Projekta

“BIONOĀRDĀMO POLIMĒRU IEGŪŠANA NO ATJAUNOJAMIEM RESURSIEM AUGĻU AIZSARGPLĒVJU UN IEPAKOJUMA MATERIĀLU IZSTRĀDEI”

Noslēguma pārskats

Projekts Nr. 19 00 A01612 000004

Informācijas sagatavotājs: *Msc. biol.* Sergejs Koļesovs, Latvijas Universitātes Bioloģijas institūts, zinātniskais asistents

Projekta koordinators: *Dr. biol.* Pāvels Semjonovs, Latvijas Universitātes Bioloģijas institūts, vadošais pētnieks

Sadarbības partneri:

Latvijas Universitāte

Dārzkopības institūts

Valters Dambe

AS “Rankas piens”

Auru pagasta ZS “Pērles”

SIA “PROBIOTIKA LV”

Projekta īstenošanas periods: 01.10.2019 – 01.10.2022

RĪGA 2022

SATURS

TEKSTĀ LIETOTI SAĪSINĀJUMI 4
INFORMĀCIJA PAR PARTNERIEM 5
PROJEKTA PAMATJĒDZIENI 6
PROJEKTA APRAKSTS UN SASNIEDZAMAIS MĒRĶIS 6
PROJEKTĀ IESAISTĪTO PARTNERU UZDEVUMI UN ATBILDĪBAS JOMAS 8
1. SADAĻA: BIOPOLIMĒRU ZINĀTNISKI TEHNISKĀS LITERATŪRAS KOPSAVILKUMS 11
BIOPOLIMĒRI 11
BAKTERIĀLĀ CELULOZE 16
LEVĀNS 27
DEKSTRĀNS 30
BIOPOLIMĒRU IZMANTOŠANAS IESPĒJAS AUGĻU APSTRĀDĒ 32
PĀRKLĀJUMI PĀRTIKAS PRODUKTIEM: ĒDAMAIS PĀRKLĀJUMS 34
KOPSAVILKUMS 49
2. SADAĻA: BIOPOLIMĒRU IEGŪŠANAS METODOLOĢIJA 50
BAKTERIĀLAS CELULOZES IEGŪŠANA – PROTOKOLS 50
PROBIOTISKO BAKTĒRIJU *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS K12* UN *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* IZMANTOŠANA EKSOPOLISAHARĪDU (EPS) IEGŪŠANAI – PROTOKOLS 68
PIENA SŪKALU IZMANTOŠANA EKSOPOLISAHARĪDU IEGUŠANAI – PROTOKOLS 73
KRŪMCIDONIJU SĪRUPA KĀ POTENCIĀLU OGLEKĻA AVOTA IZVERTEŠANA EKSOPOLISAHARĪDU (EPS) *SINTĒZEI* 75
EKSPERIMENTĀLA BIOREAKTORA BIOPOLIMĒRU IEGŪŠANAI TEHNISKĀ RASĒJUMA UN PROTOTIPA IZSTRĀDE 78
3. SADAĻA: OPTIMĀLU BIOPOLIMĒRU PĀRKLĀJUMU IZSTRĀDE UN PĀRBAUDE 87
BAKTERIĀLĀS CELULOZES PALIKTŅI OGĀM 87
BAKTERIĀLĀS CELULOZES SUSPENSIJA OGU UZGLABĀŠANAS TERMINA PAGARINĀŠANAI 90
BAKTERIĀLAS CELULOZES PLĒVJU IZGATAVOŠANA SIERA NOGATAVINĀŠANĀS PROCESĀ - PROTOKOLS 91
BAKTERIĀLAS CELULOZES BIOPOLIMĒRS – SINTĒTISKU IEPAKOJUMU VIDEI DRAUDZĪGS ANALOGS 96
ZEMEŅU OGU NOVĒRTĒŠANAS METODIKA 97
AVEŅU PARAUGU SAGATAVOŠANA 100
LEVĀNA - DEKSTRĀNA PĀRKLĀJUMU IZSTRĀDE UN NOVĒRTĒŠANA 101
BIOPOLIMĒRU PĀRKLĀJUMUS RAKSTUROJOŠO ĪPAŠĪBU NOVĒRTĒJUMS 103
JAUNIZVEIDOTO BIOPOLIMĒRU KVALITĀTI NOTEICOŠO PARAMETRU IZVĒRTĒŠANĀ. 108
JAUNIZVEIDOTO IEPAKOŠANAS KOMPOZĪTMATERIĀLU PROTOTIPU RECEPTŪRAS 110
SENSORĀS NOVĒRTĒŠANAS ANKETA PĒC LĪNIJU METODES 113
ZEMEŅU UN AVEŅU OGU APSTRĀDES METODIKA PIELIETOJOT EKSOPOLISAHARĪDUS 114
4. SADAĻA: PROJEKTA REZULTĀTU APKOPOJUMS UN SECINĀJUMI 121
5. SADAĻA – PUBLICITĀTE 123
1. PIELIKUMS: PROJEKTA IETVAROS IZSTRĀDĀTIE ZINĀTNISKIE RAKSTI 126
2.PIELIKUMS: PROJEKTA IETVAROS SAGATAVOTIE POPULĀRZINĀTNISKIE RAKSTI 207

3. PIELIKUMS: APP DĀRZKOPĪBAS INSTITŪTS – OMNISEC ZIŅOJUMS..... 230
4. PIELIKUMS: EKSPERIMENTĀLAIS DARBS UN TĀ IZTIRZĀJUMS 243

