairius alginatus, kurie pasižymi skirtingomis savybėmis. Alginatai atlieka apsauginę funkciją, nes apsaugo juos gaminančias bakterijas nuo nepalankių sąlygų. Patogeno *P. aeruginosa* gaminamas alginatas sudaro ekstraląstelinę polimerinę medžiagą, į kurią yra įterpiami ląstelių agregatai [18]. Azotą fiksuojančioms dirvožemio bakterijoms *Azotobacter vinelandii* alginatas reikalingas kaip apsauginis komponentas infekciniuose procesuose. Taip pat jis yra gaminamas kaip ekstraląstelinis polisacharidas vegetaciniu būdu, kai augančios ląstelės prisitvirtina prie paviršių. Iki šiol informacija apie alginatų biosintezę buvo gaunama remiantis bakterijų modeliu organizme *P. aeruginosa*, kuriame alginato gamyba yra skiriamasis lėtinės infekcijos cistinės fibrozės ženklas. Alginatai, kuriuos gamina bakterijos, yra skirtingai acetilinti. Iš *Azotobacter* bakterijų gautame alginate yra visų blokų struktūrų tipai, o *Pseudomonas* bakterijų alginate yra tik M ir MG blokai, bet nėra G blokų [3].

Azotobacter bakterijų gentis priklauso gama-proteobakterijoms. Tai – aerobinės, laisvai gyvenančios heterotrofinės ir gram-neigiamos dirvožemio bakterijos. Šios bakterijos fiksuoja azotą NIF genais. Šis procesas yra žinomas žemės ūkio pramonėje ir gali skatinti augalus gaminti naudingus produktus, tokius kaip vaistinės medžiagos. Bakterijų rūšys *Azotobacter vinelandii* ir *Azotobacter chroococcum* gamina du biotechnologijos srityje svarbius polimerus: alginatą ir poli-β-hidroksibutirata, kuris yra intraląstelinis poliesteris, priklausantis polihidroksialkanoatų šeimai. Buvo įrodyta, kad alginato gamyba yra labai svarbus procesas, apsaugantis *Azotobacter vinelandii* nitrogenazę kultūroje, kurioje yra ribotas fosfato druskų kiekis ir nėra azoto. Azoto bakterijos skiriasi nuo kitų alginatą gaminančių bakterijų, pavyzdžiui *Pseudomonas aeruginosa* tuo, kad jos yra nepatogeninė bakterijų rūšis. Dirvožemis yra geriausia aplinka *Azotobacter* bakterijų rūšims egzistuoti dėl ten esančio organinio fosfato druskų šaltinio [22].

Azotobacter vinelandii yra stabiliausias acetilinto alginato šaltinis, kuris gamina biopolimerą įvairiomis *in vivo* ir *in vitro* sąlygomis. Alginatas yra ne tik perteklinis metabolitas, bet ir atlieka

apsauginio barjero funkciją prieš sunkiuosius metalus ir suteikia ląstelėms apsaugą prieš nepalankias aplinkos sąlygas. *A. vinelandii* yra auginamos diazotrofiškai, esant įvairioms deguonies koncentracijoms. Bakterijos formuoja alginato kapsules, netgi esant aukštomis šlyties jėgoms fermentatoriuje. Be to, *A. vinelandii* bakterijų alginato kapsulių formavimo pajėgumas didėja, didėjant ištirpusio deguonies koncentracijai (pO_2) [24].

1.6. Alginatiniai geliai

Alginato gelis yra nenutrūkstantis biopolimerinis tinklas, išbrinkęs vandenyje. Hidrogelių tinklas yra sujungtas nekovalentiniais ryšiais. Alginato gelių savybėms didelę įtaką daro tokie faktoriai, kaip alginato cheminė sudėtis, molekulinė masė ir molekulinės masės pasiskirstymas polimere [5].

Kai natrio alginato tirpalas sureaguoja su kalcio ar kitais divalenciais katijonais, greitai pradeda vykti stiprus ir negrįžtamas alginato gelio formavimasis. Alginato gelių susidarymas yra ypatingas, nes jis visai nepriklauso nuo naudojamos temperatūros ir gauti geliai išlieka stabilūs kaitinant. Alginatiniai geliai, sujungti joniniais ryšiais, yra paruošiami naudojant du skirtingus metodus:

1. difuzijos metodu;
2. želatinizacijos metodu.

Šie du metodai skiriasi jungiamojo jono įvedimu. Difuzijos metodas išsiskiria tuo, kad vyksta kalcio (ar kito divalencio jono) difuzija iš išorinio rezervuaro į alginato tirpalą. Šis metodas yra plačiai taikomas ne tik maisto pramonėje, bet ir tapo labai populiaria imobilizacijos technologija. Difuzijos metodas yra labai greitas ir jį naudojant susidaro homogeniškas alginato granuliuojamą pasiskirstymą tirpale [5].

Vidinis želatinizacijos metodas paremtas neaktyvios formos jungiamojo jono ir alginato tirpalo maišymu. Naudojami kalcio jonai gali būti gaunami iš $CaCO_3$ ar Ca^{2+} ir EDTA komplekso. Taip pat gali būti naudojami citratai. Ca^{2+} jonai gali būti išlaisvinti sumažinus terpės pH. Tai atliekama pridendant organinių rūgščių ar lėtai hidrolizuojant laktonus. Šis metodas leidžia atlikti lėtą ir lengvai kontroliuojamą gelių formavimą ir beveik visada užtikrina homogenišką alginato pasiskirstymą gelio viduje. Naudojant sistemą, kurioje alginatas yra sumaišytas su $CaCO_3$ ir GDL, gelio kinetika gali būti kontroliuojama keičiant praktinį kalcio karbonato kiekį. Taip pat, gauto gelio pH vertė gali būti lengvai nustatoma reguliuojant kalcio druskos ir GDL kiekių santykį. Vidinės želatinizacijos metodu gautas gelis yra stipresnis ir atsparesnis lyginant su difuzijos metodu gautu geliu [5].

1.7. Biologinis alginato suderinamumas

Alginato biologinis suderinamumas yra labai vertinamas *in vivo* ir *in vitro* procesuose, tačiau vis dar yra diskutuojama dėl alginato sudėties poveikio. Tyrimais nustatyta, kad išgautas alginatas pasižymi skirtingu grynumo lygiu. Pavyzdžiui, atlikus tyrimus, nustatyta, kad alginatai, kurių sudėtyje yra gausu M-blokų yra imunogeniniai ir turi apytiksliai 10 kartų didesnę tikimybę gaminti citokinus, lyginant su alginatais, kurių sudėtyje yra daugiau G-blokų. Tačiau ne visais tyrimais buvo gauti vienodi rezultatai ir kitais kartais pastebėtas tik labai nedidelis imunogeninis poveikis, arba jo visai neaptikta. Imunogeninį atsaką į injekciją ar implantą gali sukelti nešvarumai likę alginatais. Kai alginatas yra išgaunamas iš natūralių šaltinių, jame gali būti gausu tokių nešvarumų kaip sunkieji metalai, endotoksinai, baltymai ir polifenoliniai junginiai. Labai svarbu, kad alginatas būtų gryninamas atliekant daugiastadijinę valymo procedūrą. Ši procedūra turi būti atliekama kol yra pasiekiamas pakankamas alginato grynumas, užtikrinantis, kad implantui patekus į gyvūno

organizmą neįvyks reikšmingos svetimkūnių reakcijos. Atliekant bandymus su pelėmis, t. y. suleidžiant gelį, kuris buvo gautas iš komercinio, gerai išvalyto alginato, po oda, nebuvo pastebėta jokių reikšmingų uždegiminių reakcijų [2].

1.8. Alginato panaudojimas

Dėl biologinio ir citologinio suderinamumo bei skaidumo, natūralius hidrogelius formuojančios medžiagos yra naudojamos audinių inžinerijoje, kaip išorinė ekstraląstelinė matrica. Hidrogeliai, gauti iš natūralių medžiagų, pasižymi panašia struktūra, kaip ir išorinė ekstraląstelinė matrica iš natūralių audinių. Polimerinė šių hidrogelių struktūra yra panaši į biologinių makromolekulių struktūrą, kurią sukūrė gamta. Dėl šios struktūros biomolekulės gali atlikti specifines funkcijas žmogaus organizme [19]. Tarp populiariausių hidrogelių yra alginatas – anijoninis polimeras. Vis didesnis dėmesys yra skiriamas jo panaudojimui audinių inžinerijoje. Alginatas yra biologiškai suderinamas, nenuodingas ir neimunogeninis. Kitos svarbios savybės, lemiančios platų alginatų panaudojimą audinių inžinerijoje, yra maža jų kaina ir geras prieinamumas. Pagrindinis alginatų privalumas yra tai, kad jie greitai sudaro gelius esant švelnioms pH ir temperatūros sąlygoms. Šios sąlygos yra tinkamos gyvoms ląstelėms ir jautrioms biomolekulėms, tokioms kaip baltymai ir nukleorūgštys. Dėl greitos joninės želatinizacijos ir švelnių šio proceso sąlygų, alginatas yra plačiai naudojamas ląstelių, vaistų, fermentų ir biomolekulių įkapsuliavimui, taip pat audinių bioproduktų ar organų tipo struktūrų gamybai. Alginatas yra plačiai naudojamas kaip hidrogelis tirti ląstelių elgesį 3D sistemose. Alginatas yra naudojamas, nes išreiškia audinių lankstumą, pasižymi viskoelastinėmis savybėmis, panašiomis į gimtąsias audinių savybes. Hidrogelio būsenoje alginatas sulaiko didelį vandens kiekį. Yra sudaroma audinio tipo aplinka įterptosioms arba įkapsuliuotoms ląstelėms. Be to, dėl natūralaus hidrogelio porėtumo, alginato matrica yra pusiau pralaidi. Tai suteikia galimybę deguoniui, maistinėms medžiagoms ir metabolitams patekti į ląstelę. Tuo pačiu, pusiau laidži matrica apsaugo įkapsuliuotą ląstelę nuo toksiinių svetimkūnių [3].

1.2 lentelė. Alginato panaudojimas ir funkcijos

Panaudojimas	Funkcijos
Maisto pramonė	
Gėrimai	Stabilizuoja, tirština
Ledai	
Želiniai gaminiai	
Alkoholiniai gaminiai	Įkapsuliuojamos mielių ląstelės
Farmacijos pramonė	
Ląstelių kultūros ir transplantacija	Įkapsuliavimas
Dantų protezavimas	Formavimas, liejimas
Tabletės	Sulipina, stabilizuoja
Žaizdų perrišimas	Absorbuoja, stabdo kraujavimą
Kitos pramonės	
Audiniai	Surišanti medžiaga
Popierius	Užpildymo medžiaga
Dažai	Stabilizatorius

1.8.1. Alginato panaudojimas medicininiams tikslams

Alginatų svarba sveikatos ir farmacijos pramonėje nuolat auga. Po pirmojo sėkmingo ląstelių įkapsuliavimo, alginato matricos tapo plačiai naudojamos ląstelių kultūroms ir transplantacijai. Mokslininkai toliau tyrė hibridomų ląstelių panaudojimą monokloninių antikūnų gamyboje, vaistų imobilizavime, kurie naudojami ilgalaikio veikimo sistemose. Alginatas taip pat buvo įtrauktas į tablečių, turinčių bioadhezinių savybių, sudėtį. Mažos molekulinės masės natrio alginato (10-100 kDa) vartojimas oraliniu būdu gali padėti hipercholesterolemijos ir cukrinio diabeto gydyme. Po fiziologinio alginato gelėjimo cholesterolis ir gliukozė yra įkapsuliuojami skrandyje [20].

Dažniausiai, atliekant tyrimus su alginatais, bandoma suformuoti juos kaip matricą, kuri padėtų prailginti vaisto veikimą. Tiriant vaistus, tokius kaip ibuprofenas, omeprazolis ir mefenamino rūgštis, buvo naudojamos ir kitos polimerinės pagalbinės medžiagos, tokios kaip HPMC, laktozė ir chitozanas. Šios polimerinės medžiagos naudojamos siekiant pagerinti paruoštų tablečių, į kurių matricos sudėtį įeina alginatas, kokybę. Neutralios HPMC grupės neskatina jokios elektrostatinės sąveikos su alginatų hidroksilo grupėmis (-OH). HPMC grupės, dėl jų ilgos molekulinės struktūros, pagerina sukibimą su alginatais. Taigi, HPMC taip pat galėtų pakeisti ir optimizuoti natrio alginato bioadhezines savybes, kurios leidžia natrio alginatą naudoti kaip medžiagą veiksmingoms vaškinėms lipnioms tabletėms gaminti. Atlikus FT-IR tyrimus buvo daroma prielaida, kad mažesnės laktozės molekulės galėtų užpildyti tarpus tarp polimerinių alginatų grandinių, sąveikauti ir deprotonuoti alginatų karboksilo grupes. Šis poveikis padidina atstumiamąsias jėgas ir daro įtaką alginatų konformacijai. Taigi, laktozė gali būti naudojama, kaip medžiaga palengvinanti veikliosios medžiagos išlaisvinimą iš tablečių, į kurių matricą įeina alginatas. Geriamosios kontroliuojamo veikimo tabletės, paruoštos suspaudžiant veikliąją medžiagą ir sausą natrio alginato bei kalcio mišinį, pasižymėjo laipsnišku tirpumu ir progresuojančiu vaisto išlaisvinimu į virškinamojo trakto skystį. Plūduriuojančių plokščių pavidalo alginato struktūrų susidarymas skrandyje gali mechaniškai slopinti skrandžio refliksą [20].

Alginatai gali būti gaunami įvairiose formose, pavyzdžiui kaip kempinės, plėvelės ar ekstrudatai (audiniai ar tvarsčiai). Tai priklauso nuo skersinių ryšių sudarymo. Dabartinių tyrimų metu stengiamasi suprasti alginatinių preparatų privalumus žaizdų gydyme, bei pagerinti jų funkcijas šioje srityje. Viena iš svarbiausių savybių, dėl kurių alginatas gali būti naudojamas žaizdų gydymui, yra jo mechaninis vientisumas. Tvarstis, į kurio sudėtį įeina alginatas, turi išlikti pakankamai stiprus jo tikslinio naudojimo metu. Buvo iširta, kad alginatų sudėtis, tai yra manurono ir galurono rūgščių likučių santykis, lemia susiformavusių pluoštų fizikines savybes. Taip pat buvo iširtas uronatų kiekio poveikis alginato pluošto mechaniniam stiprumui ir atsparumui. Mokslininkai ištyrė galimybę pagerinti alginato pluoštus panaudojant chitozaną. Struktūriniu požiūriu chitozanas yra katijoninio pobūdžio polimeras. Jis sudaro stiprius joninius ryšius su anijoninio pobūdžio alginatais. Taip pat mažesnės hidrolizuoto chitozono molekulės galėtų geriau įsiskverbti į bazinę alginato pluošto struktūrą ir sustiprinti jo mechanines savybes [20]. Tyrimas parodė, kad hidrolizuoto chitozono panaudojimas gali padidinti susidarančių pluoštų atsparumą tempimui. Taip pat atlikti tyrimai, kuriais buvo nustatytas divalenčių Ca^{2+} , Cu^{2+} ir Zn^{2+} jonų poveikis, taip pat Na^+ poveikis alginato mechaninėms savybėms, skersinių ryšių susidarymo metu. Atlikus tyrimą nustatyta, kad pridėjus Na^+ padidėjo plėvelių atsparumas tempimo jėgai, lyginant su tomis alginato plėvelėmis, kurių skersiniams ryšiams sudaryti buvo naudojamas Ca^{2+} . Tačiau buvo gautas priešingas rezultatas, lyginant plėveles, kurių gamybai buvo naudojami Cu^{2+} ir Zn^{2+} jonai. Taigi, kruopštus skersinius ryšius sudarančių katijonų parinkimas yra svarbus siekiant užtikrinti, kad tvarsčių, į kurių sudėtį įeina alginatas,

funkcijos nebūtų pažeistos [20]. Mokslininkai daug dėmesio skyrė žaizdų priežiūrai nuo mikroorganizmų. Kadangi žaizdos, atsiradusios dėl nudegimų yra puiki aplinka bakterijų augimui, tyrėjai bandė atrasti vaistą, kuris skirtas gydyti antrines žaizdų infekcijas. Šis vaistas buvo užnešamas ant alginato pluošto paviršiaus. Tyrimai, atlikti naudojant sidabro sulfadiaziną, kuriuo buvo užpildytos alginato kempinės. Naudojant šias kempines, buvo pastebėtas žaizdos gijimo poveikis. Tyrimai buvo atlikti su Wistar žiurkėmis. Visiška alginatų bioabsorbcija ir alerginių reakcijų bei atmetimo nebuvimas audiniuose parodo implantuoto alginato biologinį suderinamumą. Metalai, kurie pasižymi antibakteriniu poveikiu taip pat buvo įtraukti į alginato tvarsčius arba panaudoti kartu su kitais antibakteriniais agentais, siekiant pagerinti bendrą antibakterinį poveikį. Toliau buvo tiriamas skersinius ryšius sudarančių katijonų ir dažniausiai naudojamų antibakterinių agentų suderinamumas. Dvivalenčių katijonų, tokių kaip Cu^{2+} ir Zn^{2+} , antibakterinis aktyvumas kovoje su odos patogenais *S. aureus* ir *P. aeruginosa* buvo didesnis nei Ca^{2+} jonų. Šie jonai taip pat buvo gerai suderinami su įprastais antibakteriniais agentais. Pagrindiniai žaizdų gydymo požymiai yra audinių atstatymas ir regeneravimas. Atsiradus audinių inžinerijai, buvo įdėta daug pastangų, siekiant integruoti žaizdų gijimo komponentus/ląsteles į biologiniu suderinamumu pasižyminčius polimerus. Šio proceso tikslas yra sukurti aplinką, kurioje ląstelės, reikalingos audinių regeneravimui, galėtų išlikti gyvybingos. Mokslininkai įtraukė hibridinius peptidus (pagamintus iš laminino ir elastino) į komerciškai prieinamą tvarstinį pluoštą. Tyrimų su gyvūnais metu buvo atliktos audinių epitelizacija ir regeneracija. Bandymų su gyvūnais rezultatai parodė, kad transplantacijos ląstelės gali būti tiekiamos alginato matricose audinių ar gyvybiškai svarbių organų atstatymui. Žmogaus hepatocitai, patalpinti į alginato matricas, išliko gyvybingi ir perspektyviai naudojami kepenų transplantacijai. Alginato matrica gali būti modifikuojama paruošimo proceso metu, siekiant sukurti geresnę ląstelių tiekimo sistemą. Pavyzdžiui, porėta alginato kempinė, gauta naudojant šaldymą ir liofilizavimą, geriau išlaikė fibroblasto kultūrą nei įprastos kolageno matricos. Paprastai skersinius ryšius turintys tirpalai ir ląstelės, sudėtyje turinčios alginato, gali būti atskirai įterpiami į dvigubą švirkšto aplikatorių. Skersinių ryšių susidarymas ir gelio susidarymas vyksta vienu metu, kai turinys yra ekstruduojamas per bendrą diafragmą. Palaipsnis alginato gelio matricos susidarymas geriau vyksta žaizdos ertmėje, todėl toks panaudojimas yra lengvas ir ekonomiškąs. *In situ* injekcinis alginato hidrogelis yra potencialiai naudingas žaizdų tvarsčių gamyboje. *In vivo* gelėjimo technologija taip pat naudinga kremzlių gydymui. Chondrocyto-alginato suspensija buvo suleista tiesiai į sužeistą audinį. Po to uždengiama skersiniais ryšiais sujungtu kalcio chloridu, kad žaizda būtų užsandarinta. Po šio veikimo nebuvo pastebėta fibrozė, o pagydytos kremzlės pasižymėjo geru struktūriniu tęstinumu [20].

1.8.2. Alginato taikymas osteoartrito gydyme

Osteoartritas – dažniausia pasaulyje sąnarių liga. Jos metu susidaro būklė, kai senstant sąnarių kremzlės dyla, plonėja, todėl sąnario judesiai tampa skausmingi, sudėtingesni, sąnarys gali patinti. Be bendrųjų oligosacharidų funkcijų, alginatas taip pat atlieka unikalias biologines funkcijas, pavyzdžiui apsaugo organizmo audinius ir makromolekules nuo atšiaurių aplinkos sąlygų. Alginatas pasižymi tam tikru efektu, kovojant su osteoartritu. Buvo sukurtas osteoartrito gydymo modelis, kurio būdu priekinis sąnario raištis, atliekant intraartikuliarinę injekciją, buvo veikiamas skirtingos molekulinės masės alginatais (430 kDa, 1000 kDa ir 1,700 kDa). Rezultatai parodė, kad alginatas, kurio masė 1000 kDa turi didžiausią potencialą būti panaudotas osteoartrito prevencijai ir gydymui. Šis alginatas žymiai sušvelnina sąnarių kremzlių degeneraciją ir sumažina sąveikos trinties koeficientą. Įrodyta, kad alginatas turi terapinį poveikį osteoartrito gydymui, tačiau jo ikiklinikiniai

tyrimai, tokie kaip toksikologija, vaistų metabolizmas ir veikimo mechanizmas dar nėra baigti atlikti. [21].

1.8.3. Antioksidacinės alginato savybės

Antioksidantai sumažina oksidacinę žalą, kurią sukelia laisvieji radikalai. Šiomis dienomis mokslininkai stengiasi naudoti natūralius antioksidantus, tokius kaip alginatai. Moksliniai tyrimai taip pat parodo, kad alginatinis polimeras turi antioksidacinių savybių ir šios savybės stiprėja, kai polimerinė grandinė sutrumpėja iki oligosacharido. Antioksidantai yra plačiai naudojami medicinoje ir maisto pramonėje.