TEKSTĀ LIETOTI SAĪSINĀJUMI

ĀS – ābolu sula

BC – bakteriālā celuloze

CSL – angl. *corn steep liqour*

dH_2O – destilētais ūdens

DI – Dārzkopības institūts

EB – etiķskābes *b*aktērijas

ENRK – enzimātiskas noteikšanas reaģentu komplekts

EPS – eksopolisaharīdi

GCH – gelcaurlaidības hromatogrāfija

GFH – gelfiltrācijas hromatogrāfija

GRAS – *angl.* generally recognised as safe

HS – Hestrin-Schramm

KE – kukurūzas ekstrakts

KVV – koloniju veidojošā vienība

LU – Latvijas Universitāte

MRS - De Man, Rogosa and Sharpe

PCR – *angl*. polymerase chain reaction

PET – polietilēntereftalāts

PP – polipropilēns

PVS – polivinil spirts

RE – rauga ekstrakts

RDBR – rotācijas disku bioreaktors

SL – *angl.* shelf life

SEM – skenējošais elktronu mikroskops

INFORMĀCIJA PAR PARTNERIEM

Informāciju sagatavoja: *Msc. biol.* Sergejs Koļesovs, Latvijas Universitāte, zinātniskais asistents

Koordinators: *Dr. biol.* Pāvels Semjonovs, Latvijas Universitāte, laboratorijas vadītājs, Tel. +371 29724408, e-pasts pavels.semjonovs@lu.lv

Partneri

- Latvijas Universitāte, Raiņa bulvāris 19, Rīga, LV-1586, Pētniecības iestāde
  Pāvels Semjonovs, Tel. +371 29724408, e-pasts: pavels.semjonovs@lu.lv

- Dārzkopības institūts, Graudu iela 1, Ceriņi, Krimūnu pagasts, Dobeles novads, LV- 3701, Pētniecības iestāde
  Vitalijs Radenkovs, Tel. +371 20139823, e-pasts: vitalijs.radenkovs@llu.lv

- AS "Rankas piens", Ranka, Rankas pagasts, Gulbenes novads, Latvija, LV-4416, Lauksaimniecības produktu pārstrādes uzņēmums
  Aldis Spalviņš, Tel. +371 64470076, e-pasts: ranka.piens@gmail.com

- SIA "Skoru Dārzi, Skoras, Tumes pagasts, Tukuma novads, Latvija, LV-3139, Lauksaimnieks
  Laura Lindermane, Tel. + 371 22335256, e-pasts: lindermane@inbox.lv

- Valters Dambe, Kalnamuiža, Stalbes pagasts, Pārgaujas novads, LV-4151, Lauksaimnieks
  Valters Dambe, Tel. +371 26616950, e-pasts: valters.dambe@gmail.com

- Auru pagasta zemnieku saimniecība "Pērles", "Pērles", Auru pagasts, Dobeles novads, LV-3701, Lauksaimnieks
  Artūrs Rāviņš, Tel. +371 29106391, e-pasts: anitaravina@inbox.lv

- Sabiedrība ar ierobežotu atbildību "PROBIOTIKA LV", Brīvības gatve 451 - 12, Rīga, Latvija, LV-1024, Biotehnoloģiju attīstības uzņēmums
  Maija Rukliša, Tel. +371 29784408, e-pasts: psem@latnet.lv

PROJEKTA PAMATJĒDZIENI

Projekta pamatjēdzieni ir risināt problēmu saistītu ar augļu zudumiem, pielietojot jaunākas tehnoloģijas biopolimēru jomā un nodrošinot cirkulāras ekonomikas principu ieviešanu lauksaimniecības jomā.

PROJEKTA APRAKSTS UN SASNIEDZAMAIS MĒRĶIS

"Bionoārdāmo polimēru iegūšana no atjaunojamiem resursiem augļu aizsargplēvju un iepakojuma materiālu izstrādei" projekta ietvaros tika veikta vairāku biopolimēru producentu detalizēta izpēte un atlase, pārbaudīti vairāki biopolimēru iegūšanas substrāti un izstrādāti inovatīvi un ilgtspējīgi iepakojuma materiāli.

Ievads

Zinātniskie pētījumi parāda, ka pastāv cieša kopsakarība starp dzīves ilgumu un veselīgu pārtikas produktu patēriņu (Kaur & Das, 2011). Tādējādi veselīgie dzīves un uztura paradumi aizvien vairāk ienāk cilvēku ikdienas dzīvē. Augļi un ogas ir viena no veselīga uztura sastāvdaļām. Piemēram, zemenēm un avenēm ir gan izcilas sensorās īpašības, gan ķīmiskais sastāvs, tās satur polifenolus, kas piedalās brīvo radikāļu neitralizēšanā. Klīniskie pētījumi norāda, ka augu polifenolu lietošana uzturā samazina saslimšanas risku ar kardiovaskulārām slimībām (Feresin et al., 2017; Paquette et al., 2017). Ogu ražošana Latvijā ir izteikti sezonāla. Ogas ir ar salīdzinoši īsu uzglabāšanas laiku (5-7 dienas), tādēļ, piemēram, svaigu aveņu un zemeņu pieejamība tirgū ir limitēta. Ražošanas apjomus būtiski ierobežo arī pieejamo uzglabāšanas tehnoloģiju nepilnības un izmaksas. Ogu uzglabāšanas ilgums atkarīgs no uzglabāšanas temperatūras, gaisa relatīvā mitruma, elpošanas intensitātes (O_2/CO_2 gāzu apmaiņa), epidermas slāņa biezuma un uzņēmības pret mikroorganismiem (Maraei & Elsawy, 2017). Tiek konstatēts, ka, pateicoties unikālām fizikāli-ķīmiskām un reoloģiskām īpašībām, kā arī biosaderībai, drošumam un bioloģiskai noārdamībai, bakteriālie polisaharīdi (polimēri) var tikt izmantoti kā efektīvs pārklājums mīksto augļu/ogu apstrādē un iepakošanas materiālu izveidē. Tas kļūst īpaši aktuāli sakarā ar ES apņemšanos līdz 2030. g. radikāli samazināt no fosilajām izejvielām iegūtu iepakošanas materiālu izmatošanu. Projekta gaitā plānots izstrādāt efektīvus risinājums bakteriālo polimēru iegūšanai lauksaimniecības un pārtikas pārstrādes blakusproduktu (piem. sūkalas, augu atlieku hidrolizāti u.c.) biokonversijas ceļā, pārbaudīt un aprobēt paņēmienus, to izmantošanai ogu aizsargpārklājumos un iepakošanas materiālu veidošanai.