Priklausomai nuo keletos faktorių tokių kaip dumblių rūšis, ekologiniai ir sezoniniai pokyčiai bei alginato bandinių amžius bei tipas, cheminė alginatų sudėtis ir molekulinė masė gali žymiai skirtis. Kita vertus, alginato išskyrimo ir apdirbimo sąlygos gali daryti didelę įtaką izoliuoto alginato struktūrai ir sandarai, o vėliau ir jo praktinei naudai bei antioksidaciniam aktyvumui [23].

1.8.4. Antibiotikams atsparių bakterijų veikimas, įkapsuliuojant ZnO nanodaleles į alginatą

Antibiotikams atsparių bakterijų buvimas vandenyje kelia didelį susirūpinimą visame pasaulyje, nes jos sukelia neigiamą poveikį sveikatai. Neseniai antibiotikams atsparios bakterijos buvo aptiktos daugelio šalių geriamajame vandenyje [33]. Yra žinoma, kad šios bakterijos sukelia sunkias ligas ir yra atsakingos už mažiausiai 2 mln. infekcijų ir 23 000 mirčių kiekvienais metais Jungtinėse Valstijose [36]. Tradicinės dezinfekacijos technologijos, tokios kaip ultravioletinė spinduliuotė, poveikis ozonu ar chloru šiuo metu yra naudojamos antibiotikams atsparių bakterijų inaktyvavimui vandenyje [34]. Tačiau šie metodai nėra labai veiksmingi, nes jiems reikalingos didelės preparato dozės ir ilgas kontakto laikas. Taip pat yra pagaminami šalutiniai nepageidaujami produktai [36].

Buvo atlikti tyrimai, kurių metu buvo tiriamas ZnO nano dalelių taikymas antibiotikams atsparių bakterijų šalinimui. ZnO nano dalelės buvo įkapsuliuotos į alginato biopolimerinį tirpalą. Šio proceso metu buvo gautas sorbentas, kurio struktūra neleidžia nano dalelėms išsiplauti į valomąjį vandenį. Taip pat juos galima panaudoti pakartotinai [36]. Bakterijų šalinimas nano dalelėmis yra laikomas santykinai efektyvesniu, labiau prieinamu (jei galima daleles naudoti pakartotinai) ir saugesniu metodu, nes nesusidaro jokie nuodingi dezinfekavimo šalutiniai produktai, lyginant su dezinfekavimu įprastinėmis dezinfekacijos priemonėmis [35].

Tyrimų metu patvirtinta, kad šis metodas ekonomiškai naudingas, nes sorbentą galima panaudoti pakartotinai nepertraukiamame vandenvalo procese. ZnO nano dalelių – alginato sorbento poveikis buvo priklausomas nuo tokių faktorių: bakterijų koncentracijos, poveikio laiko, tirpalo pH, dispergento ir sorbento kiekio. Biopolimeras alginatas, veikiantis kaip disperguojanti medžiaga, taip pat atlieka vaidmenį bakterijų inaktyvavimo procese. Disperguojanti medžiaga gali sustiprinti elektrostatinį atostūmį ir tokiu būdu užkirsti kelią nano dalelių kaupimuisi, bei išlaikyti didelį paviršiaus plotą. Kaip įrodyta pakartotiniu sorbento panaudojimo tyrimu, net ir ypač didelį susirūpinimą keliantys teršalai (*P. aeruginosa*) buvo nesunkiai paveikiami, nuolatinio proceso metu. ZnO nano dalelės, įkapsuliuotos į alginatą, yra perspektyvi antibakterinė medžiaga, užtikrinanti, kad aplinkai žala darančios nano dalelės nepatenktų į apdorojamą vandenį. Naudojant šią antibakterinę medžiagą yra užtikrinama apsauga aplinkai ir visuomenės sveikatai [36].

1.9. Įvairių veiksnių įtaka alginato gamybos optimizavimui

1.9.1. Terpės komponentų (maistinių medžiagų) įtaka

Buvo atlikta daug bandymų siekiant atrasti geriausią terpę, kurioje *Azotobacter* rūšies bakterijos galėtų gaminti alginatą jų fermentacijos proceso metu. Tiek naudingas, tiek žalingas fiksuoto azoto kiekio bakterijų augimo terpėje poveikis buvo kruopščiai ištirtas. Terpėje susikaupęs azotas gali riboti alginato gamybą. Naudojant peptoną augimo terpėje alginato produkcija gali padidėti 30 %. Dėl šio reiškinio peptonas atlieka svarbų vaidmenį mitybinėje bakterijų terpėje kaip azoto šaltinis [24].

1.9.2. Fosfato druskų poveikis alginato produkcijai iš bakterijų

Fosfato druskų poveikis alginato gamybai iš *Azotobacter vinelandii* yra vertinamas dvejopai. Kai kurie tyrėjai fosfatą mitybinėje terpėje laiko kaip buferinį agentą. Kita vertus, esant fosfato druskų pertekliui, yra gaunama didesnė alginato išeiga. Derinant fosfato druskų kiekį ir ląstelių kvėpavimo reikalavimus (kvėpavimo koeficientas) galima reguliuoti alginato produkcijos išeigą [24].

1.9.3. Ištirpusio deguonies poveikis

Ištirpęs deguonis yra labai svarbus alginato produkcijos procese, kai bakterijų augimo terpėje yra gausu azoto ir fosforo. Buvo ištirtas alginato išgavimas iš *Azotobacter*, kai yra palaikoma pH reikšmė 7, temperatūra 35 °C, procesas periodinis, o ištirpęs deguonies kiekis nekontroliuojamas. Šiomis sąlygomis bakterijų augimo greitis buvo didelis, tačiau maksimali gauto alginato išeiga maža. Bakterijų augimo kinetika ir alginato produkcija, naudojant *Azotobacter vinelandii* ir gliukozę kaip anglies šaltinį, taip pat buvo tirta, kai produkcijos terpėje buvo gausu azoto bei fosfato druskų. Laboratoriniame fermentatoriuje pH vertė buvo lygi 7, o temperatūra 37 °C. Periodiniai fermentacijos procesai buvo vykdomi nekontroliuojant ištirpusio deguonies kiekio ir taip pat, kai ištirpusio deguonies kiekis siekė 1, 2, 5 ir 10 %. Nors bakterijų augimas buvo greitesnis, kai ištirpusio deguonies terpėje buvo daugiau, tačiau maksimali biomasės koncentracija buvo žemesnė. Kai ištirpusio deguonies koncentracija siekė 10%, alginato nebuvo išskirta. Alginato produkcija vyko greičiau esant deguonies koncentracijai 5 ir 2 %, tačiau didesnė alginato išeiga buvo pasiekta, kai ištirpusio deguonies koncentracija nebuvo kontroliuojama. Tokiu atveju buvo gautas polimeras su didžiausia molekuline mase, o specifinis bakterijų augimo greitis buvo apie 0,02-0,04 g/h. Amoniakinio azoto likutinė koncentracija siekė nuo 0,01 iki 0,02 g/L, o proceso pabaigoje ypač sumažėjo. Ištirpusio deguonies koncentracija, labiausiai tinkanti alginato produkcijos procese yra 3-5%. Taip pat nitrogenazės aktyvumo mažinimas padeda organizmui gaminti daugiau alginato [24].

1.9.4. Maišymo poveikis alginato produkcijos terpėje

Išgaunamo alginato iš *Azotobacter sps* išeiga labai priklauso nuo įvairių fermentatoriaus apsisukimų per minutę reikšmių, kai pH reikšmės yra kontroliuojamos. Didžiausia pasiekta alginato produkcijos išeiga buvo 2 g/L, kai apsisukimų skaičius per minutę siekė 500 – 600. *Azotobacter vinelandii* mutantinė veislė NCIB 9068 pagamina 6,22 g/L alginato, kai apsisukimų skaičius per minutę siekia 170 ir terpės pH reikšmė nebuvo kontroliuojama [31]. Padidinus apsisukimų skaičių per minutę nuo 200 iki 400, bakterijų augimo greitis padidėjo nuo 0,165 iki 0,239 g/h. Alginato produkcija vyko efektyviausiai, kai apsisukimų skaičius per minutę siekė 400. Šiomis sąlygomis fermentacijos pabaigoje buvo pasiekta didžiausia alginato išeiga – 4,51 g/L. Maišymo greičio padidinimas, kartu su kitais faktoriais, tokiais kaip aeracija ir fosfato druskų koncentracijos kontroliavimas terpėje buvo naudojamas daugelio autorių, siekiant optimizuoti alginato produkciją. [24].

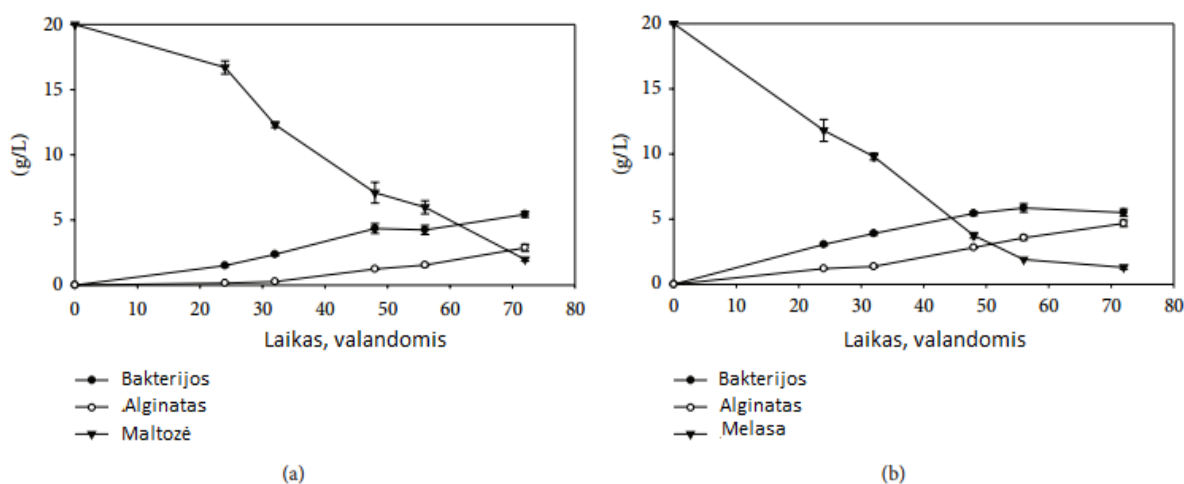
1.10. Skirtingų anglių šaltinių įtaka alginato gamybos procese

Vienas pagrindinių parametrų, kuris lemia bakteriologinio alginato kainą yra produkcijos terpėje naudojami anglių šaltiniai. Alginato išgavimas iš bakterijų buvo tiriamas daug metų, kaip anglių šaltinius terpėje naudojant gliukozę arba sacharozę, dėl to, kad šie anglių šaltiniai yra paprastieji cukrūs ir bakterijos gali lengvai juos pasisavinti. Atliekų srautas (paprastai maisto perdirbimo nuotekų, kuriose yra įvairių cukrų, pavyzdžiui, alaus nuotekos ar sūrio išrūgos) arba pigesnis anglių šaltinis gali būti alternatyva, siekiant sumažinti biopolimerų gamybos sąnaudas. Melasa – cukraus gamybos šalutinis produktas gali būti naudojama, kaip pigesnis alternatyvus anglių šaltinis. Melasoje yra daugiausia cukrų. Pavyzdžiui gliukozės ir fruktozės melasos sudėtyje yra iki 50%. Alginato gamyba, naudojant melasą yra vykdoma gan retai [25]. Maltozė yra pagrindinis cukrus, susidarantis alaus gamybos nuotekose [29]. Šio proceso metu savyklas yra paverčiamas cukrumi maltoze, kuris taip pat yra pašalinamas su vandeniu. Šis cukrus buvo naudojamas biopolimerų gamybai. Polimeras, gautas naudojant maltozę, buvo naudojamas reaktyvių tirpių dažų pašalinimui. Krakmolas, randamas vandens nuotekose, taip pat buvo naudojamas biopolimerų gamybos sąnaudų mažinimui, pvz., PHB, ksantano, celiuliozės ir bioflokulianto [25].

Yra svarbu sumažinti iš bakterijų išskiriamo alginato kainą, taigi yra ieškoma alternatyvių anglių šaltinių alginato gamybai. Tiriant alginato produkcijos procesą ir jo savybes buvo pasirinkti trys skirtingi anglių šaltiniai – maltozė, melasa ir krakmolas. Produkcija buvo vykdoma iš *Azotobacter vinelandii* 72 valandas, 30 °C temperatūroje, maišant 250 aps/min. greičiu. Palyginimui taip pat buvo naudojama gliukozė ir sacharozė. Bakterijų ląstelių biomasė buvo panaši naudojant visus cukrus, išskyrus krakmolą. Galima sakyti, kad bakterijos gali taip pat lengvai pasisavinti maltozę ir melasą, kaip ir gliukozę ar sacharozę. Atitinkamai ir cukraus panaudojimo išeiga bakterijų produkcijai buvo panaši visais atvejais ir artima 0,3 g bakterijų / g cukraus [25]. Maltozė yra disacharidas, sudarytas iš dviejų gliukozės vienetų ir kaip buvo nurodyta anksčiau, didžiąją dalį cukraus kiekio melasoje sudaro gliukozė, fruktozė ir sacharozė. Kai buvo naudojamas krakmolas, bakterijų augimas nebuvo fiksuojamas per 72 valandas. To priežastis gali būti polimerinė krakmolo prigimtis. Kaip anglių šaltinį naudojant gliukozę ir sacharozę, buvo gauta 3,5 g/L alginato išeiga, kuri atitinka apie 0,67 g alginato / g bakterijų išeigą. Ši išeiga buvo mažesnė, kai anglių šaltiniu buvo naudojama maltozė ir lygi 2,87 g/L. Ši vertė yra 20% mažesnė už gautą alginato koncentraciją naudojant sacharozę ir išeiga, pagrįsta bakterijų mase, yra lygi 0,527 g alginato / g bakterijų. Alginato sintezė buvo optimizuojama naudojant melasą kaip vienintelį anglių šaltinį terpėje. Alginato išeiga padidėjo iki 4,67 g/L (0,849 g alginato / g bakterijų) po 72 valandų inkubacijos, esant 30 °C temperatūrai ir maišymui 250 aps./min. greičiu. Nustatyta, kad melasoje yra mineralų, vitaminų ir baltymų, kurie kartu su cukrumi, gali pagerinti biopolimerų sintezę iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų [30]. Alginato produkcija nevyko, kai anglių šaltiniu buvo naudotas krakmolas. Kai kurie tyrėjai nustatė, kad krakmolas gali būti naudojamas biopolimerų produkcijos procese po poveikio fermentais, veikimo rūgštimi ar po hidrolizės. Krakmolo naudojimas reikalauja papildomų biopolimero gamybos proceso etapų, o proceso eigoje gali susidaryti papildomos atliekos [25].

Kaip matyti iš 1.4 paveikslėlio bakterijų augimas buvo greičiausias pirmas 48 valandas, kai anglių šaltiniu buvo naudojama maltozė, o po to augimas tapo lėtesnis. Didžiausia bakterijų masė buvo gauta po 72 valandų ir lygi 5,44 g/L. Alginato produkcija vyko panašiai, kaip ir bakterijų augimas. Tai parodo, kad alginatas buvo gaminamas bakterijų augimo metu. Taip pat buvo gauti rezultatai, parodantys, kad alginato produkcija buvo atidėta iki vėlyvosios eksponentinės fazės. Galimai dėl aukštesnio tiekiamo absorbuojamo deguonies lygio proceso pradžioje vyksta inkubacinis laikotarpis,

kurio metu gaunama maža bakterijų masė. Esant dideliam deguonies kiekiui, bakterijos gali panaudoti anglies šaltinį, tam kad padidintų kvėpavimo dažnį, o ne alginatui gaminti. Tokiu būdu bakterijos apsaugo jautrius fermentus nuo deguonies poveikio. Kita vertus, didžiausia alginato koncentracija (2,87 g/L) buvo pasiekta, kai anglies šaltiniu buvo naudojama maltozė. Kaip ir bakterijų augimo, taip ir alginato produkcijos metu maltozės sunaudojimas buvo didžiausias po 24 valandų ir toks išliko viso eksperimento metu. To pasekoje, viso proceso metu buvo sunaudota apie 90 % maltozės, taigi proceso pabaigoje terpėje jos liko tik apie 2 g/L. Kaip matyti iš 1.4 paveikslėlio, melasa buvo sunaudojama greičiau, lyginant su maltoze. Apie pusę kiekio melasos buvo sunaudota po 32 valandų ir ši tendencija išliko pastovi iki 56 valandos. Panašiai kaip ir maltozė, beveik visa melasa buvo sunaudota po 72 valandų. Greitesnis melasos sunaudojimas lėmė geresnį bakterijų augimą ir alginato sintezę, lyginant su maltoze. Inkubaciniu etapu bakterijų koncentracija buvo didesnė naudojant melasą. Didžiausia bakterijų masė buvo pasiekta po 56 valandų ir lygi 5,86 g/L, nors bakterijų augimo greitis sumažėjo po 48 valandų. Alginato koncentracija augo iki 72 proceso valandos. Tuo metu ji buvo didžiausia ir lygi 4,67 g/L. Alginato išeiga, buvo padidinta nuo 0,159 iki 0,249 g alginato/ g cukraus, kai maltozė buvo pakeista į melasą [25].



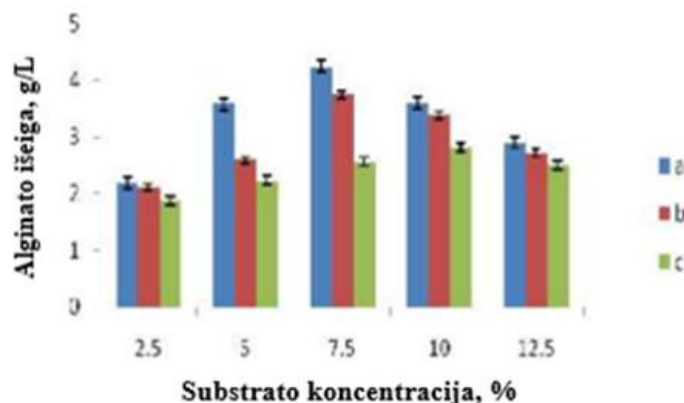
1.4 pav. Bakterijų augimo ir alginato produkcijos pokyčiai naudojant maltozė ir melasą

Alginato produkcijos procesas iš bakterijų turi būti ekonomiškėsnis lyginant su alginato gamyba iš dumblių. Kaip anglies šaltinį alginato produkcijos metu naudojant melasą, buvo gauta didelė alginato išeiga. Naudojant maltozė taip pat buvo gauti geri rezultatai [25].

1.11. Alginato gamyba, panaudojant antrines žaliavas

Pakistane yra daug žemės ūkio paskirties žemės ploto. Šimtas tūkstančių tonų žemės ūkio šalutinių produktų kasmet galėtų būti panaudota biotechnologijos procesuose naudingiems produktams tokiems kaip alginatas gaminti. Todėl, įvairūs žemės ūkio šalutiniai produktai, pvz., kviečių sėlenos, ryžių lukštai ir melasa buvo išbandyti, kaip nebrangūs anglies šaltiniai alginato gamybos procese. Naudojant kviečių sėlenas, kurių koncentracija buvo 7,5 %, po 48 valandų fermentacijos buvo gauta didžiausia alginato išeiga (4,23 g/L). Naudojant ryžių atliekas, kurių koncentracija taip pat 7,5 % buvo gauta 3,74 g/L alginato, o naudojant melasą, kurios koncentracija 10 % buvo gauta mažiausia alginato išeiga – 2,8 g/L. Taigi, kviečių sėlenos buvo įvertintos, kaip optimalus anglies šaltinis alginato gamybos procese. Tokius rezultatus galėjo lemti tai, kad kviečių sėlenose yra gausu krakmolo ir netirpių angliavandenių, taip pat mineralų ir vitaminų, kurie pagerina alginato gamybos

procesą. Didžiausia tirpių cukrų dalis yra krakmolo pavidalu. *Azotobacter vinelandii* gali gaminti amilazes ir tokiu būdu naudoti krakmolą, kad gautų reikalingos energijos metabolitų gamybos procesui [26].



1.5 pav. Skirtingų anglies šaltinių koncentracijos (%) įtaka alginato išeigai (g/L) iš *Azotobacter vinelandii* (a) kviečių sėlenos (b) ryžių atliekos (c) melasa

1.12. Inokulianto ir druskų koncentracijos įtaka alginato gamybai

Atlikus tyrimą buvo nustatyta optimali inokulianto koncentracija, kuri lygi 6 %. Naudojant tokį inokulianto kiekį buvo gauta kur kas didesnė alginato išeiga – 4,6 g/L. Mokslininkas Vermanis ir kt. nustatė kitokią optimalią inokulianto koncentraciją, leidžiančią pasiekti optimalią biopolimerų išeigą (8,25 g/L). Ši koncentracija lygi 2 %. Šiame tyrime nustatyta optimali mitybinės terpės pH reikšmė lygi 7. Remiantis įvairiomis studijomis ši pH reikšmė pripažinta optimalia egzopolisacharidų gamybai iš *Azotobacter vinelandii* [26]. Panduranganas ir kt. ištyrė, kad siekiant išgauti optimalų alginato kiekį, naudojant *Azotobacter chroococcum*, optimali pH reikšmė yra lygi 8. Kai yra naudojama didesnė, nei nustatyta optimali, pH reikšmė, yra sumažinama biopolimerui prieinama energija ir dėl to sumažėja alginato išeiga [28].