Tēmas aktualitāte

Pārtikas un lauksaimniecības organizācijas (*angl.* Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO UN)) dati norāda, ka lielākie zudumi – 20% apmērā – augļu un dārzeņu ražošanas ķēdē rodas ražas novākšanas un šķirošanas laikā, savukārt 10-12% zudumu veidojas patērētājiem, produktu kvalitātes neatbilstības dēļ. Pēc oficiāliem datiem, augļu un dārzeņu zudumu apjoms Eiropā sastāda 45% no kopējās ražas. Zudumus un pārtikas atkritumus var vērtēt kā nelietderīgu dabas resursu izmantošanu (zeme, ūdens, enerģija u.c.), kas patērēti, lai ražotu pārtikas produktus. Sakarā ar pārtikas tirgus augošo pieprasījumu, pārtikas ražotāji izjūt arvien lielāku spiedienu ražot pārtikas produktus ar pagarinātiem derīguma termiņiem, lai nodrošinātu lielākus apjomus un samazinātu ražošanas izmaksas. Viens no risinājumiem ir ķimikāliju lietošana pārtikas apstrādē. To lietošana pārtikas produktos Latvijā un Eiropas Savienībā ir reglamentēta saskaņā ar ES direktīvām, kuru prasības ir iestrādātas nacionālajos tiesību aktos. Tajā pat laikā strauji pieaug pētījumu skaits, kuros pierādīta to kaitīgu ietekme uz cilvēku organismu, tai skaitā lietošanā atļauto. Īpaši stingrs regulējums atticas uz bioloģiskām un integrētām saimniecībām, līdz ar ko to produkcijas zudumi uzglabāšanas laikā šādām saimniecībām kļūst īpaši apdraudoši. Jāatzīmē arī, ka 2018. g. 28. maijā Eiropas komisija ir iesniegusi direktīvas projektu (priekšlikums Eiropas Parlamenta un padomes direktīvai par konkrētu plastmasas izstrādājumu vidiskās ietekmes samazināšanu), saskaņā ar kuru plānots aizliegt tādus plastmasas izstrādājumus, kuriem ir pieejama un pēc to īpašībām un cenas pieņemama alternatīva, vienlaicīgi iekasējot no dalībvalstīm kā obligāto maksājumu noteiktu summu par katru pārstrādei nederīgu plastmasas atkritumu kilogramu. [Eiropas Komisija - Paziņojums prese, IP/18/3927]. Līdz ar to ir svarīgi rast videi draudzīgas alternatīvas iepakošanas materiāliem, kurus iegūst nevis no fosilajām izejvielām, bet gan no vietējās lauksamniecības produkcijas

pārstrādes blakusproduktiem to biotehnoloģiskas konversijas ceļā. Tādēļ ir svarīgi rast efektīvas cilvēkam un videi draudzīgas uzglabāšanas zudumus samazinošās tehnoloģijas, tādējādi sekmējot ražotāju konkurētspēju. Šādu tehnoloģiju ieviešana pozitīvi ietekmēs arī vides kvalitāti, mazinot siltumnīcas efekta gāzu izmešu daudzumu ilgtermiņā.

Mērķis

Projekta mērķis ir izstrādāt jaunus materiālus augļu - īpaši mīksto ogu (aveņu un zemeņu) apstrādei ar bioloģiski noārdāmiem mikrobiāli sintezētiem polimēra pārklājumiem (ēdamām plēvēm), kas ļautu ilgāk saglabāt ogu kvalitāti un pagarinātu to uzglabāšanas laiku – neizmantojot cilvēkam un videi kaitīgas ķimikālijas. Pētījuma ietvaros ir plānots pārbaudīt un pierādīt, ka ogu uzglabāšanas laiku var paildzināt, tās apstrādājot ar efektīvu, veselībai nekaitīgu un bioloģiski noārdāmu polimēra pārklājumu, to iegūstot no mikrobiāli sintezētajiem polisaharīdiem, to atvasinājumiem un kompozītiem. Šī mērķa sasniegšanai ir nepieciešams veikt biotehnoloģiskos pētījumus par atsevišķu polimēru iegūšanas īpatnībām no lauksamniecības un pārstrādes rūpniecības blakusprodutiem (piem. sūkalas, augu atlieku biomasas hidrolizāti, melases utt.), to rezultātā izstrādājot tehnoloģijas prototipu biopolimēru pārklājumu un iepakošanas materiālu iegūšanai ar tādiem raksturlielumiem, kas atbilst to pielietošanas veidam (augļu pārklājumi, bionoārdāmie iepakošanas materiāli – gan augļu, gan piena produktu iepakošanai).