Buvo naudojamos įvairios druskų koncentracijos, siekiant gauti didesnę alginato koncentraciją, iš anksto optimizavus produkcijos sąlygas. Gerokai didesnė alginato išeiga (5,83 g/L) buvo gauta, kai buvo naudojama 1,5 % CaCl_2 koncentracija. Kai buvo naudojama 2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ druskos koncentracija, buvo gauta 6,08 g/L alginato. Pridėjus NaCl ir $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ druskų alginato koncentracija sumažėjo. Šiuos tyrimus patvirtina Garcia ir kt. (2001). Maksimalus alginato kiekis buvo gautas naudojant 0,05 g/L CaCl_2 ir 0,4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, o natrio jonai sukėlė alginato išeigos sumažėjimą. Panašią rezultatų tendenciją gavo ir Vermanis ir kt. (1997), naudojant *A. vinelandii* MTCC 2460. Didžiausia alginato išeiga buvo gauta naudojant 2 g/L CaCl_2 ir 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ir lygi 4,25 g/L. Didinant natrio ir fosfato jonų koncentraciją alginato išeiga sumažėjo [26]. Galal ir Ouda mokslininkų tyrimų rezultatai skyrėsi nuo šių tyrimų rezultatų. Didžiausia alginato išeiga buvo gauta iš *A. chroococcum* naudojant 0,2 % fosfato druskų koncentraciją [27]. Taigi, fosfato jonų poveikis egzopolisacharido gamybai literatūroje yra vertinamas prieštaringai.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Aparatūra

Tyrimams atlikti naudotos aparatūros sąrašas:

- autoklavas „CertoClav“;
- svarstyklės „Shimadzu“;
- svarstyklės „KERN“;
- svarstyklės „AXIS“;
- pH-metras „WinLab“;
- laminaras „Telstar BC-100“;
- spektrofotometras „Shimadzu UV-1280“;
- spektrofotometras „PG Instruments T80+“;
- magnetinė maišyklė „Heidoph MR Hei-Tec“;
- magnetinė maišyklė „IKA RH basic 2“;
- termostatas „Mettler IN 55“;
- vandens vonelė „Biosan BWT-U“;
- purtyklė – inkubatorius „Biosan ES-20“;
- centrifuga „Hettich Universal 320R“;
- keičiamo tūrio automatinės pipetės.

2.2. Medžiagos

Tyrimų metu bakterijų auginimui, alginato ir ląstelių biomasės išskyrimui ir produkto gryninimui buvo naudotos medžiagos, pateiktos 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Tyrimams naudotos medžiagos

Reagento pavadinimas	Cheminė formulė	Gamintojas
Gliukozė	$C_6H_{12}O_6$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Sacharozė	$C_{12}H_{22}O_{11}$	EUROCHEMICALS, Lietuva
Bakteriologinis peptonas	-	LIOFILCHEM, Italija
Magnio sulfatas	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	EUROCHEMICALS, Lietuva
Amonio nitratas	NH_4NO_3	EUROCHEMICALS, Lietuva
Dikalio hidro fosfatas	K_2HPO_4	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Kalcio chloridas	$CaCl_2$	ROTH, Vokietija
Amonio sulfatas	$(NH_4)_2SO_4$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Dinatrio hidro fosfatas	Na_2HPO_4	ROTH, Vokietija
Mielių ekstraktas	-	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
EDTA	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Natrio chloridas	$NaCl$	EUROCHEMICALS, Lietuva
Izopropanolis	C_3H_8O	EUROCHEMICALS, Lietuva
Druskos rūgštis	HCl	PO/ch, Lenkija
Sieros rūgštis	H_2SO_4	LACH-NER, Čekija

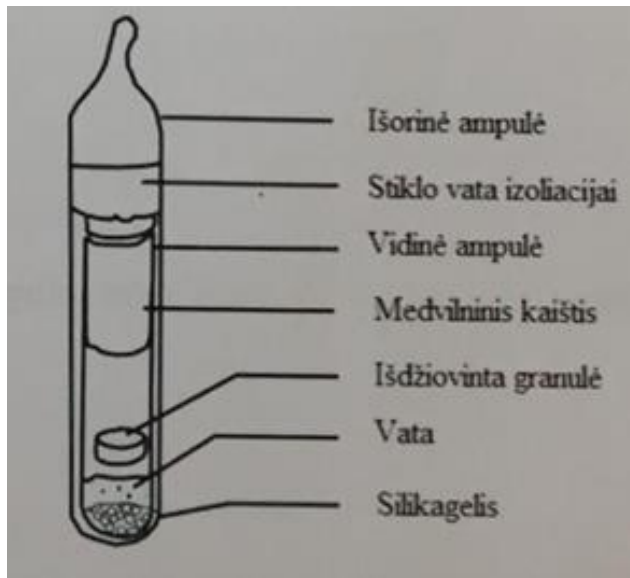
Natrio karbonatas	Na ₂ CO ₃	LABOCHEMA, Lietuva
Antrono reagentas	C ₁₄ H ₁₀ O	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
DPPH reagentas	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Etanolis	C ₂ H ₆ OH	AB MV Group Production
Fruktozė	C ₆ H ₁₂ O ₆	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Maltozė	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Ksilozė	C ₅ H ₁₀ O ₅	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Manitolis	C ₆ H ₁₄ O ₆	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Urėja (karbamidas)	CH ₄ N ₂ O	REACHIM, Rusija
Melasa	-	MERIDIAN FOODS, Anglija
Cukranendrių cukrus	-	MERIDIAN FOODS, Anglija
Laktozė	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	DFE PHARMA, Vokietija
Kraskmolas	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	EUROCHEMICALS, Lietuva
4-hidroksifenilacto rūgštis	C ₉ H ₈ O ₃	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
3,4 – dihidroksibenzoinė rūgštis	C ₇ H ₆ O ₄	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Peptonas iš sojų	-	LIOFILCHEM, Italija
Peptonas iš kazeino	-	APPLICHEM, Vokietija
Kokosų palmių žiedų cukrus	-	MERIDIAN FOODS, Anglija

2.3. Alginato gamyba

2.3.1. Naudotos bakterijos

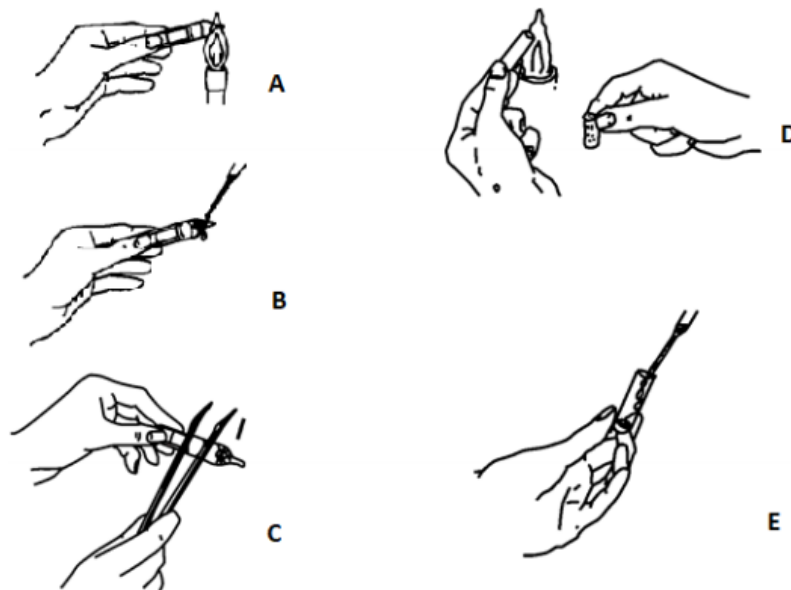
Tyrimams naudotos bakterijos *Azotobacter vinelandii* DSM 2289 iš biologinių resursų centro DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). *A. vinelandii* kultūra gauta granulės pavidalo dehidratuotoje, išdžiovintoje formoje. Granulė laikyta izoliuota nuo aplinkos, patalpinta sterilioje stiklo ampulėje beorėje erdvėje (žr. 2.1 pav.).

Siekiant atgaivinti mikroorganizmus, reikia ištirpinti granulę 0,5 ml specialios mitybinės terpės. Granulės rehidratacija įvyksta per 30 minučių. Tuomet visas ampulės turinys yra perkeliamas į mėgintuvėlį su 5 ml specialios terpės. *Azotobacter vinelandii* bakterijų atveju – į mėgintuvėlį su NRP terpe.



2.1 pav. Ampulė su išdžiovinta bakterijų kultūra

Siekiant atgaivinti bakterijų kultūrą reikia tinkamai atidaryti apsauginę ampulę (žr. 2.2 pav.). Išorinis ampulės antgalis pakaitinamas liepsnoje. Tam, kad suskiltų stiklas reikia ant ampulės užlašinti kelis lašus vandens. Stiklinei ampulės viršūnei nuskelti naudojamas pincetas. Iš ampulės atsargiai pašalinama izoliuojanti medžiaga ir išimama vidinė ampulė. Apsauginis kamštis laikomas steriliai, kol vidinės ampulės viršūnė buvo kaitinama virš liepsnos. Galiausiai į ampulę įlašinama 0,5 ml specialios terpės kultūrai atgaivinti.



2.2 pav. Apsauginės ampulės atidarymo metodas

Bakterijos *Azotobacter vinelandii* buvo naudojamos kaip alginato šaltinis. Šios bakterijos geba gaminti alginatą jų fermentacijos metu. Atgaivintos bakterijos buvo pasodintos Petri lėkštelėse, ant NRP terpės (žr. 2.2 lentelė) su agaru. Bakterijų inkubacija buvo vykdoma 1 dieną 28 °C temperatūroje [37].

2.3.2. Naudotos mitybinės terpės

NRP terpė (žr. 2.2 lentelė) buvo naudota *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimui. Bakterijų kolonija, paimta iš Petri lėkštelės, kurioje bakterijos užaugintos ant NRP terpės su agaru, buvo perkelta į skystą NRP terpę. Šios terpės sudėtyje yra du anglies šaltiniai – gliukozė ir sacharozė. Azoto šaltiniu buvo naudojamas bakteriologinis peptonas. Taip pat į šios terpės sudėtį įeina NH_4NO_3 , makroelementai – K_2HPO_4 , CaCl_2 ir mikroelementas – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

2.2 lentelė. NRP terpės sudėtis [37]

Mitybinės terpės komponentai	Koncentracija (g/L)
Gliukozė	20
Sacharozė	20
Bakteriologinis peptonas	2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
NH_4NO_3	1,5
K_2HPO_4	1,2
CaCl_2	0,03
pH=7,2	

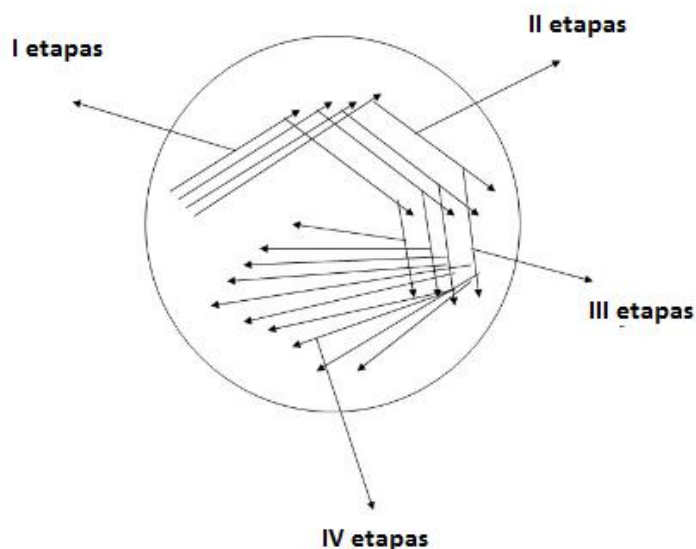
Produkcijos terpė (žr. 2.3 lentelė) buvo naudota kaip terpė, kurioje, vykstant bakterijų fermentacijai, buvo gaminamas alginatas. Šioje terpėje buvo vykdomas alginato išskyrimas. Produkcijos terpėje naudotas vienas anglies šaltinis – pagal nurodymus gliukozė. Taip pat į terpės sudėtį įeina azoto šaltinis – mielių ekstraktas, makroelementas – Na_2HPO_4 , mikroelementas – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ir mineralas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2.3 lentelė. Produkcijos terpės sudėtis [37]

Mitybinės terpės komponentai	Koncentracija (g/L)
Gliukozė	20
Mielių ekstraktas	6
Na_2HPO_4	2
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,6
pH=7,2	

2.3.3. *Azotobacter vinelandii* bakterijų sėjimas paviršiniu būdu Petri lėkštelėse

- Petri lėkštelės užpilamos mitybine NRP terpe su agaru ~2 mm sluoksniu. Terpei leidžiama sustingti.
- 50 μl *Azotobacter vinelandii* bakterijų suspensijos yra užlašinama ant NRP terpės su agaru Petri lėkštelėje.
- Bakterijų suspensija yra išskirstoma naudojant sterilią kilpele, kaip parodyta 2.3 paveiksle.
- Apverstos lėkštelės sudedamos termostate, kur palaikoma 28 °C temperatūra. Bakterijų augimas vykdomas 2 paras.



2.3 pav. Bakterijų sėjimo Petri lėkštelėse metodas

2.3.4. Bakterijų įnešimas į terpes

- Viena *Azotobacter vinelandii* bakterijų kolonija, naudojant sterilią kilpelę, įnešama į mėgintuvėlį su 5 ml NRP terpės.
- NRP terpė su bakterijomis paliekama maišyklėje 28 °C temperatūroje, 24 valandas, esant 150 aps./min. maišymo greičiui.
- 5 ml bakterijų inokuliuo perkeliama į 250 ml kolbutę, kurioje patalpinta 100 ml bakterijų mitybinės produkcijos terpės.
- Bakterijų inkubavimas vykdomas apie 3 dienas 28 °C temperatūroje, esant 150 aps./min. maišymo greičiui. Bakterijos šios fermentacijos metu produkcijos terpėje gamina alginatą.
- Po fermentacijos iš terpės buvo išskiriamas alginatas ir ląstelių biomasė.

2.3.5. Alginato nusodinimas

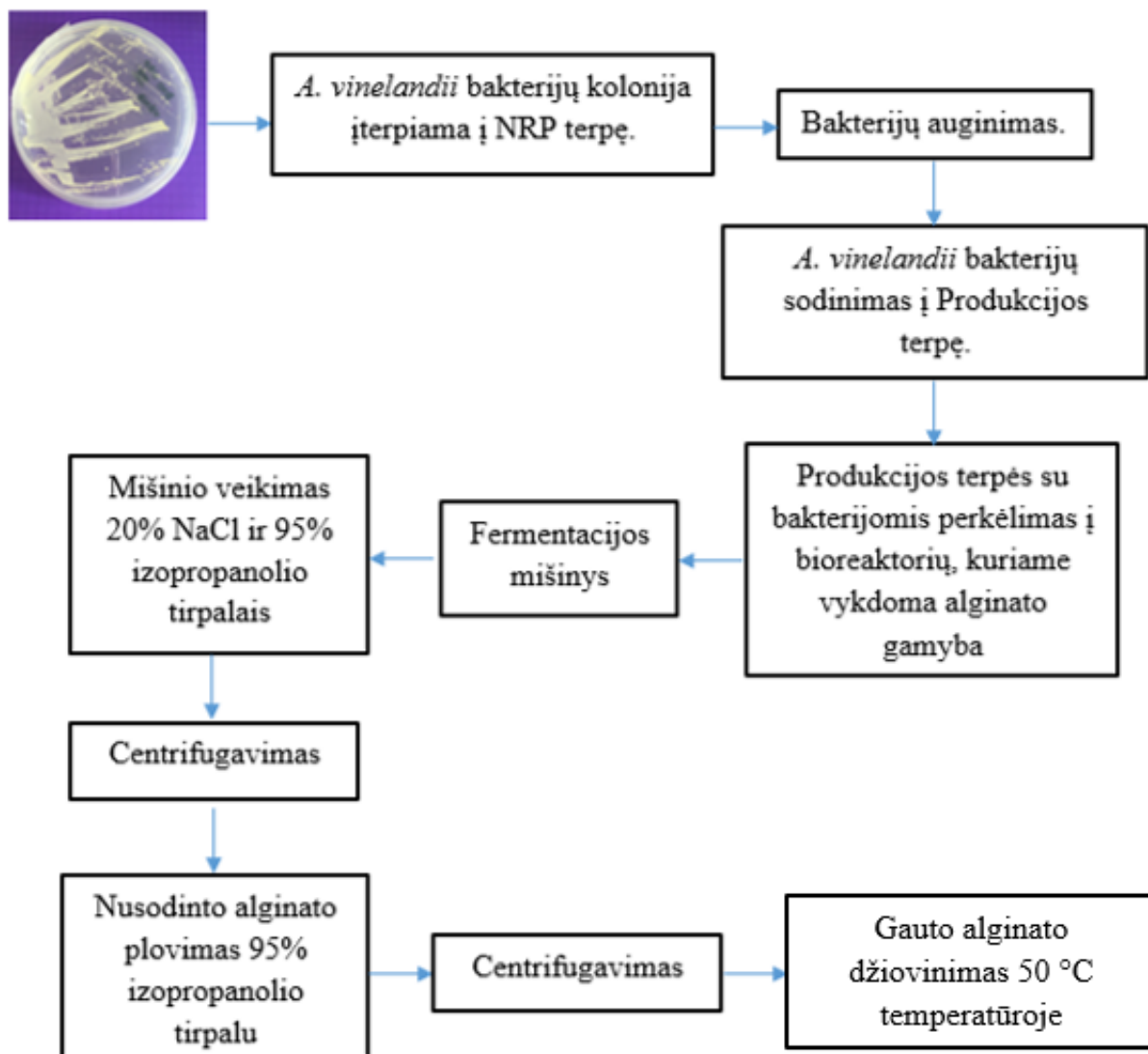
Alginato nusodinimui naudotos medžiagos:

- 20 % NaCl tirpalas;
- 95 % izopropanolis.

Alginato nusodinimo etapai:

- 5 ml produkcijos terpės sumaišoma su 0,25 ml 20 % NaCl tirpalu. Susidaro natrio alginato druska;
- siekiant nusodinti susidariusią druską į terpę taip pat pilama 10 ml 95 % izopropanolio;
- vykdomas centrifugavimas apie 5 minutes 9000 aps./min. greičiu;
- po centrifugavimo nuosėdos surenkamos ir plaunamos 2,5 ml 95 % izopropanoliu;
- centrifuguojama dar 15 minučių;
- gautas alginatas surenkamas ir išdžiovinamas termostate 50 °C temperatūroje;
- išdžiūvęs alginatas susmulkinamas grūstuvėje ir naudojamas tolimesniems tyrimams atlikti.

2.4 paveiksle pavaizduota alginato gamybos schema, leidžianti lengviau suprasti alginato gamybos etapų eiliškumą ir visą gamybos procesą.



2.4 pav. Alginato gamybos schema

2.3.6. Ląstelių biomasės nusodinimas

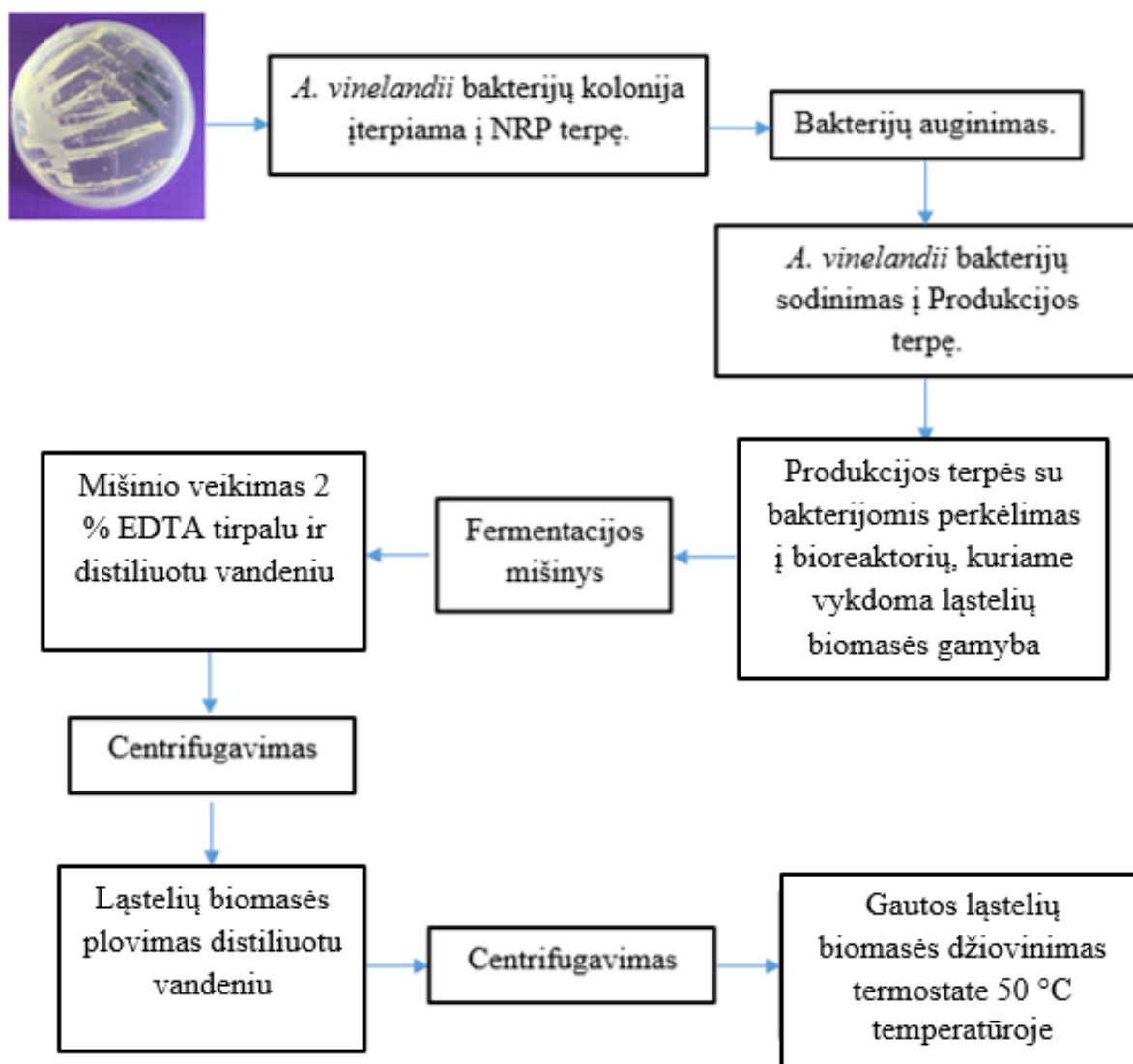
Ląstelių biomasės nusodinimui naudotos medžiagos:

- EDTA dinatrio druska;
- distiliuotas vanduo.

Ląstelių biomasės nusodinimo etapai:

- 5 ml produkcijos terpės sumaišoma su 1,5 ml 20 % EDTA tirpalu ir 25 ml distiliuoto vandens;
- 30 minučių vykdomas centrifugavimas 9000 aps./min. greičiu;
- surenkamos susidariusios nuosėdos, kurios dar kartą plaunamos 30 ml distiliuoto vandens;
- po centrifugavimo vanduo nupilamas ir ląstelių biomasė išdžiovinama termostate 50 °C temperatūroje.

Ląstelių biomasės gamybos ir nusodinimo etapai pateikti 2.5 paveiksle.

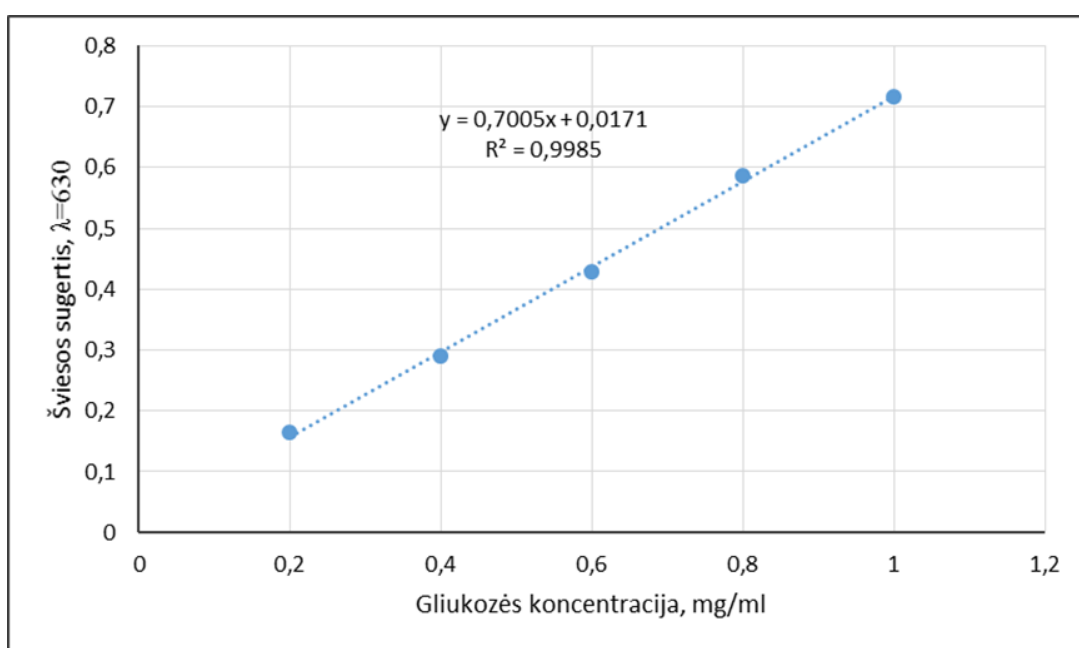


2.5 pav. Ląstelių biomasės gamybos schema

2.4. Angliavandenių kiekio nustatymas

Angliavandenių nustatymui gautame alginatė yra naudojamas antrono reagento tirpalas. Jis paruošiamas 0,04 g antrono reagento ištirpinus 20 ml 95 % sieros rūgšties.

Siekiant nustatyti angliavandenių kiekį alginatė yra reikalinga standartinė gliukozės kalibravimo kreivė. Ji gaunama paruošiant standartinę gliukozės tirpalą, kur 100 mg gliukozės ištirpinama 100 ml distiliuoto vandens. Darbinis gliukozės tirpalas buvo gautas paėmus 10 ml standartinio gliukozės tirpalo ir praskiedus jį iki 100 ml distiliuotu vandeniu. Standartinei kalibracinei kreivei paruošti buvo naudojami 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ir 1 ml darbinio gliukozės tirpalo kiekiai. Visi mėginiai buvo užpildyti iki 1 ml tūrio distiliuotu vandeniu. Kontroliniu palyginamuoju tirpalu buvo naudotas 1 ml distiliuoto vandens. Į mėginius buvo įpilta 4 ml antrono reagento tirpalo ir kaitinama 8 minutes verdančio vandens vonelėje. Atvėsinus mėginius buvo išmatuota jų sugertis 630 nm bangos ilgyje ir pagal gautus rezultatus sudaryta kalibracinė kreivė (žr. 2.6 pav).



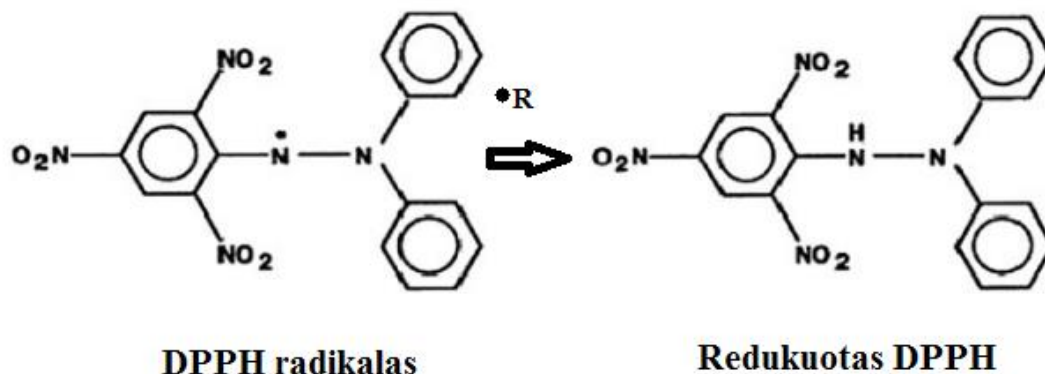
2.6 pav. Kalibracinė gliukozės kreivė

Atliekant angliavandenių kiekio tyrimą pirmiausia buvo atlikta alginato hidrolizė. 25 mg išgauto alginato buvo hidrolizuojami 0,625 ml 2,5 N HCl tirpale apie 3 valandas 2,5 N koncentracijos HCl ruošama iš 12 N koncentracijos rūgšties ją skiedžiant. Baigus hidrolizę tirpalas atvėsinaamas iki kambario temperatūros.

Po hidrolizės atliekamas tirpalo neutralizavimas naudojant Na_2CO_3 . Neutralizacija atliekama kol iš alginato tirpalo nebesiskiria dujos. Po neutralizacijos mėginys yra centrifuguojamas 15 minučių 9000 aps./min. greičiu, užpylus mėginius 12,5 ml distiliuoto vandens. Po centrifugavimo buvo sumaišoma 0,5 ml gauto supernatanto ir 4 ml antrono reagento tirpalo. Šis tirpalas kaitinamas 8 minutes verdančio vandens vonelėje. Atvėsinus mėginį iki kambario temperatūros buvo matuojama šviesos sugertis 630 nm ilgio bangomis. Angliavandenių kiekis gautame alginatė buvo apskaičiuojamas iš standartinės gliukozės kreivės lygties. Lygties nežinomasis x – angliavandenių alginatė koncentracija mg/ml [37].

2.5. Antioksidacinių savybių tyrimas. DPPH metodas

Antioksidantai tai medžiagos, kurios stabdo žalingų oksidacinių reakcijų veikimą. Jos sumažina laisvųjų radikalų poveikį arba visiškai stabdo jų susidarymą [38]. Junginių gebėjimui neutralizuoti laisvuosius radikalus nustatyti dažniausiai naudojamas DPPH laisvųjų radikalų surišimo metodas. Šį metodą atrado mokslininkas Marsden Blois (1958 m.) [39].



2.7 pav. DPPH radikalo redukcijos reakcija

Naudoti tirpalai:

- 1 mg/ml gauto alginato tirpalas vandenyje;
- 1 mM DPPH tirpalas etanolyje;
- 96 % etanolio tirpalas.

Antioksidacinių savybių tyrimui atlikti yra reikalingas DPPH tirpalas. Šis tirpalas paruošiamas etanolyje ištirpinant stabilius violetinės spalvos miltelius – organinį azoto radikalą 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilą. Tuomet 1 ml DPPH tirpalo įpilamas į 1 ml alginato tirpalo, kurio koncentracija 1 mg/ml. Mišinys paliekamas tamsoje 30 minučių. Antioksidaciniu poveikiu pasižymintys junginiai redukuoja DPPH reagentą iki gelsvos spalvos hidrolizato.

Palyginamasis tirpalas paruošiamas sumaišius 1 ml DPPH tirpalo su 1 ml 96 % etanolio. Absorbancija matuojama 517 nm ilgio bangomis. DPPH radikalo slopinimas apskaičiuojamas iš lygties (1):

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

(1)

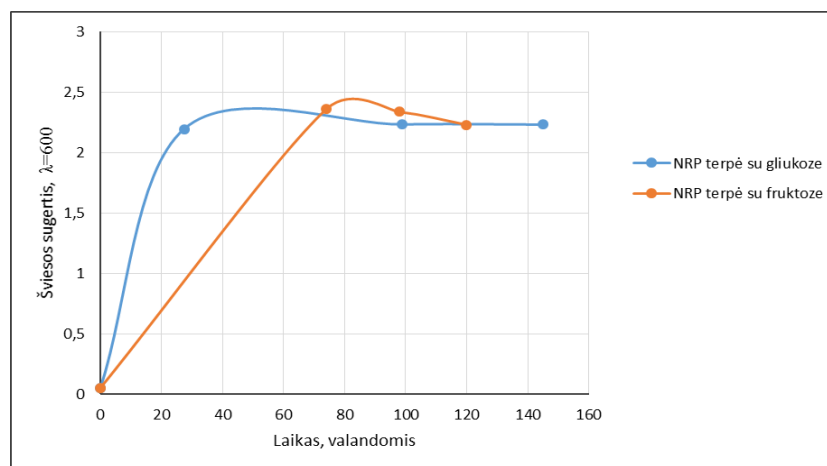
A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis
 A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugertis [37]

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Alginato ir ląstelių biomasės gavimo iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų rezultatai

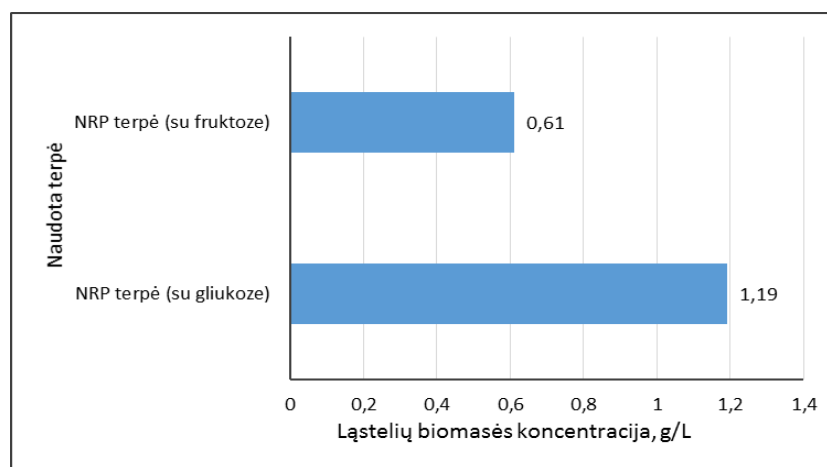
Buvo vykdomas alginato gavimas iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų. Siekiant optimizuoti alginato gamybos išėigą buvo naudotos bakterijų mitybinės terpės – NRP ir produkcijos. Šiose terpėse buvo keičiami maistinių medžiagų – anglies ir azoto šaltiniai bei jų koncentracijos. Taip pat buvo keičiamos ir mikro bei makroelementų koncentracijos.

I variantas. Lyginamos standartinė NRP terpė (žr. 2.2 lentelė) ir NRP terpė, kai vietoje anglies šaltinio gliukozės panaudota fruktozė.

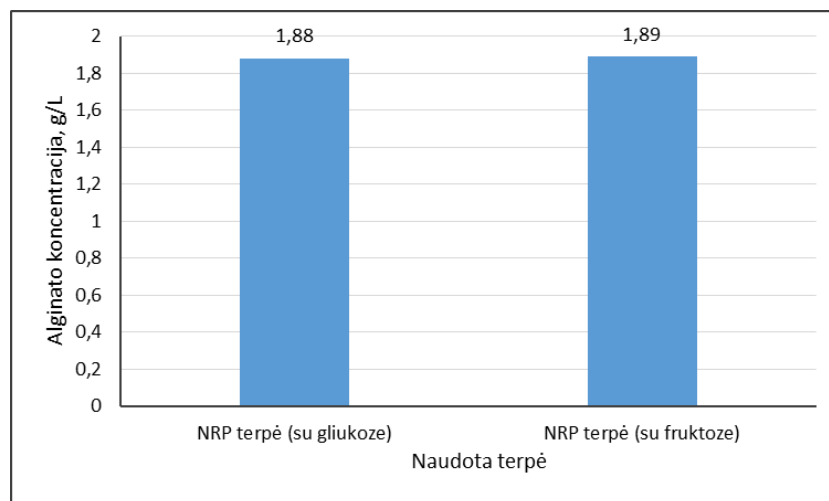


3.1 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko, esant skirtingiems mitybinės NRP terpės anglies šaltiniams

Bakterijų fermentacija vykdoma apie 5 paras. NRP terpės su gliukoze atveju pradinė bakterijų šviesos sugertis buvo 0,049. Šiuo atveju bakterijų augimo periodas vyksta iki 40 proceso valandos, paskui seka stacionari fazė iki 70 valandos. Proceso pabaigoje bakterijų šviesos sugertis kiek sumažėja, dalis bakterijų kolonijų miršta. NRP terpės su fruktoze atveju pradinė bakterijų šviesos sugertis 0,051. Eksponentinio augimo fazė vyksta iki 80 proceso valandos. Po to vyksta bakterijų eksponentinio augimo mažėjimo fazė. Abiem atvejais galutinė bakterijų sugertis yra beveik vienoda ir lygi 2,229 NRP (fruktozė) ir 2,231 NRP (gliukozė).



3.2 pav. Ląstelių biomasės koncentracijos priklausomybė nuo naudotos bakterijų mitybinės NRP terpės anglies šaltinio

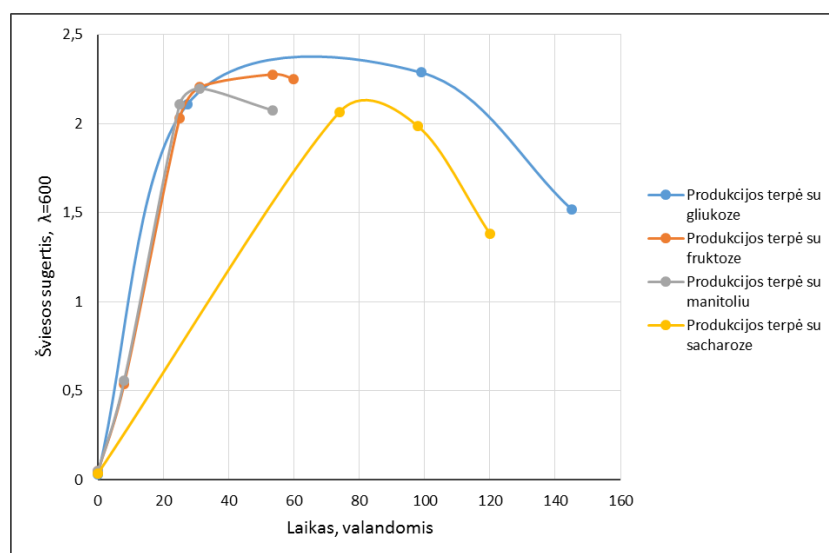


3.3 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo naudotos bakterijų mitybinės NRP terpės anglies šaltinio

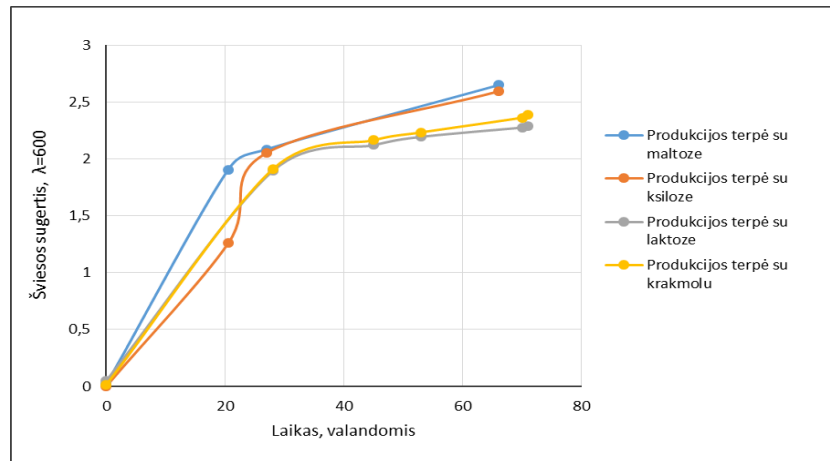
Lyginant standartinę NRP terpę, kurioje anglies šaltiniu naudojama gliukozė ir NRP terpę su fruktoze abiem atvejais buvo gautos beveik vienodos alginato išėigos (žr. 3.3 pav.). Galutinė bakterijų šviesos sugertis taip pat beveik vienoda abiem atvejais, taigi matyti, kad bakterijos alginato gamybą vykdė augimo metu. Lyginant ląstelių biomasės koncentraciją terpėje, matyti, kad NRP terpėje su gliukoze ji buvo gauta beveik dvigubai didesnė nei terpėje su fruktoze (žr. 3.2 pav.).

Tolimesniems tyrimams pasirenkama naudoti *A. vinelandii* mitybinė produkcijos terpė (žr. 2.3 lentelė).

II variantas. Keičiamas standartinės produkcijos terpės anglies šaltinis (gliukozė) į: sacharozę, fruktozę, laktozę, krakmolą, maltozę, ksilozę ir manitolį. Visais atvejais naudojamo anglies šaltinio koncentracija palaikoma 20 g/L. Kiti terpės komponentai atitinka nurodytus 2.3 lentelėje.

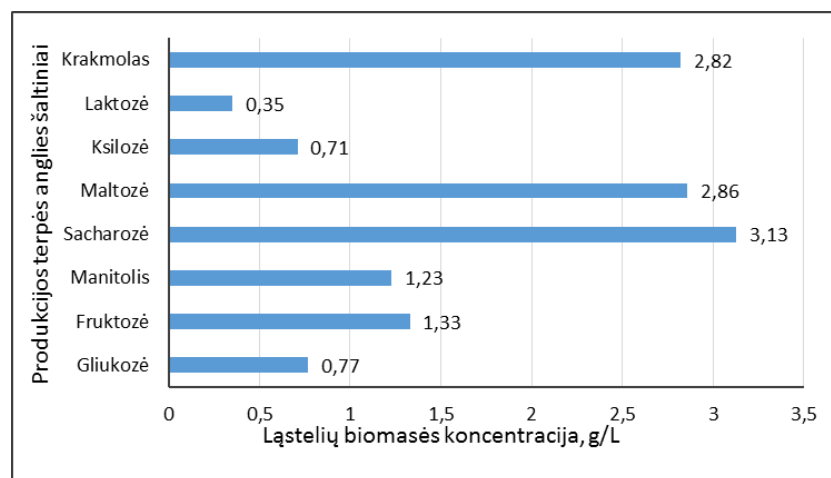


3.4 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko, esant skirtingiems produkcijos terpės anglies šaltiniams

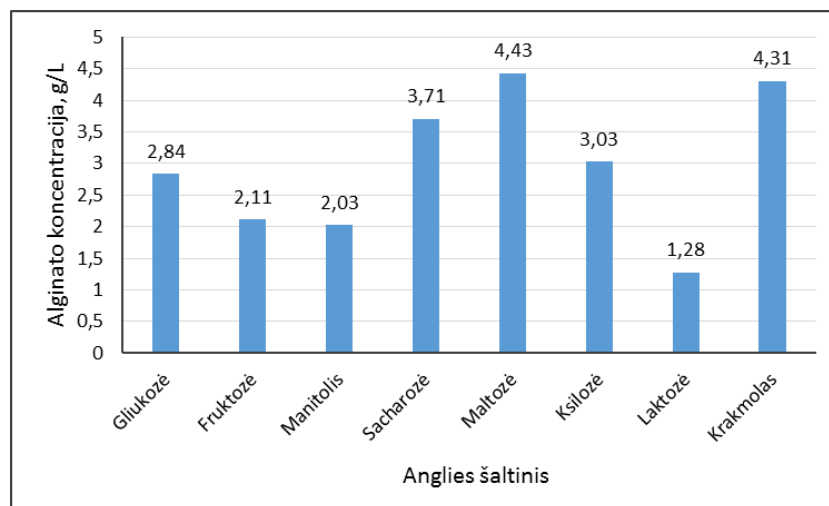


3.5 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko, esant skirtingiems produkcijos terpės anglies šaltiniams

Produkcijos terpėje, kaip anglies šaltinius naudojant manitolį ir fruktozę, buvo stebimas beveik vienodas bakterijų augimas. Pradinės bakterijų šviesos sugertys buvo vienodos – 0,049. Terpėje su manitolium po eksponentinio augimo fazės bakterijų sugertis sumažėjo ir prasidėjo eksponentinio augimo mažėjimo fazė. Atveju su fruktoze bakterijų sugertis dar didėjo iki 55 proceso valandos, o paskui ėmė kristi. Terpėse su fruktoze ir manitolium bakterijų sugertys proceso pabaigoje atitinkamai buvo lygios 2,250 ir 2,074. Atveju, kai anglies šaltiniu naudota gliukozė buvo stebėtas toks bakterijų augimas: iki 40 proceso valandos bakterijos augo greitai, toliau iki 80 valandos sekė stacionari bakterijų fazė, o po to bakterijų kolonijų terpėje pradėjo mažėti. Pradinė bakterijų sugertis šiuo atveju buvo 0,032, o galutinė 1,519. Atveju, kai produkcijos terpėje naudota sacharozė pradinė bakterijų sugertis buvo 0,037. Bakterijos intensyviai augo iki 80 proceso valandos, o paskui šviesos sugertis sparčiai mažėjo ir tapo lygi 1,381. Naudojant anglies šaltinius maltozę, ksilozę, laktozę ir krakmolą buvo stebimas labai panašus bakterijų augimas. Intensyviausiai bakterijos augo 0 – 30 proceso valandų intervale. Toliau iki proceso pabaigos seka stacionari bakterijų augimo fazė. Pradinės bakterijų šviesos sugertys atitinkamai buvo lygios 0,020, 0,003, 0,052 ir 0,017. Šviesos sugertys proceso pabaigoje (atitinkamai): 2,649, 2,594, 2,287, 2,390.