Plānotie rezultāti

Projekta ietvaros plānots izstrādāt, pārbaudīt, pielāgot un pierādīt efektīvāko biotehnoloģisko risinājumu polimēru iegūšanai no lauksaimniecības produkcijas un tās pārstrādes blakusproduktiem; izvērtēt polimēru pārklājumu izmantošanu zemeņu un aveņu, kā arī citu augļu apstrādē; pārbaudīt un pierādīt biodegradējamo polimēru pārklājumu efektivitāti uz ogu kvalitātes rādītājiem. Projekta ietvaros tiek plānotas šādas darbības:

1) Tehniskās un zinātniskās informācijas izpēte un novērtēšana biopolimēru iegūšanai no sūkalām, t.sk. pieejamo paraugu sastāva izpēte un novērtēšana;
2) Piena pārstrādātāja un pētnieku sadarbībā jāizvērtē pieejamo sūkalu sastāvs un citi raksturlielumi, kas ietekmē polimēru biosintēzi;
3) Laboratorijas apstākļos ir nepieciešams veikt biopolimēru producentu kultūru optimālu kultivācijas apstākļu izvērtēšanu un atlasi efektīvai biopolimēru ražošanai no sūkalām, kā arī citiem lauksamniecības un pārstrādes rūpniecības blakusprodutiem (piem. augu atlieku biomasas hidrolizāti, melases utt.;
4) Iepriekš minēti pētījumi veidos nepieciešamo bāzi mikrobiāli sintezēto polimēru biotehnoloģijas prototipa izstrādei. Tās realizācijas gaitā tiks iegūti polimēru paraugi ogu pārklājumu un iepakošanas materiālu izveidei;
5) Augļu apstrāde ar noārdāmiem polimēru pārklājumiem un to kvalitātes rādītāju pārbaude, nosakot ogu kvalitātes rādītājus, t.sk. a) ogu fizikālo un ķīmisko rādītāju izvērtēšana; b) ogu sensorās īpašības; c) mikrobioloģiskās analīzes. Ņemot vērā visu rādītāju kopu, tiks noteikts ogu optimālais uzglabāšanas ilgums;
6) Lai projekta rezultātus izplatītu nozares profesionāļu vidū, ir plānots ik gadu organizēt tiem informatīvos pasākumus un izplatīt tos EIP tīklā. Tiks sagatavota vismaz viena zinātniskā publikācija SCOPUS citētajos žurnālos, lai nodrošinātu projekta ietvaros sasniegto rezultātu ilgtspēju, starptautisku aprobāciju, atkārtojamību un tālāku attīstīšanu. Katru gadu projekta dalībnieki piedalīsies vienā zinātniskā konferencē (projekta nozarē), lai gūtu rezultātu aprobāciju, t.sk. starptautisku nozares profesionālu vidū. Visi partneri būs iesaistīti informatīvo un publicitātes pasākumu īstenošanā.

Projekta plānotais īstenošanas laiks ir 36 mēneši. Šajā laikā plānotie ieguldījumi būs saistīti ar kvalificēta personāla darba algas un ar to saistīto nodokļu izmaksām, materiālu (ķīmija, fermenti, laboratorijas preces utml.), pakalpojumu analīzes, publicitātes pasākumu īstenošanu un rezultātu izplatīšanu. darbības un projekta kopsavilkums, ietverot mērķus, problēmas un iespējas, ieguvumus un iespējas galalietotājam, galvenās darbības, sasniegtos praktiskos rezultātus un rekomendācijas.

PROJEKTĀ IESAISTĪTO PARTNERU UZDEVUMI UN ATBILDĪBAS JOMAS

Latvijas Universitāte:

1. Biopolimēru producentu, fizioloģisko un bioķīmisko īpašību izpēte.
2. Optimālo kultivācijas apstākļu atlase.
3. Iegūto biopolimēru paraugu testēšana, iepakošanas kompozītmateriālu prototipu iegūšana.
4. Iegūto rezultātu publicēšana un izplatīšana

Dārzkopības institūts

1. Ogu paraugu pirmapstrāde.
2. Kvalitātes rādītāju pārbaude eksperimentālās un kontroles grupas paraugiem
3. Iegūto rezultātu publicēšana un izplatīšana.

AS "Rankas piens"

1. Dažāda tipa izejvielu (sūkalu) nodrošināšana pētījumu veikšanai un tehnoloģiju izstrādei.
2. Izejvielu (sūkalu) raksturlielumu kontrole.
3. Iegūto rezultātu izplatīšana

SIA "Skoru Dārzi"

1. Ogu, kas iegūti dažādos kultivēšanas apstākļos, šķirņu paraugu nodrošināšana salīdzinošai novērtēšanai, apstrādei ar biopolimēru pārklājumiem.
2. Iegūto rezultātu izplatīšana.

Valters Dambe

1. Ogu, kas iegūti dažādos kultivēšanas apstākļos, šķirņu paraugu nodrošināšana salīdzinošai novērtēšanai, apstrādei ar biopolimēru pārklājumiem.
2. Iegūto rezultātu izplatīšana.