3.6 pav. Ląstelių biomasės koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančio anglies šaltinio

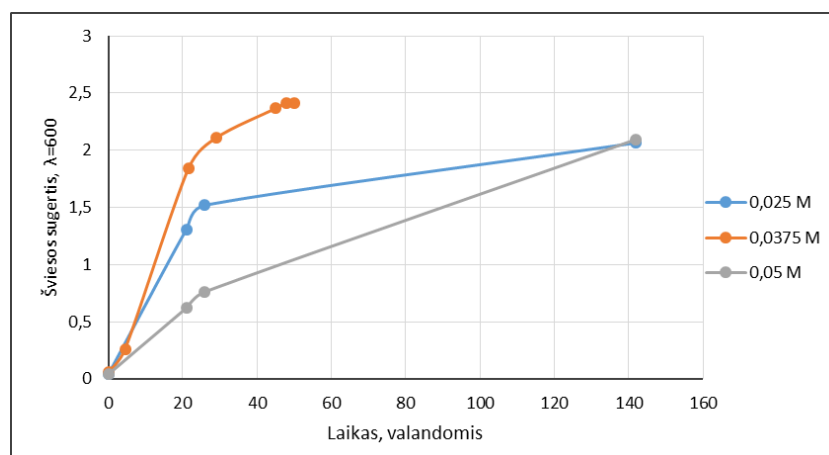


3.7 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančio anglies šaltinio

Atlikus tyrimus ir palyginus skirtingų anglies šaltinių produkcijos terpėje poveikius alginato gamybai buvo nustatyta, kad optimalias sąlygas suteikiantis anglies šaltinis yra maltozė (žr. 3.7 pav.). Didžiausia ląstelių biomasės koncentracija buvo nustatyta, kai produkcijos terpės anglies šaltiniu pasirinkta sacharozė (žr. 3.6 pav.).

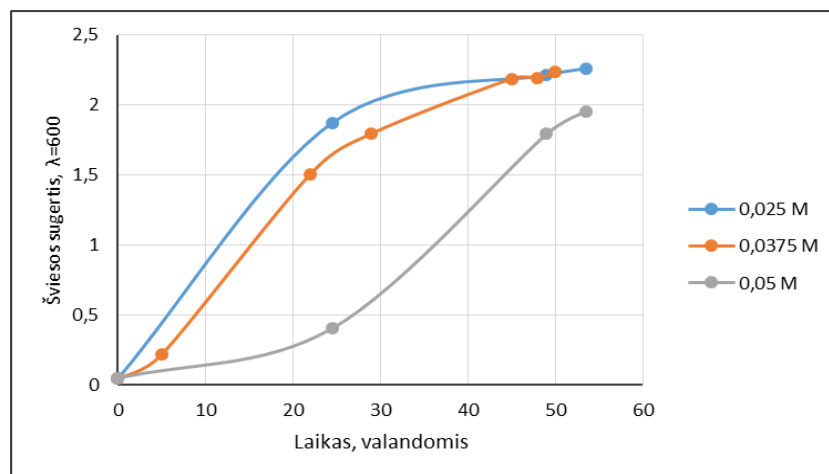
Tyrėjai Kivilcimdanas M. ir kt. taip pat nustatė, kad maltozė yra alginato gamybą optimizuojantis anglies šaltinis. Jų tyrimų metu, naudojant maltozę, buvo pasiekta 2,87 g/L alginato koncentracija. Alginato produkcijos metu didžiausias maltozės sunaudojimas vyko po 24 proceso valandos [25].

III variantas. Naudotos produkcijos terpės, kurių anglies šaltiniu pasirinkta sacharozė (20 g/L). Į šias terpes papildomai įdėta 4-hidroksifenilacto rūgšties arba 3,4-dihidroksibenzoinės rūgšties. Buvo palyginti skirtingų rūgščių koncentracijų poveikiai alginato gamybos procesui.



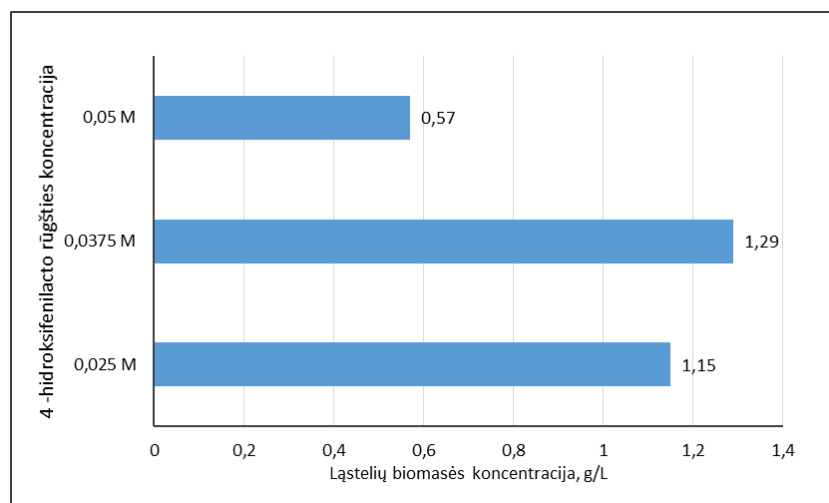
3.8 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo produkcijos terpėje priklausomybė nuo laiko, esant skirtingoms 4-hidroksifenilacto rūgšties koncentracijoms

Bakterijų augimas greičiausiai vyko naudojant 4-hidroksifenilacto rūgštį, kurios koncentracija 0,0375 M. Bakterijų šviesos sugertis vos per 50 valandų nuo 0,059 padidėjo iki 2,414. Kai buvo naudojamos 0,025 M ir 0,05 M koncentracijos rūgštys bakterijų augimas vyko lėčiau ir šviesos sugertis per 6 paras nuo 0,041 padidėjo atitinkamai iki 2,065 ir 2,095.

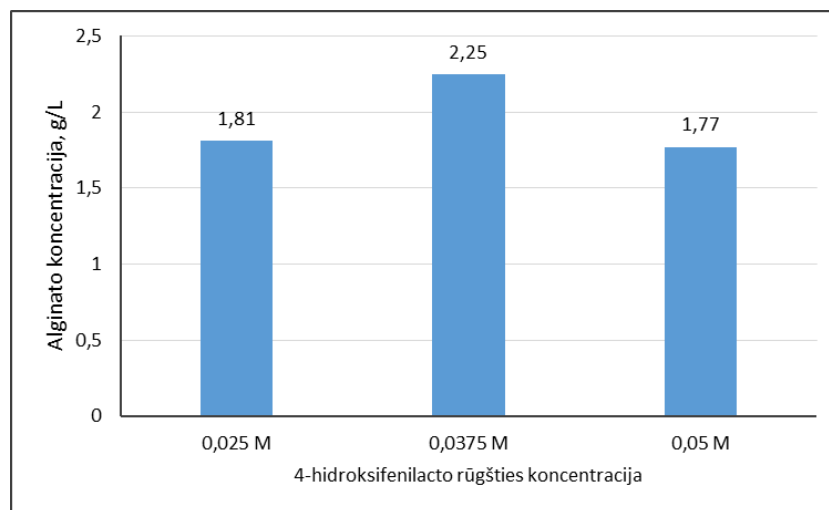


3.9 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo produkcijos terpėje priklausomybė nuo laiko, esant skirtingoms 3,4-dihidroksibenzoinės rūgšties koncentracijoms

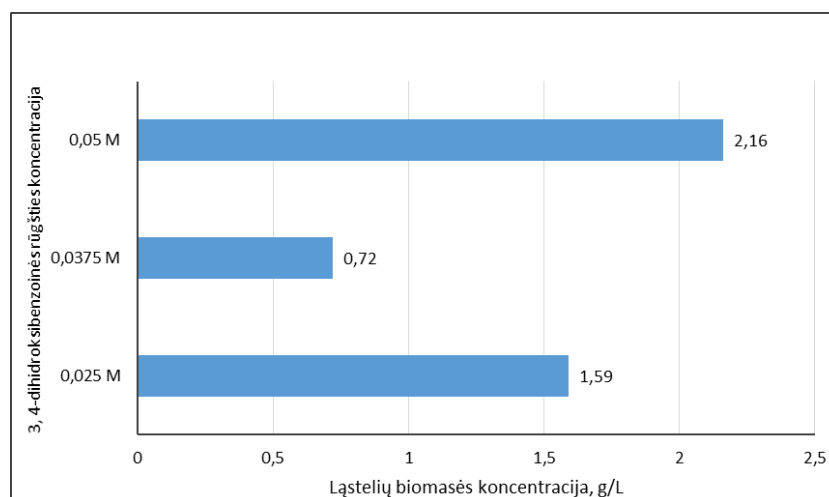
Naudojant 3,4-dihidroksibenzoinę rūgštį, kurios koncentracijos 0,025 M ir 0,0375 M bakterijų augimas vyko labai panašiai. Pradinės bakterijų šviesos sugerties reikšmės lygios 0,045. Eksponentinio bakterijų augimo fazė vyko iki 30 proceso valandos. Toliau iki proceso pabaigos tęsėsi stacionari augimo fazė ir šviesos sugertis padidėjo iki 2,261 ir 2,233 atitinkamai. Naudojant 0,05 M koncentracijos rūgštį iki 25 proceso valandos vyko bakterijų prisitaikymas prie naujos aplinkos. Paskui bakterijų augimas tapo greitesnis ir šviesos sugertis sparčiai didėjo iki 53 proceso valandos. Bakterijų šviesos sugertis šiuo atveju padidėjo nuo 0,048 iki 1,956.



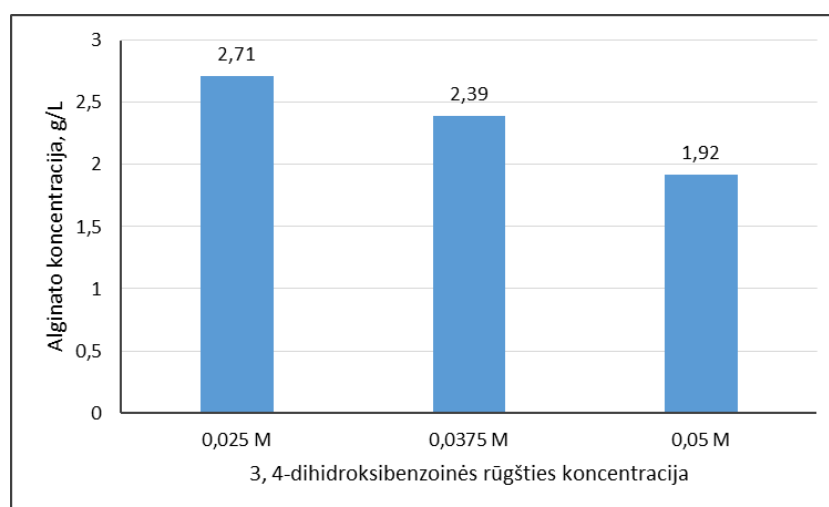
3.10 pav. Ląstelių biomasės koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančios 4-hidroksifenilacto rūgšties koncentracijos



3.11 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančios 4-hidroksifenilacto rūgšties koncentracijos



3.12 pav. Ląstelių biomasės koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančios 3,4-dihidroksibenzoinės rūgšties koncentracijos

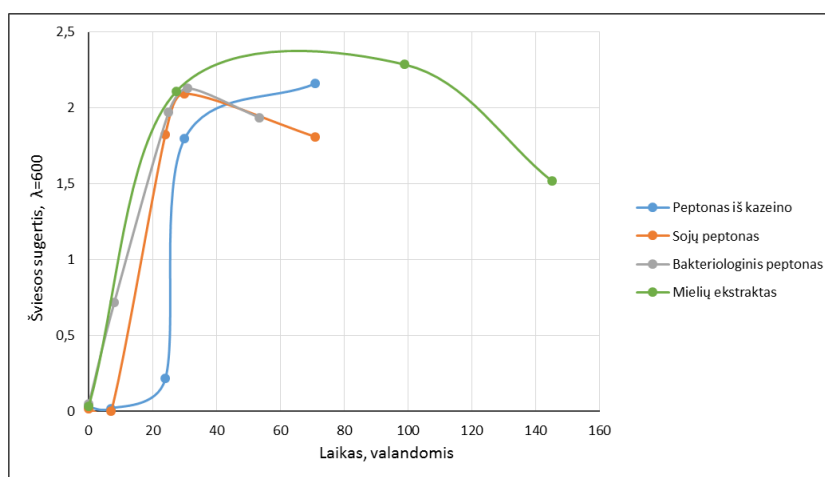


3.13 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų augimo terpėje esančios 3,4-dihidroksibenzoinės rūgšties koncentracijos

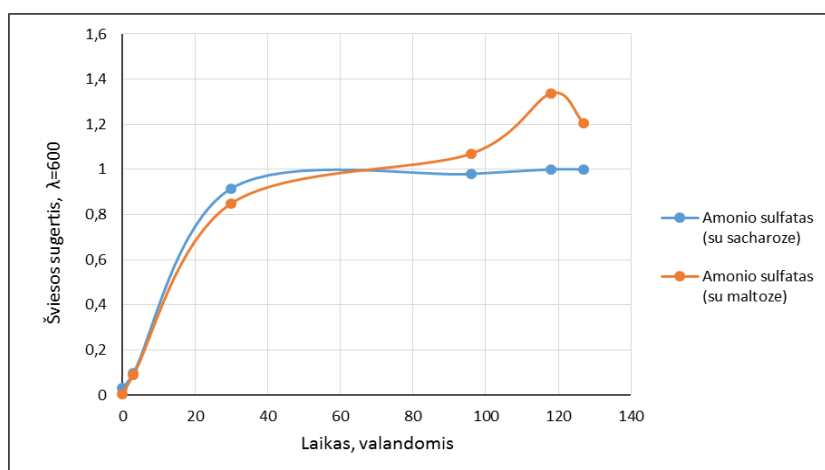
Buvo lyginama dviejų fenolinių rūgščių įtaka alginato gamybos procese. Naudojant 3,4-dihidroksibenzoinę rūgštį pasiekta didesnė alginato išeiga. Didžiausia ląstelių biomasės koncentracija taip pat susidarė naudojant 3,4-dihidroksibenzoinę rūgštį (žr. 3.12 pav.). Tyrimų metu optimaliausia 3,4-dihidroksibenzoinės rūgšties koncentracija alginato gamybai nustatyta 0,025 M (žr. 3.13 pav.).

Tyrimai buvo atlikti remiantis literatūroje pateiktais duomenimis, tačiau gauti rezultatai skiriasi nuo kitų mokslininkų gautų rezultatų. Buvo siekta nustatyti fenolinių rūgščių ir jų koncentracijos įtaką alginato gamybos procese iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų. Lyginant 3,4-dihidroksibenzoinę ir 4-hidroksifenilacto rūgštis, tyrimų metu didesnė alginato ir biomasės išeiga buvo gauta naudojant 4-hidroksifenilacto rūgštį. Didėjant 4-hidroksifenilacto ir 3,4-dihidroksibenzoinės rūgšties koncentracijoms didėjo ir biomasės išeiga. Buvo tirtos šios rūgščių koncentracijos: 10, 25, 50 mmol/L. Visais atvejais didžiausia polisacharido išeiga gauta naudojant 4-hidroksifenilacto rūgštį, o naudojant didžiausią jos koncentraciją (50 mmol/L) gauto alginato išeiga ypač padidėjo [41].

IV variantas. Keičiamas standartinės produkcijos terpės azoto šaltinis. Vietoje mielių ekstrakto naudojami bakteriologinis peptonas (anglies šaltinis gliukozė), sojų peptonas (anglies šaltinis maltozė), peptonas iš kazeino (anglies šaltinis maltozė), amonio sulfatas (anglies šaltinis sacharozė) ir amonio sulfatas (anglies šaltinis maltozė).

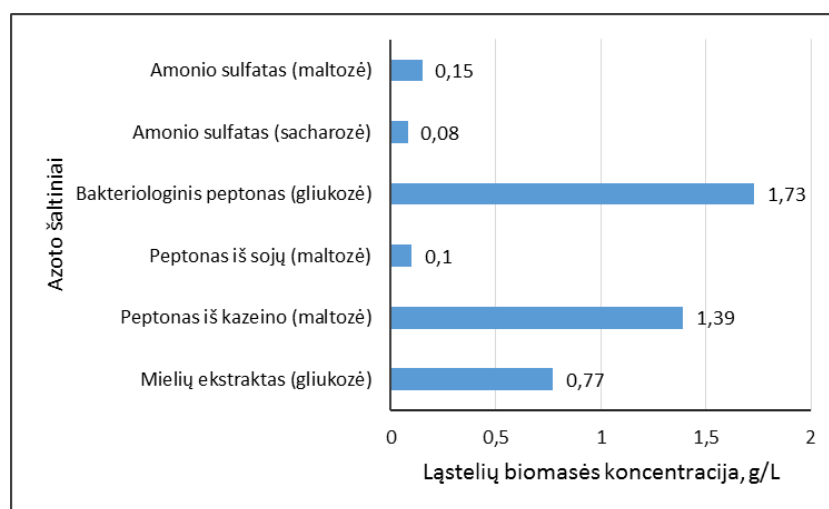


3.14 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko, naudojant produkcijos terpes su skirtingais azoto šaltiniais

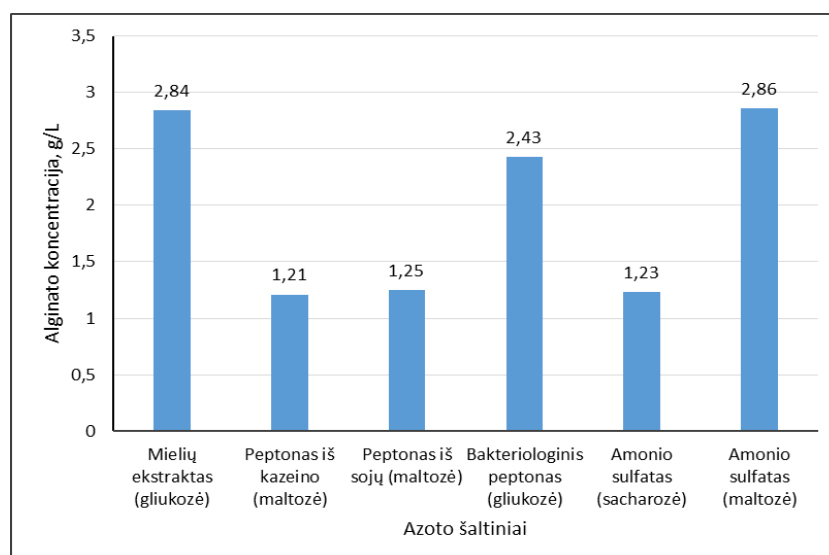


3.15 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko, naudojant produkcijos terpes su skirtingais anglies šaltiniais, kurių azoto šaltinis $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Azotobacter vinelandii bakterijų augimas, kai azoto šaltiniu produkcijos terpėje naudotas mielių ekstraktas, aprašytas II variante (produkcijos terpė su gliukoze). Kaip azoto šaltinius produkcijos terpėje naudojant peptoną iš sojų ir bakteriologinį peptoną bakterijų augimas vyko labai panašiai. Eksponentinio augimo fazė abiem atvejais vyko iki 30 proceso valandos, o toliau bėgant laikui bakterijų kolonijų terpėje ėmė mažėti. Proceso pabaigoje bakterijų šviesos sugertis siekė 1,810 ir 1,937 atitinkamai. Atveju, kai buvo naudojamas peptonas iš kazeino, bakterijų prisitaikymas prie terpės vyko iki 20 proceso valandos. Iki 30 valandos bakterijų kolonijos augo ypač greitai, o po stacionarios augimo fazės proceso pabaigoje jų šviesos sugertis siekė 2,161. Kaip azoto šaltinį produkcijos terpėje naudojant amonio sulfatą, o anglies šaltiniais sacharozę arba maltozę, bakterijų augimas vyko panašiai. Eksponentinio augimo fazė vyko iki 30 proceso valandos. Proceso pabaigoje atveju su maltoze bakterijų šviesos sugertis siekė 1,206, o atveju su sacharozę 1,000.



3.16 pav. Ląstelių biomasės koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančio azoto ir anglies šaltinių



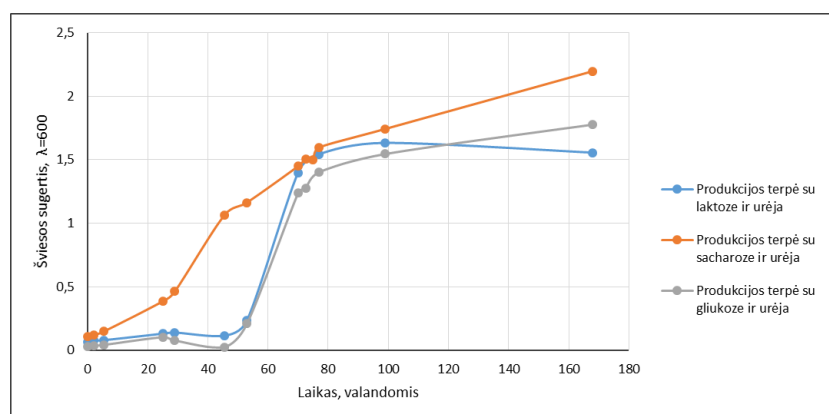
3.17 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančio azoto ir anglies šaltinių

Tyrimų metu buvo palyginti skirtingų azoto šaltinių poveikiai *Azotobacter vinelandii* bakterijų produkcijos terpėje. Didžiausia alginato išėiga pasiekta, kai naudojamas amonio sulfatas (anglies šaltinis maltozė) (žr. 3.17 pav.), tačiau tokį rezultatą galėjo lemti maltozės, kaip anglies šaltinio

terpėje, panaudojimas. Dėl šios priežasties, kaip optimalus azoto šaltinis laikomas mielių ekstraktas (anglies šaltinis gliukozė). Didžiausia ląstelių biomasės koncentracija susidarė terpėje kaip azoto šaltinį naudojant bakteriologinį peptoną, kai anglies šaltiniu naudota gliukozė (žr. 3.16 pav.).

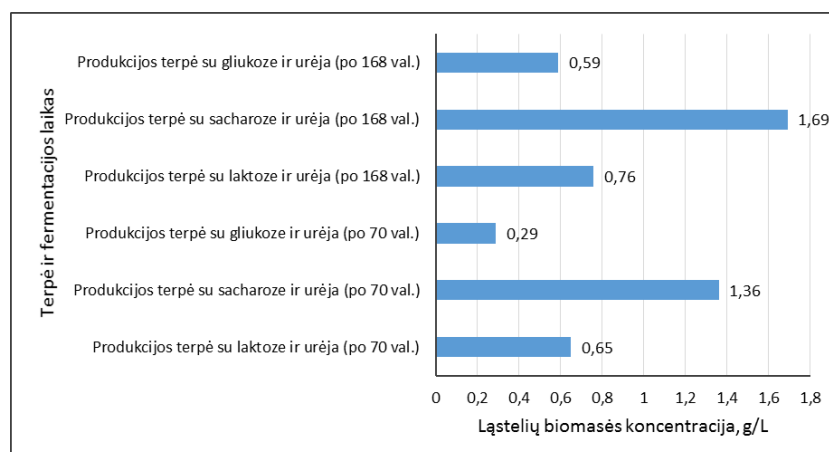
Yra atlikti tyrimai siekiant išsiaiškinti azoto šaltinių įtaką alginato gamybai. Buvo tirta 1-3 % koncentracijos mielių ekstrakto ir kukurūzų ekstrakto įtaka. Ypač geru rezultatu pasižymėjo 2 % kukurūzų ekstraktas. Jį naudojant buvo gauta 7,46 g/L alginato išeiga. Naudojant mielių ekstraktą (2,5 %) buvo gauta 6,55 g/L alginato. Azoto šaltinių įtaka alginato gamybos procese literatūroje yra vertinama prieštaringai [26].

V variantas. Atlikti tyrimai naudojant tris skirtingas produkcijos terpes. Vienos iš jų anglies šaltiniu naudota gliukozė, kitos – laktozė, o trečios sacharozė. Kaip azoto šaltinis visose terpėse naudota urėja.

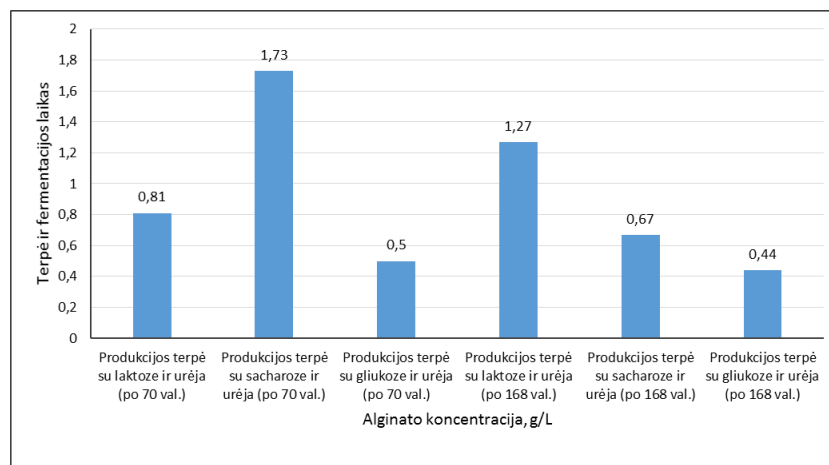


3.18 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko, naudojant produkcijos terpes su skirtingais anglies šaltiniais, kai azoto šaltinis urėja

Bakterijų augimas produkcijos terpėje vyko beveik vienodai, kai anglies šaltiniais buvo naudojama laktozė ir gliukozė. Abiem atvejais vyko bakterijų prisitaikymas prie naujos aplinkos iki 45 proceso valandos. Po to bakterijų augimas tapo intensyvus ir vyko iki 80 valandos. Galiausiai augimas nusistovėjo ir galutinė bakterijų šviesos sugertis buvo lygi 1,556 atveju su laktoze ir 1,777 atveju su gliukoze. Pradinės bakterijų sugertys atitinkamai buvo 0,067 ir 0,028. Kai anglies šaltiniu buvo naudota sacharozė pradinė bakterijų sugertis buvo 0,107. Šiuo atveju eksponentinis augimas vyko iki 80 proceso valandos. Augimo procesui nusistovėjus galutinė šviesos sugertis buvo pasiekta 2,198.



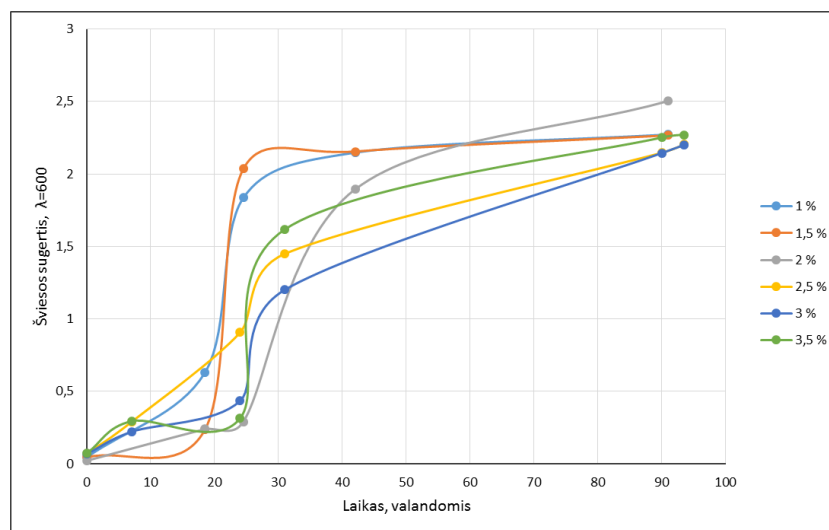
3.19 pav. Ląstelių biomasės koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančių anglies ir azoto šaltinių, bei fermentacijos laiko



3.20 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančių anglies ir azoto šaltinių, bei fermentacijos laiko

Atlikti tyrimai azoto šaltiniu naudojant urėją. Tyrimų metu alginato gavimo optimizuoti nepavyko, nes gauta produkto išeiga yra mažesnė nei naudojant standartinę produkcijos terpę, kurios azoto šaltinis mielių ekstraktas. Šiuo atveju geriausia alginato išeiga buvo gauta vykdant fermentaciją 70 valandų ir naudojant urėją kartu su anglies šaltiniu sacharozė (žr. 3.20 pav.). Didžiausia ląstelių biomasės koncentracija taip pat pasiekta naudojant sacharozę su urėja, vykdant fermentaciją 168 valandas (žr. 3.19 pav.).

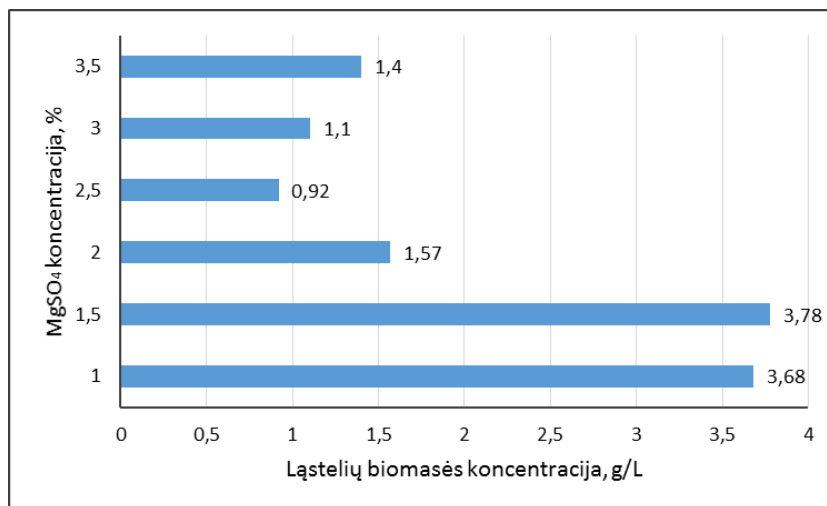
VI variantas. Bandymų metu siekta rasti optimalią $MgSO_4$ koncentraciją produkcijos terpėje. Buvo tirtos šios druskos koncentracijos: 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 % ir 3,5 %. Terpės anglies šaltiniu pasirinkta maltozė (20 g/L).



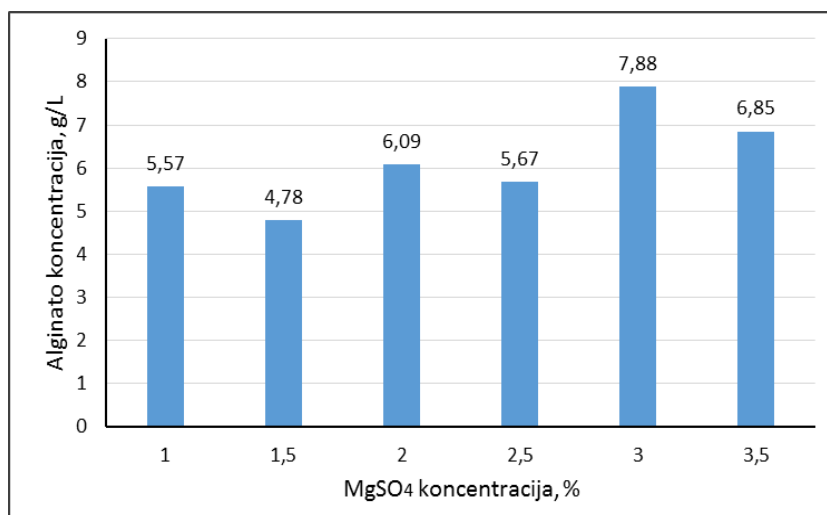
3.21 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko, naudojant produkcijos terpes su skirtinga $MgSO_4$ koncentracija

Naudojant skirtingas $MgSO_4$ koncentracijas bakterijų augimas produkcijos terpėje vyko beveik vienodai. Atvejais, kai koncentracija buvo lygi 2, 3 ir 3,5 %, buvo stebima bakterijų prisitaikymo prie terpės stadija iki~ 24 proceso valandos, toliau sekė greitas eksponentinis kolonijų augimas. Kai koncentracija buvo lygi 2,5, 3 ir 3,5 %, ši stadija tęsėsi iki~ 30 proceso valandos. Atvejais, kai koncentracija buvo 1 ir 1,5 % eksponentinio augimo stadija vyko iki 24 valandos. Bakterijų prisitaikymo prie aplinkos fazė, kai druskos koncentracija buvo lygi 1,5 % vyko iki 15 valandos.

Vėliau augimas nusistovėjo. Pradinė bakterijų sugertis abiem atvejais (1, 1,5 %) buvo 0,045, o galinės 2,266. Kai druskos koncentracija 2 % greičiausias bakterijų augimas stebėtas nuo 24 iki 42 valandos. Pradinė bakterijų šviesos sugertis šiuo atveju buvo 0,022, o po 91 valandos siekė 2,266. Esant 2,5 % koncentracijai bakterijos sparčiai augo nuo proceso pradžios iki 31 valandos. Toliau augimas nusistovėjo ir šviesos sugerties reikšmė tapo lygi 2,203. Pradinė šviesos sugerties reikšmė, kai koncentracija lygi 3 % buvo lygi 0,068, o galutinė 2,200. Beveik taip pat augimas vyko ir atveju, kai $MgSO_4$ koncentracija buvo 3,5 %, tačiau galutinė šviesos sugerties reikšmė gauta kiek didesnė – 2,270.



3.22 pav. Ląstelių biomasės koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančio $MgSO_4$ koncentracijos

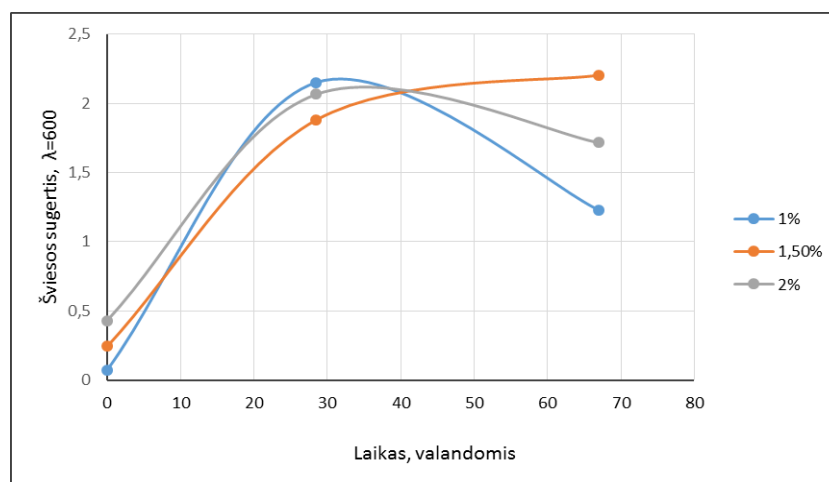


3.23 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančio $MgSO_4$ koncentracijos

Keičiant $MgSO_4$ koncentraciją produkcijos terpėje didžiausia alginato išeiga gauta naudojant 3 % koncentracijos $MgSO_4$ (žr. 3.23 pav.). Didžiausia ląstelių biomasės koncentracija pasiekta naudojant 1,5 % koncentracijos $MgSO_4$ (žr. 3.22 pav.).

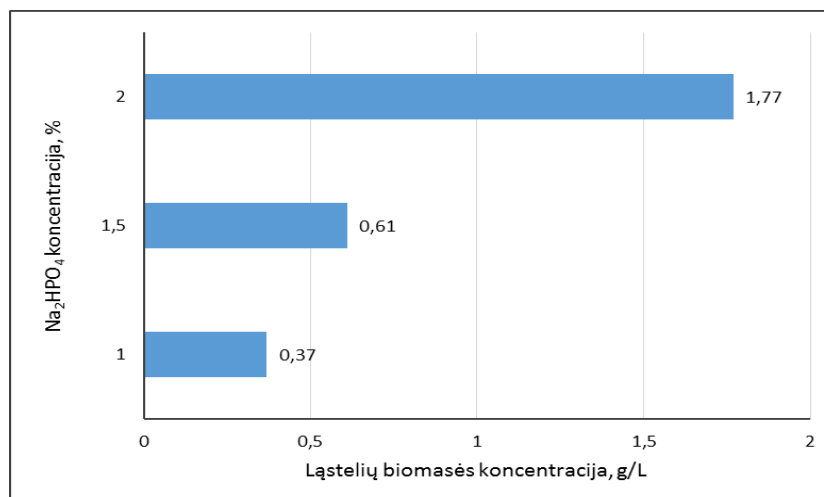
$MgSO_4$ druskos koncentracijos produkcijos terpėje įtaką alginato išeigai tyrė ir Saeedas, S., ir kt. Šių mokslininkų tyrimais nustatyta, kad optimali $MgSO_4$ koncentracija alginato gamybai yra 2%. Alginato išeiga naudojant šią koncentraciją siekė apie 6 g/L [26].

VII variantas. Naudotos produkcijos terpės, su skirtingais Na_2HPO_4 kiekiais. MgSO_4 koncentracija pasirenkama 3 %, o anglies šaltinio maltozės – 20 g/L.

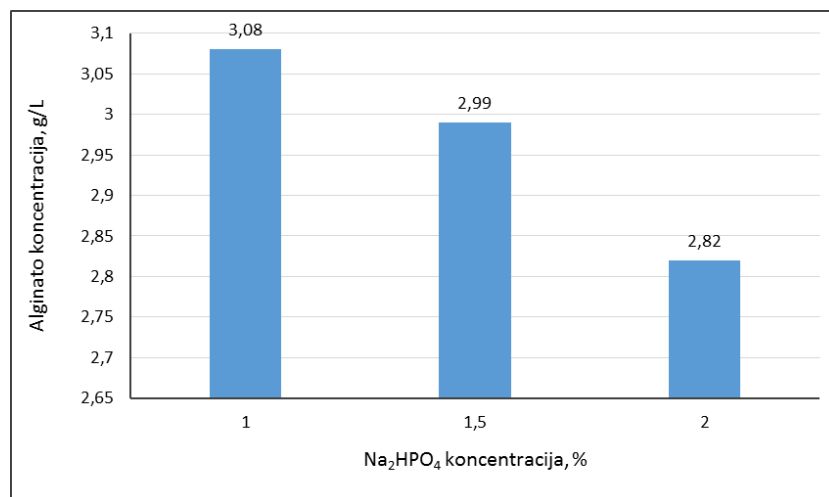


3.24 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko, naudojant produkcijos terpes su skirtinga Na_2HPO_4 koncentracija

Pradinės bakterijų šviesos sugertys produkcijos terpėje buvo: 0,073, 0,243, 0,430, kai Na_2HPO_4 koncentracija atitinkamai lygi 1, 1,5 ir 2 %. Bakterijų augimas visais atvejais vyko labai panašiai. Sparčiausiai bakterijos augo iki 28 proceso valandos. Toliau atvejais, kai druskos koncentracija buvo 1 ir 2 % vyko bakterijų kolonijų mažėjimas ir galutinės koncentracijos atitinkamai tapo lygios 1,229 ir 1,716. Kai druskos koncentracija buvo 1,5 % po eksponentinio bakterijų augimo vyko stacionarus bakterijų augimas ir galutinė šviesos sugertis buvo lygi 2,204.



3.25 pav. Ląstelių biomasės koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančio Na_2HPO_4 koncentracijos

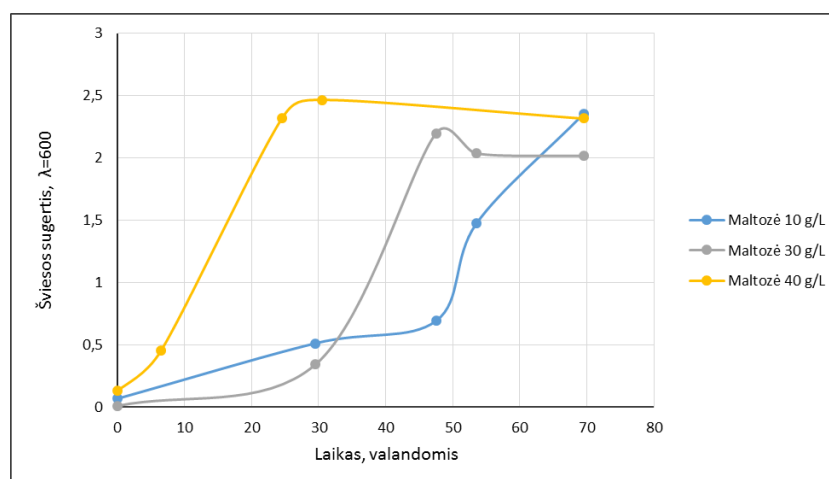


3.26 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančio Na₂HPO₄ koncentracijos

Atlikus bandymą nustatyta, kad optimali alginato išeiga gauta naudojant 1% koncentracijos Na₂HPO₄. Toliau didinant druskos koncentraciją alginato išeiga mažėja (žr. 3.26 pav.). Didžiausia ląstelių biomasės koncentracija pasiekta naudojant 2% Na₂HPO₄ (žr. 3.25 pav.).

Panašūs tyrimų rezultatai buvo gauti ir naudojant KH₂PO₄. Garcia ir kt. nustatė, kad natrio ir kalio jonų koncentracijos didinimas terpėje mažina alginato išeigą. Naudojant 1% koncentracijos KH₂PO₄ buvo pasiekta ~ 4 g/L alginato išeiga. Didinant druskos koncentraciją ji vis mažėjo ir, kai buvo naudojama 2,5 % KH₂PO₄ siekė ~3 g/L [26].