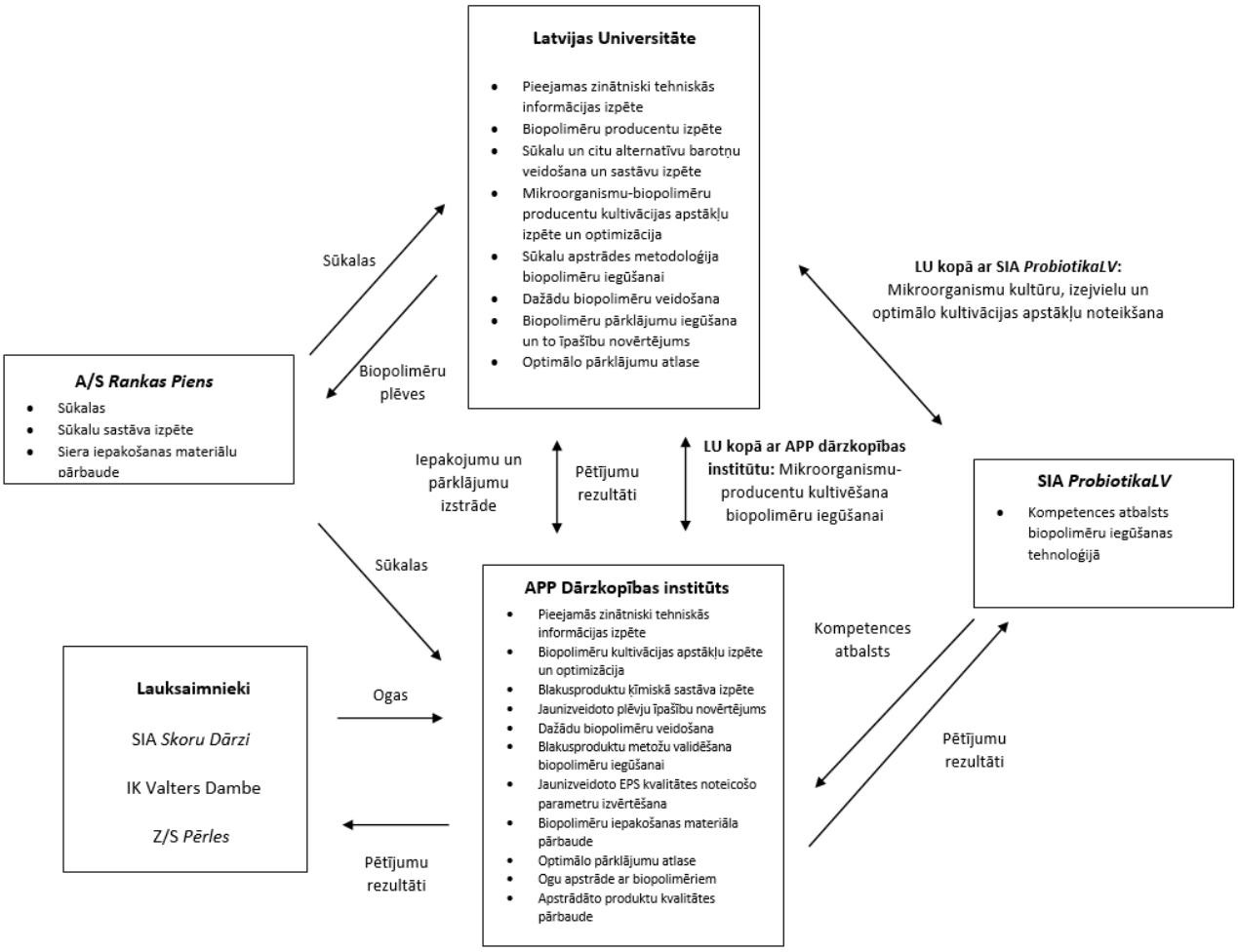
Auru pagasta ZS "Pērles"

1. Ogu, kas iegūti dažādos kultivēšanas apstākļos, šķirņu paraugu nodrošināšana salīdzinošai novērtēšanai, apstrādei ar biopolimēru pārklājumiem.
2. Iegūto rezultātu izplatīšana.

Sabiedrība ar ierobežotu atbildību "PROBIOTIKA LV"

1. Biopolimēru iegūšanas tehnoloģijas prototipa izstrāde
2. Iegūto rezultātu izplatīšana.

Projektā iesaistīto partneru uzdevumi un atbildības jomas shēma



1. attēls. Projektā iesaistīto partneru uzdevumi un atbildības jomas

PROJEKTA REZULTĀTI

1. SADAĻA: BIOPOLIMĒRU ZINĀTNISKI TEHNISKĀS LITERATŪRAS KOPSAVILKUMS

BIOPOLIMĒRI

Pārtikas atkritumi ir viena no vissvarīgākajām problēmām. Aptuveni trešdaļa visās ES dalībvalstīs ražotās pārtikas tiek izmesta atkritumos (88 miljoni tonnu, 138 miljardu eiro vērtībā). Pasaulē aptuveni 42% pārtikas atkritumu rada mājsaimniecības. Iemesls - izveidoti slikti paradumi, veikalu rīkotās akcijas, kas bez vajadzības rosina pirkt vairāk produktu. Pasaules Pārtikas un lauksaimniecības organizācija (FAO) vēsta, ka pasaulē ik gadu atkritumos izmet 1,3 miljardus tonnu pārtikas. Jaunattīstības valstīs vairāk nekā 40% pārtikas produktu zudumu veidojas pēc ražas novākšanas un pārstrādes procesā. Latvija gada laikā rada aptuveni 80 000 tonnu pārtikas atkritumu, viens cilvēks rada vidēji 113 kg. Bet ES valstīs vidējais rādītājs ir 173 – 180 kg uz cilvēku, no kuriem 38 – 40% pārtikas atkritumu rodas mājsaimniecībās. Diemžēl joprojām ES valstīm nav izveidota vienota pārtikas atkritumu daudzuma samazināšanas politika (Uldis Graudiņš, 2016). Būtu jāmeklē veidi, kā varētu pagarināt pārtikas produktu uzglabāšanas ilgumu un kvalitāti. Viens no risinājumiem pārtikas produktu (augļu un ogu) uzglabāšanas laika un kvalitātes pagarināšanai ir to apstrāde ar bionoārdāmiem polimēru pārklājumiem.

Pašlaik pasaulē ir pieejami vairāku veidu pārklājumi - kā dabiskas izcelsmes tā arī mikrobioloģiski sintezētie. Biopolimēru – makromolēkulas, kuras sintezē dzīvie mikroorganismi, ir potenciāls problēmas risinājums. Pateicoties savai daudzveidībai, potenciāli var atlasīt vēlamo biopolimēru, un izstrādāt bioiepakojumus vai aizsargplēves.

Dabiskās izcelsmes pārklājumi, kas iegūti no augiem, dzīvniekiem vai no insektiem

Vieni no tradicionāli visplašāk lietotajiem un pazīstamākajiem ir šellaka vasks (E 904), karnaubvasks (E 903) un kandelila vasks (E 902). Pārsvarā ar tiem tiek apstrādāti augļi (bumbieri, āboli u.t.t.). Ziemā veikalā nopērkami spīdīgie, labi glabājamie importētie āboli, piemēram, tādām šķirnēm, kā 'Gala', 'Golden Delicious', 'Granny Smith', 'Jonagold', 'Red Delicious', bumbieri 'Conference' u.c. Visi tie gandrīz vienmēr ir apstrādāti ar šellaka tipa vaskiem. Pēc literatūras datiem augļu apstrādei biežāk izmanto 6-7% šellaka vaska pārklājumu (Bose and Sankaranarayan 2003).

Kandelila vasks ir ekstrakts no eiforbijām (Euphorbia antisyphilitica Zucc), kas atzīts par drošu (GRAS) vielu, tādēļ to ir atļauts lietot pārtikas produktu apstrādei bez ierobežojumiem. Apstrāde ar kandelila vasku būtiski pagarina banānu, tomātu, muskusa meloņu, laimu un citu citrusaugļu glabāšanas laiku

Karnaubvasks ir pārklājums, ko iegūst no Brazīlijā endēmiski sastopamo karnauba palmu (*Copernica prunifera* (Mill) H. E. Moore) lapām. Arī to uzskata par drošu vielu, un to ir atļauts izmantot dažādu pārtikas produktu pārklājumiem, ieskaitot augļiem un dārzeņiem.

Šellaka sveķi veidojas kukaiņu kāpuru dziedzeru sekrēcijas procesā, parasti izdala no tādiem kukaiņiem kā Laccifer lacca Kerr. (Hem. Coccidae). To kāpuru izdalītos sveķus plaši izmanto augļu pārklājumiem glabāšanas laika pagarināšanai (Alleyne & Hagenmaier, 2000; Orange Shellac Handling/ Processing).

Pēc apstrādes ar kādu no šāda tipa vaskiem, augļi ir spīdīgāki - uzlabojas ārējais izskats, tiem samazinās ūdens zudumi, kas parasti rodas elpošanas procesu rezultātā, palēninās elpošanas intensitāte un labāk saglabājas augļu stingrība/cietība. Ir minēts arī, ka augļu apstrāde ar vaska pārklājumiem samazina augļu puvju attīstību glabāšanas laikā (McGuire un Hagenmaier 2001).

Pašlaik pārtikas ražošanā augļu apstrādei arvien vairāk sāk izmantot arī medus bišu dziedzeru izdalīto vasku, kas ir pazīstams arī kā **baltais vasks**. Vasku izkausē no bišu šūnu kārēm pēc medus izsviešanas. Bet, tā kā tīram bišu vaska pārklājumam 5% vai lielākā koncentrācijā ir raksturīga nedzidrība, duļķainība, tad tā izmantošana augļu apstrādei ir iespējama tikai dažādās kombinācijās ar citiem vaskiem (karnaubas, šellaka, kandelilas vaskiem, vai augu eļļu) (Baldwin un Carriedo 1994; Hagenmaier un Baker 1996). Ir tikuši veikti zinātniski pētījumi par bišu vaska izmantošanas iespējām arī svaigu ogu apstrādei, bet pozitīvs rezultāts netika iegūts. Tika secināts, ka bišu vasks (2%) kombinācijā ar cieti (0,5:1,0%) glabāšanas laikā nespēja saglabāt pieņemamu kazeņu kvalitāti. Pēc 16 glabāšanas dienām 4°C temperatūrā un 88% relatīvajā gaisa mitrumā, ogām tika konstatēts paātrināts nogatavošanas process ar izteiktiem ūdens un bioloģiski aktīvo vielu zudumiem (Pérez-Gallardo et al., 2014).