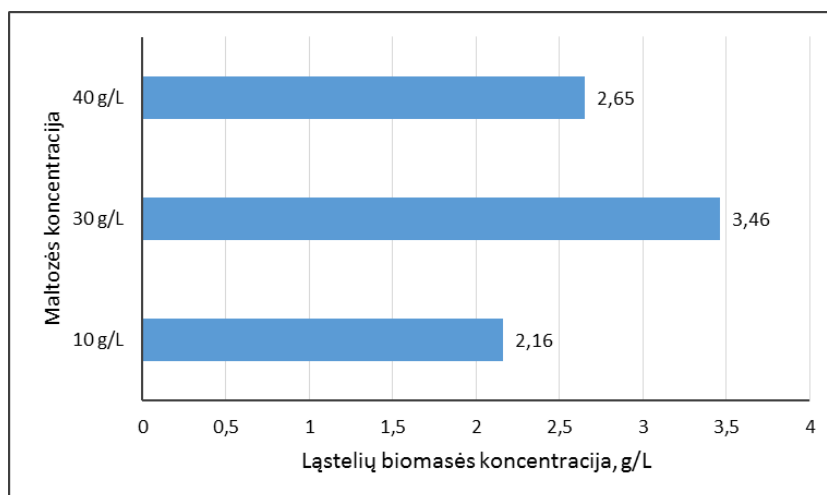
VIII variantas. Bandymo metu buvo keičiamas standartinės produkcijos terpės anglies šaltinis (gliukozė) į maltozę. Lyginamos skirtingos maltozės koncentracijos (10, 30 ir 40 g/L). MgSO₄ koncentracija pasirenkama 3 %.



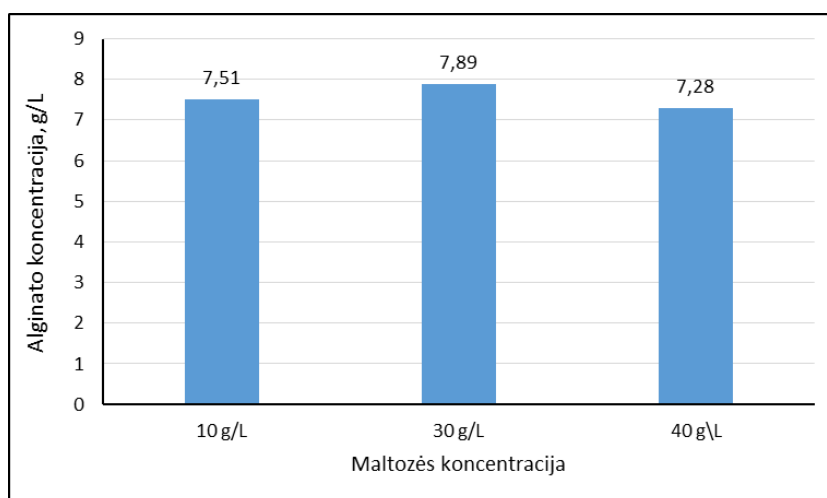
3.27 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko, naudojant produkcijos terpes su skirtinga maltozės koncentracija

Greičiausiai bakterijos produkcijos terpėje augo naudojant maltozę, kurios koncentracija 40 g/L. Bakterijos sparčiai augo iki 30 proceso valandos, paskui augimas sustojo ir kolonijų sumažėjo. Pradinė šviesos sugertis šiuo atveju buvo lygi 0,131, o galutinė 2,316. Beveik vienoda galutinė bakterijų sugertis pasiekta ir naudojant 10 g/L koncentracijos maltozę. Šiuo atveju bakterijų augimas

nebuvo toks greitas ir sparčiausias fiksuotas nuo 47 iki 69 proceso valandos. Pradinė šviesos sugertis šiuo atveju buvo 0,069. Kai buvo naudojama 30 g/L maltozė iki 30 proceso valandos vyko bakterijų prisitaikymas prie aplinkos. Pradinė bakterijų šviesos sugertis šiuo atveju buvo 0,011, o galutinė 2,016.



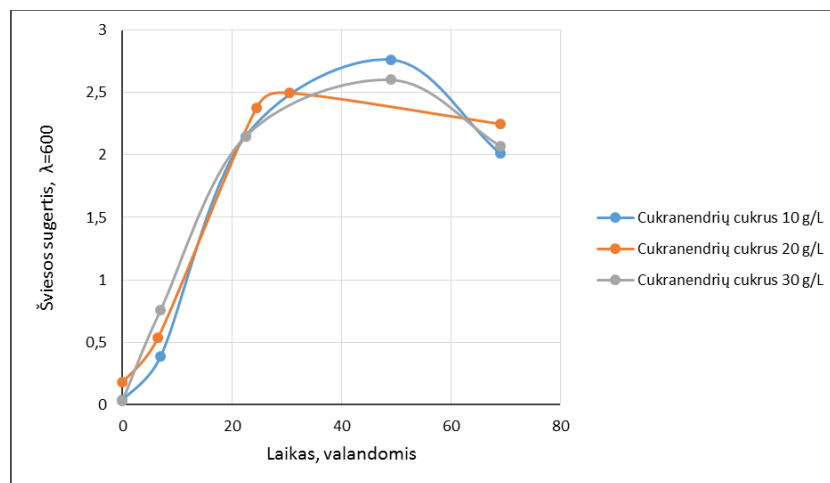
3.28 pav. Ląstelių biomasės koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančios maltozės koncentracijos



3.29 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančios maltozės koncentracijos

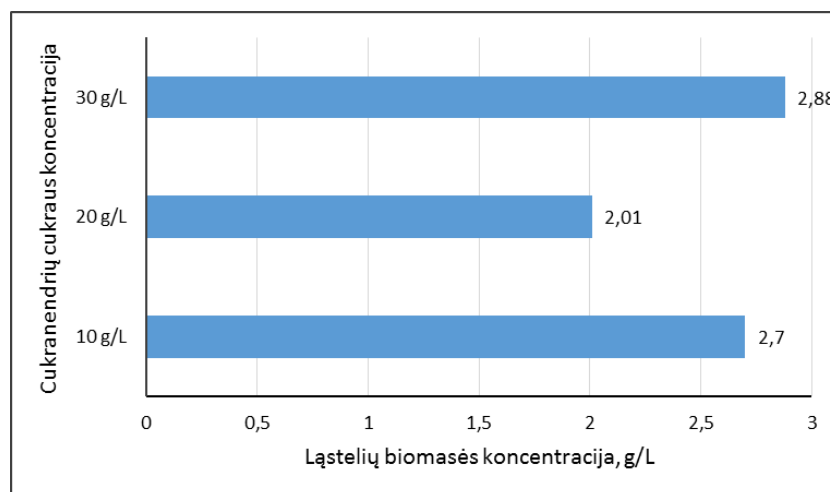
Daugiausiai alginato ir ląstelių biomasės pavyko išskirti naudojant 30 g/L koncentracijos maltozė (žr. 3.28 ir 3.29 pav.). Didėjant maltozės pertekliui alginato išeiga mažėja.

IX variantas. Keičiamas standartinės produkcijos terpės anglies šaltinis (gliukozė) į antrinę žaliavą cukranendrių cukrų. Bandymo metu buvo lyginamos skirtingos šio cukraus koncentracijos (10, 20 ir 30 g/L). $MgSO_4$ koncentracija pasirenkama 3 %.

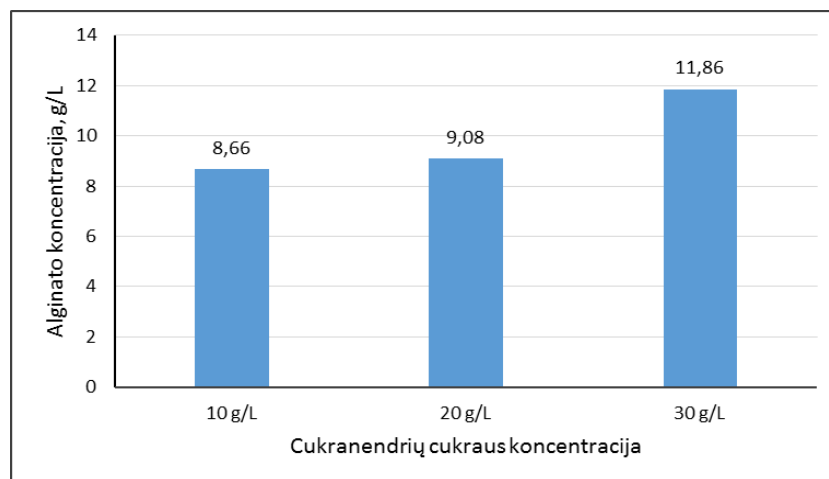


3.30 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko, naudojant produkcijos terpes su skirtinga cukranendrių cukraus koncentracija

Kai buvo naudojama 10 ir 30 g/L cukranendrių cukraus koncentracija bakterijų augimas vyko beveik vienodai. Eksponentinis bakterijų augimas stebėtas iki 49 proceso valandos, o paskui stebėtas šviesos sugerties mažėjimas. Šiais atvejais pradinė bakterijų sugertis buvo 0,038, o galutinė 2,013 (10 g/L) ir 2,074 (30 g/L). Naudojant 20 g/L cukranendrių cukrų spartus bakterijų augimas vyko iki 24 proceso valandos. Toliau šviesos sugertis mažėjo ir proceso pabaigoje tapo lygi 2,250. Pradinė bakterijų sugertis šiuo atveju buvo 0,179.



3.31 pav. Ląstelių biomasės koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančios cukranendrių cukraus koncentracijos

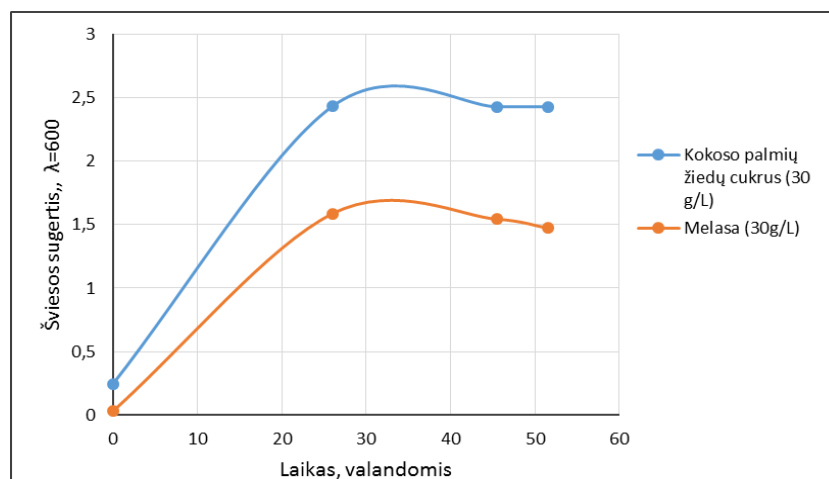


3.32 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančios cukranendrių cukraus koncentracijos

Bandymo metu buvo lyginamos skirtingos cukranendrių cukraus koncentracijos. Didžiausia alginato ir ląstelių biomasės išeiga gauta naudojant 30 g/L koncentracijos cukranendrių cukrų (žr. 3.31 ir 3.32 pav.).

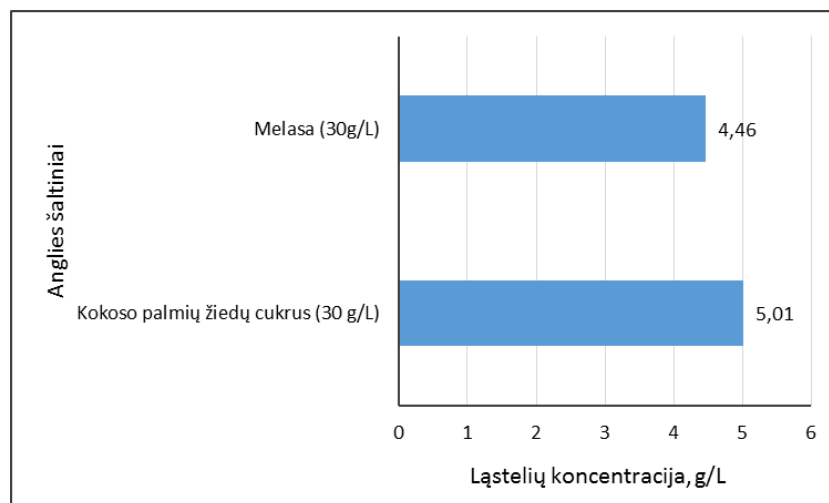
Mokslininkai taip pat tyrė cukranendrių cukraus įtaką alginato gamybai. Naudojant cukranendrių cukrų (20 g/L), kaip anglies šaltinį Burksio (produkcijos) terpėje buvo gauta apie 3,55 g/L alginato ir 6,68 g/L ląstelių biomasės [42]. Cukranendrių cukrus yra pripažintas kaip puiki anglies šaltinio alternatyva alginato gamybos procese.

X variantas. Keičiamas standartinės produkcijos terpės anglies šaltinis (gliukozė) į antrines žaliavas – kokosų palmių žiedų cukrų ir melasą. Bandymo metu pasirinkta cukrų koncentracija 30 g/L. MgSO₄ koncentracija pasirenkama 3 %.

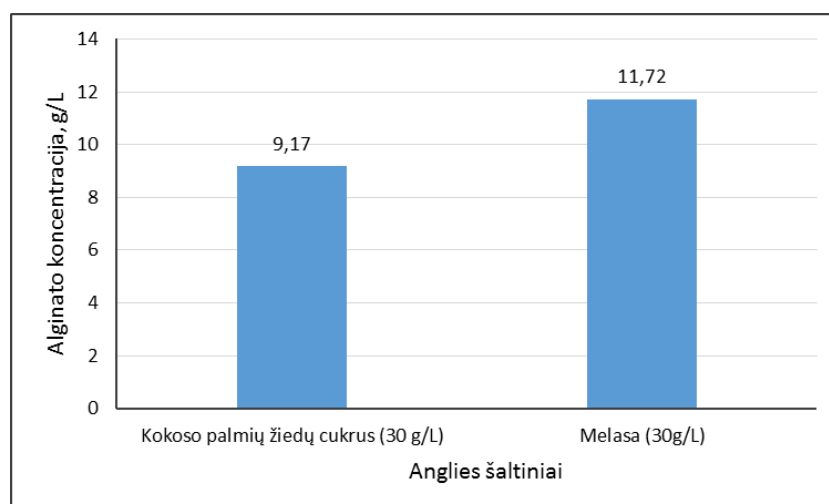


3.33 pav. *Azotobacter vinelandii* bakterijų augimo priklausomybė nuo laiko, naudojant produkcijos terpes su skirtingais anglies šaltiniais

Pradinė bakterijų šviesos sugertis terpėje buvo 0,245, kai naudojamas kokoso palmių žiedų cukrus ir 0,030, kai naudojama melasa. Ekspontinis bakterijų augimas vyko 26 proceso valandas. Toliau buvo stebima stacionari fazė iki ~40 valandos, kol bakterijų kolonijų skaičius terpėje ėmė mažėti. Galutinė bakterijų šviesos sugertis atveju su kokoso palmių žiedų cukrumi lygi 2,429, o atveju su melasa 1,473.



3.34 pav. Ląstelių biomasės koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančio anglies šaltinio



3.35 pav. Alginato koncentracijos priklausomybė nuo bakterijų mitybinėje terpėje esančio anglies šaltinio

Atliekant bandymą buvo keičiamas standartinės produkcijos terpės anglies šaltinis (gliukozė) į antrines žaliavas. Didesnė alginato išėiga gauta naudojant melasą (žr. 3.35 pav.), o didesnė ląstelių biomasės išėiga naudojant kokoso palmių žiedų cukrų (žr. 3.34 pav.).

Kivilcimdanas Moralas ir kt. taip pat kaip tyrimų objektą, alginato gamybos procese, naudojo melasą ir nustatė, kad šis cukrus yra gera alternatyva kaip anglies šaltinis *Azotobacter vinelandii* bakterijų produkcijos terpėje. Alginato sintezė pagerėjo, kai melasa buvo naudojama kaip vienintelis anglies šaltinis terpėje. Alginato išėiga, po 72 valandų inkubacijos buvo lygi 4,67 g/L. Ši išėiga buvo didžiausia lyginant su kitais anglies šaltiniais – maltoze ir krakmolu [25].

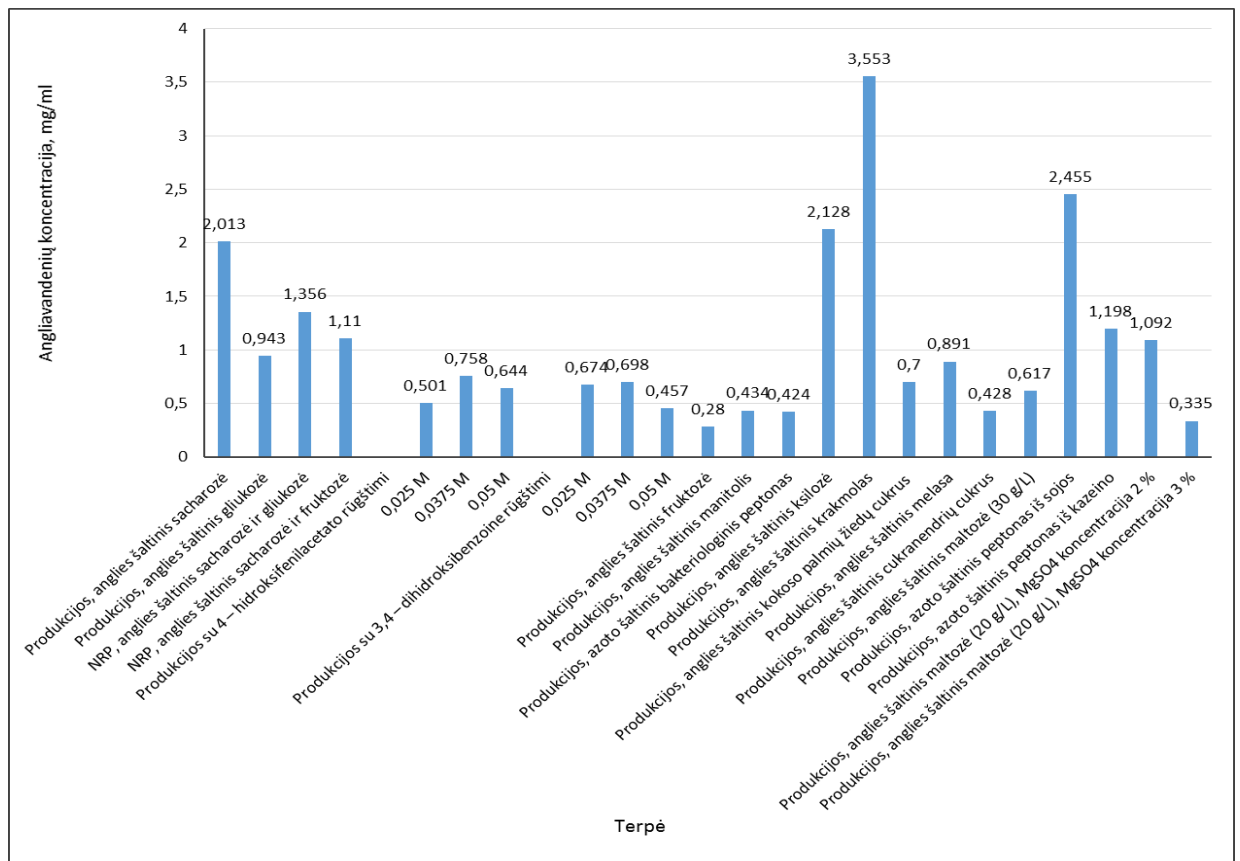
Į melasos sudėtį, kartu su cukrais įeina daug mineralų, vitaminų ir baltymų. Šie komponentai yra labai naudingi *Azotobacter vinelandii* bakterijų fermentacijos metu ir gali lemti didesnę biopolimero alginato išėigą proceso pabaigoje [40].

3.2. Angliavandenių kiekio nustatymas

Angliavandenių kiekiui gautame alginate nustatyti buvo vykdoma jo hidrolizė ir naudojamas antrono reagentas. Šviesos sugertis matuojama 630 nm ilgio bangomis.