Tātad ne vienmēr augļu vai ogu apstrāde ar vaskiem var dot pozitīvus rezultātus. Iznākums atkarīgs no vairākiem faktoriem: no pareizi izvēlēta vaska un tā koncentrācijas, no pārklājuma fizikālajām īpašībām, no vaska kombinācijas ar citām

vielām, arī no pašu apstrādājamo augļu ogu kvalitātes, ķīmiskā sastāva, gatavības pakāpes apstrādes brīdī u.c. Ietekmējošie faktori ir daudzi un kompleksi.

Par dzīvnieku izcelsmes biopolimēru tiek uzskatīts **hitozāns**. To iegūst no jūras vēžveidīgo pārstrādes blakusproduktiem - čaulām/eksoskeletiem. (Soares et al., 2011). Hitozāns nav toksisks un ir bioloģiski noārdāms dabā. Vienā no zinātniskajiem pētījumiem minēts, ka lielisku rezultātu zemeņu saglabāšanā izdevās panākt, apstrādājot ogas ar karboksimetilcelulozi 1% un hitozānu 1% vai hidroksipropilmetilcelulozi 1% un hitozānu 1%. Rezultātā apstrādātām ogām glabāšanas (11 ± 1 ºC, RH= 70–75%) ilgums pagarinājās par četrām dienām (kontroles ogas bez apstrādes saglabāja labu kvalitāti - 8 dienas, apstrādātas ogas -12 dienas) un sensorā kvalitāte apstrādātajam zemenēm būtiski nemainījās (Gol et al., 2013).

Mikrobioloģiskas izcelsmes biopolimēri

Ar katru gadu pieaug interese un pieprasījums pēc mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimēru pārklājumiem, kādus spēj sintezēt baktērijas un mikroskopiskās sēnes. Šāda veida biopolimēriem ir viena būtiska prioritāte - tiem parasti ir lielākas molmasas (molmasas mērvienība g/mol, jeb atomu vienību skaits, ko izsaka daltonos, simbols: Da, https://www.genscript.com/molecular-biology-glossary/723/dalton-Da). Jo lielāka molmasa, jo šādam savienojumam ir izteiktākas polimēra īpašības - pārklājuma/plēvju veidošanas spējas, plēves izturība, elastība, spīdīgums, barjerīpašības u.c. Līdz ar to paplašinās biopolimēru iespējamās izmantošanas jomas (piemēram, medicīnā). Mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimēriem ir būtiska priekšrocība, to ražošana neietekmē (nepastiprina) vides piesārņojumu (Donghui, 2016).

Viens no mikrobioloģiskās izcelsmes polimēriem ir **kurdlāns**. To sintezē baktērija *Agrobacterium biovar*. Tā īpašību dēļ (augsta termiskā izturība - nekūst pat temperatūrās virs 100ºC, stabils pret sasalšanu un atkausēšanu), to plaši izmanto pārtikas ražošanā kā emulgatoru vai stabilizatoru (Masanori, 1994). Kurdlāns ir balts pulveris ar augstu plūstamību, sausā formā ļoti stabils. Saglabā spēju veidot želeju pat pēc ilgstošas glabāšanas. Kurdlāns nešķīst ūdenī, nešķīst spirtā un lielākajā daļā organisko šķīdinātāju, bet šķīst sārmainajos šķīdumos, piemēram, nātrija hidroksīdā (E 524) un trinātrija fosfātā (E 339). Ir zinātniski pierādīts, ka kurdlāns ir absolūti netoksisks. Ja kurdlānu uzsilda virs 80º C, tas veido neatgriezenisku, stingru, elastīgu un termoizturīgu želeju. Želejas stiprums palielinās ja temperatūru paaugstina līdz pat 130º C. Šī viela nešķīst ūdenī. Lai to izšķīdinātu, ir jāuzsilda, bet nav nepieciešama citu vielu jonu pievienošana vai pH regulēšana (Lee et al., 2002). Iepriekš minēto īpašību dēļ kurdlāns ir populārs ēdamo trauku ražošanā. Termiski atgriezenisks gēls veidojas, ja kurdlānu uzsilda līdz 65 ° C, pievienojot glicerīnu. Saharozes koncentrācija virs 10% samazina kurdlāna želejas stingrību, bet glikoze un fruktoze 20% koncentrācijās gandrīz neietekmē želejas stiprumu. Arī sāls klātbūtne produktā samazina želejas stingrību.

Literatūrā netika atrasta informācija par kurdlāna lietošanu augļu un ogu apstrādēm, bet tradicionālajā pārtikas ražošanā to lieto plaši - kā biezinātāju, stabilizatoru vai ēdamo pārklājumu. Ēdamo plēvju ražošanā kurdlāna koncentrācija ir 30 - 100% robežās, bet, piemēram, kūku pārklājumiem lieto 4-6% koncentrācijās, saldējumu ražošanā kā stabilizatoru pievieno 0,1- 0,3% koncentrācijās, desu apstrādei, lai panāktu ūdens noturību produktā, izmanto 0,2-1% kurdlāna šķīdumu (Masanori, 1994). Pasaulē pārtikas ražošanā visplašāk kurdlānu lieto Japanā. Zinātnieki apgalvo, ka apstrādāta gaļa ir sulīgāka un mīkstāka. Turklāt ja gaļa bija sasaldēta, tad pēc tās atkausēšanas apstrādātai gaļai mitrums zūd mazāk. Pievienojot kurdlānu piena produktos, uzlabojas to izskats, garša un tekstūra, turklāt samazinās mitruma zudumi (Nishinari et al., 2009). Nūdeles, kurām pievienots kurdlāns, vārot vai sautējot, labi saglabā formu.