3.1 lentelė. Angliavandenių kiekis išskirtame alginate

Terpė	Šviesos sugertis, $\lambda=630$	Angliavandenių koncentracija alginate, mg/ml
Produkcijos, anglies šaltinis sacharozė	1,427	2,013
Produkcijos, anglies šaltinis gliukozė	0,678	0,943
NRP, anglies šaltinis sacharozė ir gliukozė	0,967	1,356
NRP, anglies šaltinis sacharozė ir fruktozė	0,795	1,110
Produkcijos su 4-hidroksifenilacto rūgštimi, kai rūgšties koncentracija lygi:		
0,025 M	0,368	0,501
0,0375 M	0,548	0,758
0,05 M	0,468	0,644
Produkcijos su 3,4-dihidroksibenzoine rūgštimi, kai rūgšties koncentracija lygi:		
0,025 M	0,489	0,674
0,0375 M	0,506	0,698
0,05 M	0,337	0,457
Produkcijos, anglies šaltinis fruktozė	0,314	0,280
Produkcijos, anglies šaltinis manitolis	0,321	0,434
Produkcijos, azoto šaltinis bakteriologinis peptonas	0,213	0,424
Produkcijos, anglies šaltinis ksilozė	1,508	2,128
Produkcijos, anglies šaltinis krakmolai	2,506	3,553
Produkcijos, anglies šaltinis kokoso palmių žiedų cukrus	0,508	0,7
Produkcijos, anglies šaltinis melasa	0,641	0,891
Produkcijos, anglies šaltinis cukranendrių cukrus	0,317	0,428
Produkcijos, anglies šaltinis maltozė (30 g/L)	0,449	0,617
Produkcijos, azoto šaltinis peptonas iš sojos	1,737	2,455
Produkcijos, azoto šaltinis peptonas iš kazeino	0,856	1,198
Produkcijos, anglies šaltinis maltozė (20 g/L), MgSO ₄ koncentracija 2 %	0,782	1,092
Produkcijos, anglies šaltinis maltozė (20 g/L), MgSO ₄ koncentracija 3 %	0,252	0,335



3.36 pav. Angliavandenių koncentracijos gautame alginata priklausomybė nuo naudotos bakterijų mitybinės terpės

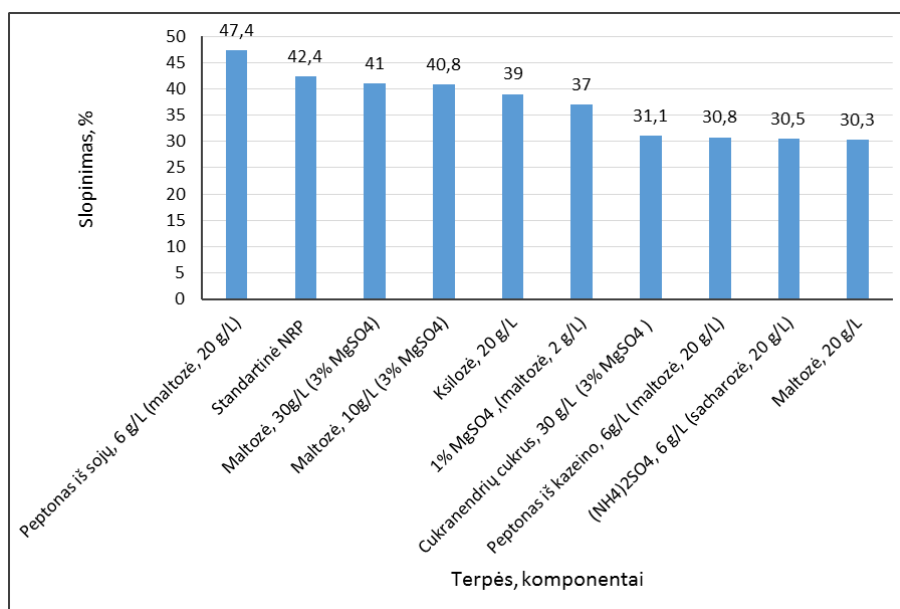
Didžiausiu angliavandenių kiekiu pasižymėjo alginatas, gautas kaip anglies šaltinį produkcijos terpėje naudojant krakmolą. Mažiausiu angliavandenių kiekiu pasižymėjo alginatas išgautas iš produkcijos terpės su fruktoze (žr. 3.36 pav.). Naudojant krakmolą, kaip anglies šaltinį produkcijos terpėje, dėl jo polimerinės struktūros, bakterijoms yra sunkiau pasisavinti angliavandenius alginato gamybai, todėl šiuo atveju gautas alginatas pasižymėjo didžiausia angliavandenių koncentracija. Kuo lengviau bakterijos pasisavina anglies šaltinius, tuo mažesnis angliavandenių kiekis lieka gautame produkte.

3.3. Antioksidacinių savybių tyrimas

3.2 lentelė. Alginato antioksidacinės savybės. Absorbicija matuojama 515 nm

	Bandinio sugertis	Palyginamojo tirpalo sugertis	Slopinimas, %
Standartinė produkcijos terpė	0,462	0,578	20,1
Standartinė NRP terpė	0,333		42,4
NRP terpė, kurios anglies šaltinis fruktozė (20 g/L)	0,519		10,6
Produkcijos terpės			
Anglies šaltinis, koncentracija			
Maltozė, 20 g/L	0,359	0,515	30,3
Ksilozė, 20 g/L	0,314		39,0
Fruktozė, 20 g/L	0,678		0
Sacharozė, 20 g/L	0,387	0,480	24,9
Krakmolas, 20 g/L	0,387		19,4
Laktozė, 20 g/L	0,360	0,385	25,0
Melasa, 30 g/L (3% MgSO ₄)	0,395		0
Kokoso palmių žiedų cukrus, 30 g/L (3% MgSO ₄)	0,335	13	
Azoto šaltinis, koncentracija (produkcijos terpės anglies šaltinis, koncentracija)			
Peptonas iš sojų, 6 g/L (maltozė, 20 g/L)	0,304	0,578	47,4
Peptonas iš kazeino, 6g/L (maltozė, 20 g/L)	0,400		30,8
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 6 g/L (sacharozė, 20 g/L)	0,402		30,5
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 6 g/L (maltozė, 20 g/L)	0,365	0,515	29,1
Bakteriologinis peptonas, 6 g/L (gliukozė, 20 g/L)	0,490		4,9
Urėja, 6 g/L (gliukozė, 20 g/L)	0,386	0,488	20,9
Urėja, 6 g/L (laktozė, 20 g/L)	0,539		0
Urėja, 6 g/L (sacharozė, 20 g/L)	0,494		0
4 – hidroksifenilacetato rūgšties koncentracija (terpės anglies šaltinis sacharozė, 20 g/L)			
0,0375 M	0,491	0,480	0
3,4 – dihidroksibenzoinės rūgšties koncentracija (terpės anglies šaltinis sacharozė, 20 g/L)			
0,025 M	0,582	0,480	0
MgSO ₄ koncentracija (anglies šaltinis maltozė, 2 g/L)			
1 %	0,307	0,488	37,0
1,5 %	0,414		15,2
2 %	0,452		7,4
2,5 %	0,359	0,405	11,4
3 %	0,408		0
3,5 %	0,362		10,6

Na ₂ HPO ₄ koncentracija (anglies šaltinis maltozė 2 g/L, MgSO ₄ koncentracija 3%)			
1%	0,373	0,515	27,6
1,5%	0,425		17,5
2 %	0,361		29,9
Maltozės koncentracija (MgSO ₄ koncentracija 3%)			
10 g/L	0,237	0,400	40,8
30 g/L	0,236		41,0
40 g/L	0,392	0,423	7,4
Cukranendrių cukraus koncentracija (MgSO ₄ koncentracija 3%)			
10 g/L	0,393	0,408	3,7
20 g/L	0,338	0,423	20,1
30 g/L	0,281	0,408	31,1



3.37 pav. DPPH radikalo slopinimo priklausomybė nuo naudotos mitybinės bakterijų *A. vinelandii* terpės ir jos komponentų

Atlikus DPPH radikalo slopinimo tyrimą nustatytos pagaminto alginato antioksidacinės savybės. Geriausiu DPPH radikalo slopinimu ir didžiausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo alginatas, kuriam gauti buvo panaudota produkcijos terpė, kurioje azoto šaltinis peptonas iš sojų, o anglies šaltinis maltozė (žr. 3.37 pav.).

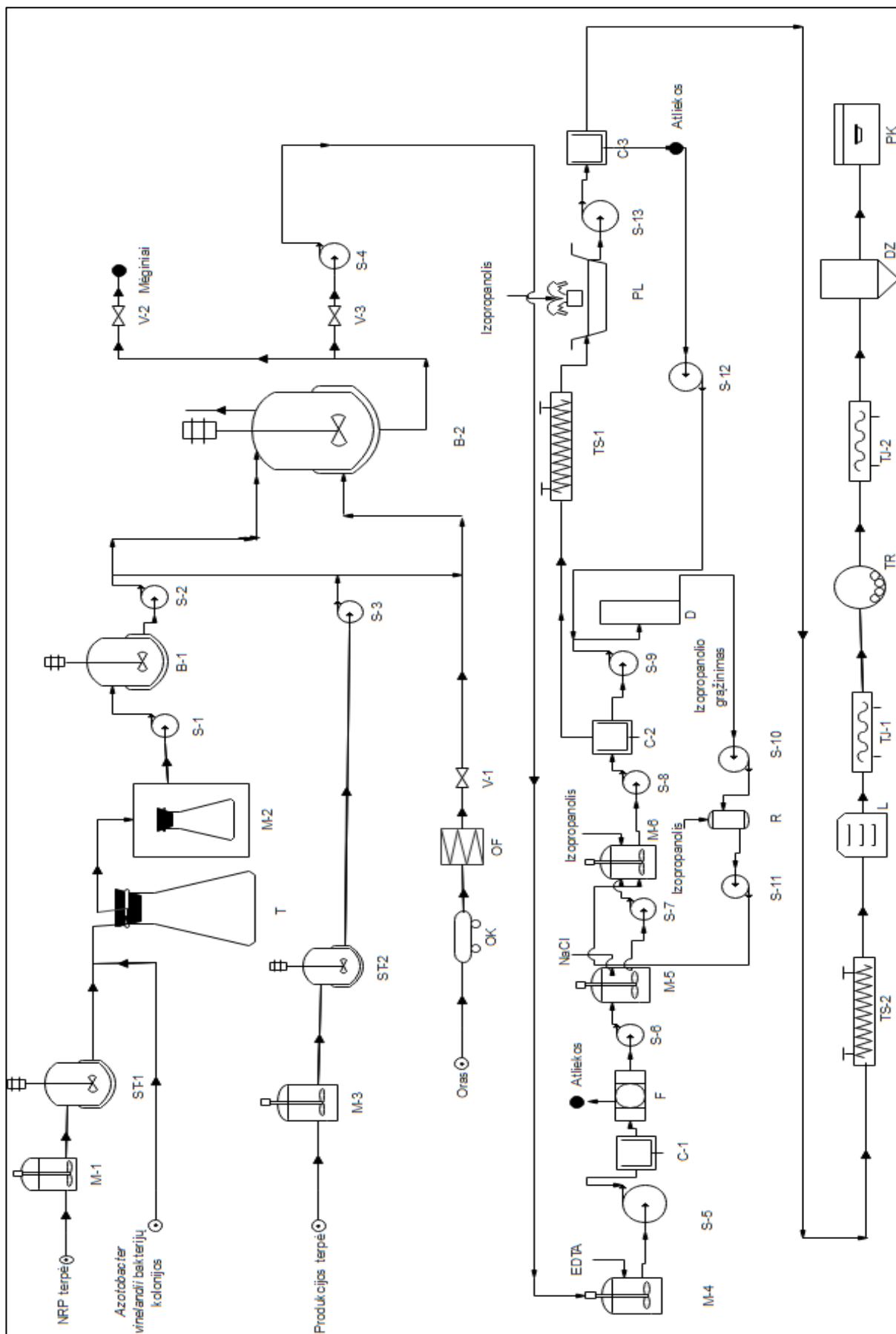
4. Rekomendacijų dalis

Siekiant optimizuoti polisacharido alginato gavimą iš *Azotobacter vinelandii* bakterijų reikia pasirinkti produkcijos terpės mitybinius komponentus, suteikiančius optimalią produkto išėigą. Šio tyrimo metu buvo nustatyta, kad didžiausią alginato išėigą galima pasiekti pakeitus produkcijos terpės anglies, azoto šaltinius, jų koncentracijas ir mikroelemento – MgSO₄ druskos koncentraciją. Atsižvelgiant į gautus tyrimo rezultatus, alginato gavimo procesui rekomenduojamas anglies šaltinis yra maltozė, o azoto šaltinis – mielių ekstraktas. Rekomenduojamos jų koncentracijos atitinkamai yra 30 g/L ir 6 g/L. Rekomenduojama MgSO₄ koncentracija yra 3 %.

Alginato gamybai taip pat galima naudoti antrines žaliavas. Tyrimo metu buvo atliekami eksperimentai su cukranendrių cukrumi, melasa ir kokoso palmių žiedų cukrumi. Naudojant šiuos anglies šaltinius taip pat pavyko optimizuoti alginato gamybos procesą. Geriausiu rezultatu pasižymėjo cukranendrių cukrus. Naudojant antrines žaliavas galima ekonomiškiau vykdyti alginato gamybos procesą. Taip pat antrinių žaliavų naudojimas padaro procesą draugiškesnį aplinkai.

Rekomenduojamoje alginato gamybos schemoje (žr. 4.1 pav.) pateikiami pagrindiniai šio biopolimero gamybos etapai:

1. *Azotobacter vinelandii* bakterijų auginimas NRP terpėje;
2. *Azotobacter vinelandii* bakterijų įterpimas į produkcijos terpę;
3. bakterijų fermentacijos procesas;
4. produkto išskyrimas iš produkcijos terpės;
5. produkto gryninimas (plovimas, džiovinimas, smulkinimas).



4.1 pav. Rekomenduojama alginato gamybos principinė aparatūrinė schema

4.1 lentelė. Aparatūrinės schemos įrenginių žymėjimas

Žymėjimas	Įrenginys
M-1, M-3, M-4, M-5, M-6	Magnetinė maišyklė
ST-1, ST-2	Autoklavas
T	Talpa (kolba)
M-2	Kratyklė
S-1 – S-13	Išcentrinis siurblys
B-1,B-2	Bioreaktorius
OK	Oro kompresorius
OF	Oro filtras
V-1, V-2, V-3	Vožtuvas
C-1, C-2, C-3	Centrifuga
F	Filtras
D	Distiliatorius
R	Rezervuaras
TS-1, TS-2	Sraigtinis transporteris
PL	Plovimo įrenginys
L	Liofilizatorius
TJ-1, TJ-2	Juostinis transporteris
TR	Smulkintuvas
DZ	Dozatorius
PK	Pakavimo įrenginys

Išvados

1. Buvo tiriami skirtingų anglies šaltinių poveikiai produkcijos terpėje alginato gamybos metu. Nustatyta, kad optimalias sąlygas suteikiantis anglies šaltinis yra maltozė, kurios koncentracija 30 g/L. Naudojant maltozę gamybos proceso metu buvo pasiekta didžiausia alginato išeiga – 7,89 g.
2. Buvo palyginti skirtingų azoto šaltinių produkcijos terpėje poveikiai. Nustatyta, kad optimali alginato išeiga pasiekta, kai azoto šaltiniu naudojamas mielių ekstraktas ir lygi 2,84 g.
3. Tyrimų metu buvo keičiama $MgSO_4$ druskos koncentracija (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 %) produkcijos terpėje. Didžiausia alginato išeiga gauta naudojant 3 % koncentracijos $MgSO_4$ ir lygi 7,88 g. Taip pat buvo tiriamas Na_2HPO_4 druskos koncentracijos (1; 2; 3 %) produkcijos terpėje, kurioje anglies šaltinis maltozė 2 g/L, $MgSO_4$ koncentracija 3 %, poveikis. Didžiausia alginato išeiga gauta naudojant 1 % koncentracijos Na_2HPO_4 ir lygi 3,08 g, tačiau ji yra mažesnė, nei standartinės produkcijos terpės atveju, kai Na_2HPO_4 koncentracija lygi 2 g/L. Taigi, šios druskos koncentracijos didinimas proceso metu nepadeda pasiekti didesnės alginato išeigos.
4. Alginato gamybai baterijų mitybinėje produkcijos terpėje, kaip maistinės medžiagos, buvo naudojamos antrinės žaliavos melasa, cukranendrių cukrus ir kokoso palmių žiedų cukrus. Didžiausia alginato išeiga buvo gauta naudojant cukranendrių cukrų, kurio koncentracija 30 g/L ir lygi 11,86 g.
5. Buvo tirtas angliavandenių kiekis gautame alginate. Mažiausiu angliavandenių kiekiu pasižymėjo alginatas, gautas kaip anglies šaltinį produkcijos terpėje naudojant fruktozę (0,280 mg/ml).
6. Gautas alginatas pasižymėjo antioksidaciniu poveikiu. Tyrimų metu nustatyta, kad geriausiai 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalą slopino alginatas, kurio gamybos procese anglies šaltiniu naudota maltozė (20 g/L), o azoto šaltiniu peptonas iš sojų (6 g/L). Antioksidacinis alginato aktyvumas šiuo atveju buvo 47,4 %.
7. Šio tyrimo metu optimalios ir rekomenduojamos alginato gamybos sąlygos buvo gaunamos, kai naudojama bakterijų *Azotobacter vinelandii* produkcijos terpė, kurios sudėtis: maltozė (30 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (0,6 g/L), Na_2HPO_4 (2 g/L), $MgSO_4$ (3 %), mielių ekstraktas (6 g/L). Taip pat rekomenduojama alginato gamybai naudoti antrines žaliavas, kurios gamybos procesą daro ekonomiškesnį.

Literatūros sąrašas

1. BROWNLEE, Iain A., et al. Applications of alginates in food. In: *Alginates: Biology and applications*. Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 211-228.
2. LEE, Kuen Yong; Mooney, David J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 2012, 37.1: 106-126.
3. BERND H. A. Rehm, M. Fata Moradali et al. Alginates and their biomedical applications, 2018.
4. PAWAR, Siddhesh N.; Edgar, Kevin J. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 2012, 33.11: 3279-3305.
5. MØRCH, Yrr A. Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy—A study of the structure-function relationships in native and structurally engineered alginates, 2008.
6. HAY, Iain D., et al. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial biotechnology*, 2013, 6.6: 637-650.
7. SMIDSRØD, Olav, et al. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in biotechnology*, 1990, 8: 71-78.
8. CLARK, Donald E.; Green, Harland C. Alginic acid and process of making same. U.S. Patent No 2,036,922, 1936.
9. RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 2008, 57.3: 397-430.
10. QIN, Yimin. Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management. *Polymer International*, 2008, 57.2: 171-180.
11. REMMINGHORST, Uwe; Rehm, Bernd HA. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology letters*, 2006, 28.21: 1701-1712.
12. MORADALI, M. Fata, et al. Alginate polymerization and modification are linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, 2015, 6.3: e00453-15.
13. URTUVIA, Viviana, et al. Bacterial alginate production: An overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33.11: 198.
14. HAUG, Arne. Fractionation of alginic acid. *Acta Chemica Scandinavica*, 1959, 13.3: 601-603.
15. TØNNESEN, Hanne Hjorth; Karlsen, Jan. Alginate in drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, 2002, 28.6: 621-630.
16. GEORGE, Meera; Abraham, T. Emilia. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. *Journal of controlled release*, 2006, 114.1: 1-14.
17. HAY, Iain D., et al. Bacterial biosynthesis of alginates. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 2010, 85.6: 752-759.
18. GHAFOR A, Hay ID, Rehm BH Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture, 2011. *Appl Environ Microbiol* 77(15):5238–5246
19. GASPERINI L, Mano JF, Reis RL Natural polymers for the microencapsulation of cells, 2014. *J R Soc Interface* 11:20140817. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0817>
20. GOH, Cheong Hian; Heng, Paul Wan Sia; Chan, Lai Wah. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88.1: 1-12.
21. CHEN, Qixin, et al. Recent advances in polysaccharides for osteoarthritis therapy. *European journal of medicinal chemistry*, 2017, 139: 926-935.

22. KAZEMZADEH, Somayeh; Naghavi, Nafiseh Sadat; Fouladgar, Masoud. Submerged alginate biopolymer production by *Azotobacter chroococcum* isolated from soil. *Advances in BioResearch*, 2017, 8.2.
23. YUDIATI, E., et al. Optimization of alginate alkaline extraction technology from *Sargassum polycystum* and its antioxidant properties. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, 2018. p. 012052.
24. NAGARAJAN, A.; Shanmugam, A.; Zackaria, A. Mini review on alginate: Scope and future perspectives *J. Algal Biomass Utiln*, 2016, 7.1: 45-55.
25. KIVILCIMDAN MORAL, Çiğdem; Yildiz, Merve. Alginate production from alternative carbon sources and use of polymer based adsorbent in heavy metal removal. *International Journal of Polymer Science*, 2016.
26. SAEED, S., et al. Bioconversion of agricultural by-products to alginate by *Azotobacter vinelandii* and physico-chemical optimization for hyper-production. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 2016, 26.5.
27. GALAL, G. F.; Ouda, S. M. Production of alginate by different isolates of *Azotobacter* species. *Life Sci. J*, 2014, 11.9: 29-38.
28. PANDURANGAN, Gayathri, et al. Small scale production and characterization of alginate from *Azotobacter chroococcum* using different substrates under various stress conditions. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2012, 3.1: 40-45.
29. MATA, Teresa M., et al. Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource technology*, 2012, 107: 151-158.
30. KUCUKASIK, F.; YENIGUN, O.; ONER, E. Toksoy. Molasses as fermentation substrate for microbial biopolymer production. *New Biotechnology*, 2009, 25: S250.
31. MORAL, Çiğdem Kivilcimdan; DOĞAN, Özdemir; SANIN, F. Dilek. Water treatment using a laboratory-grown biopolymer. *New Biotechnology*, 2012, 29: S175-S176.
32. JIMÉNEZ, Diego Javier; Montaña, José Salvador; Martínez, María Mercedes. Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011, 42.3: 846-858.
33. AHMED, Mohammad Boshir, et al. Adsorptive removal of antibiotics from water and wastewater: progress and challenges. *Science of the Total Environment*, 2015, 532: 112-126.
34. ÖNCÜ, Nalan Bilgin; Menciloğlu, Yusuf Ziya; Balcioğlu, Işıl Akmeahmet. Comparison of the effectiveness of chlorine, ozone, and photocatalytic disinfection in reducing the risk of antibiotic resistance pollution. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 2011, 14.2: 196-203.
35. SARKAR, Binoy, et al. Designer carbon nanotubes for contaminant removal in water and wastewater: a critical review. *Science of the Total Environment*, 2018, 612: 561-581.
36. BAEK, Soyoung; Joo, Sung Hee; Toborek, Michal. Treatment of antibiotic-resistant bacteria by encapsulation of ZnO nanoparticles in an alginate biopolymer: Insights into treatment mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*, 2019.
37. CHELLAPANDI, P. Laboratory Manual in Industrial Biotechnology. Pointer Publishers, 2007 Chapter 8, 170-172.
38. KODALI, Vidya Prabhakar; Sen, Ramkrishna. Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2008, 3.2: 245-251.

39. KEDARE, Sagar B.; Singh, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 2011, 48.4: 412-422.
40. KUCUKASIK, F.; Yenigun, O.; Oner, E. Toksoy. Molasses as fermentation substrate for microbial biopolymer production. *New Biotechnology*, 2009, 25: S250.
41. MORENO, J., et al. Growth and exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* in media containing phenolic acids. *Journal of applied microbiology*, 1999, 86.3: 439-445.
42. TRUJILLO-ROLDÁN, Mauricio A., et al. The production, molecular weight and viscosifying power of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* is affected by the carbon source in submerged cultures. *Dyna*, 2015, 82.194: 21-26.