Pullulāns arī pieskaitāms pie mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimēriem. To sintēzē mikroskopiskā sēne *Aureobasidium pullulans*, iespējams izdalīt ar tīrības pakāpi virs 90% (Khan et al., 2007). Pullulānu ražo komerciāli, audzējot *A. pullulans* uz barotnes, kas satur 10 ± 15% cietes hidrolizātu, peptonu, fosfātu un bazālos sāļus. (Leathers, 2003). Biopolimēru sintēzes laikā, mikroorganismam jānodrošina atbilstošā temperatūra (30 °C) un substrāta maisīšanas intensitāte. Sākotnējam kultivācijas pH jābūt līdz 6,5, kas fermentācijas procesā rezultātā pazeminās līdz 3,5. Maksimālā kultūras augšana notiek 75 stundu laikā, bet optimāls pullulāna iegūšanas laiks ir aptuveni pēc 50 stundām. Pēc fermentācijas beigām mikroskopisko sēņu šūnas no substrāta tiek atdalītas ar mikrofiltrāciju, tad seko pullulāna izgulsnēšana ar etanolu (96%), pievienojot to vienādā tilpumā ar substrātu un izturot 8 stundas pie 5°C temperatūrās. Šķidro frakciju no cietās atdala ar centrifugēšanu ar turpmāko cietes daļu žāvēšanu 8 stundas ar silto gaisu pie 55 ° C temperatūrās, vai izmantojot sublimēšanas kalti – liofilizatoru. Vajadzīgo pullulāna daļiņu izmēru var dabūt to samaļot, savukārt augstāko tīrības pakāpi - vairākas reizes filtrējot un izgulsnējot ar etanolu (Survase et al., 2007; Farina et al., 2001).

Pullulāna molmasa ir atkarīga no fermentācijas apstākļiem - pH, temperatūras, substrāta (pieejamajām mikroorganismiem nepieciešamajām barības vielām) un konkrētā mikroorganisma celma (Leathers, 2003). Molmasa var variēt no 10 līdz 3000 kilodaltoniem (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2005). Pullulāns pirmo reizi tika izmantots kā pārtikas piedeva Japānā 1976. gadā (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2005). Tas labi šķīst ūdenī, nav toksisks un ir biodegradējams (Kumar et al., 2012; Ogzhan un Yangilar, 2013). Tomēr tā ražošanas izmaksas ir salīdzinoši augstas, salīdzinot ar materiāliem, kuri ir ražoti no naftas produktiem, tādēļ zinātnieki meklē lētākus ogļhidrāta un slāpekļa avotus, kas spētu nodrošināt *A. pullulans* augšanu un biopolimēra sintēzi ar labām fizikālām īpašībām. Zinātnieks no Japānas savā pētījumā kā fermentācijas vidi izmantoja hidrolizētos kartupeļus ar augstu cukura saturu. Rezultātā pullulāna iznākums bija ~ 30 g/l. To var uzskatīt par ļoti labu rezultātu (Wu et al. 2009). Vērts atzīmēt, ka, lai radītu mikroorganismiem piemērotākas barības vielas, zinātnieks ir izmantojis ķīmisko cietes hidrolīzes procesu, kuras rezultātā no cietes izveidojas cukuri. Bet šī tehnoloģija prasa daudz laika, resursu, zināšanu, un ir relatīvi dārga.

Bet ir produkti, kuros līdzīgi cukuri no cietes veidojas arī dabiski, piemēram, tieši tā notiek, nogatavojoties āboliem. Zinātniskie pētījumi rāda, ka pullulāna ražošanai var izmantot arī citus substrātus, kas satur daudz ogļhidrātu un slāpekļa savienojumu, taču šobrīd trūkst pētījumu, lai pamatotu to efektivitāti rūpnieciskos apstākļos.

Pullulāns pārtikas rūpniecībā tiek plaši izmantos ēdamo pārklājumu vai ēdamās plēves ražošanā, taču kā pārtikas piedeva (emulgatori, stabilizatori, u.c.) netiek izmantots. Pullulāna plēves/ pārklājumus parasti sagatavo, izšķīdinot sauso pulveri ūdenī ar koncentrāciju no 1 līdz 20%. Pullulāns kā augļu, ogu pārklājums izteikti palēnina elpošanas intensitāti, palēnina uzturvielu degradāciju, palīdz ilgstoši saglabāt gaistošās aromātvielas, palīdz samazināt nelabvēlīgo mikroorganismu attīstību (Farris et al., 2014). Piemēram, ķīniešu ēdamajiem kastaņiem (7% pullulāns + 2% glicerols), uzglabājot temperatūrā 20 °C 15 dienas ar gaisa relatīvo mitrumu 53% RH, lietošanas derīguma termiņš pagarinājās par 5 dienām (Gounga et al. 2010). Arī apstrādātām zemenēm (10g/l pullulāns, 20g/l glicerols, 5g/l Tween 80) derīguma termiņš pagarinājās līdzvērtīgi (Eroglu et al. 2014). 2015. gadā pirmo reizi tika veikti pētījumi par olu kvalitātes saglabāšanu apstrādājot tās ar pullulānu. Olām ar pullulāna pārklājumu samazinājās masas zudumi un palēninājās mikroorganismu attīstība, kā arī olu baltuma un dzeltenumu laba kvalitāte saglabājās ilgāk salīdzinot ar kontroles (neapstrādāto) variantu (Morsy et al., 2015).

Mazāk pazīstams mikrobioloģiskas izcelsmes biopolimērs ir **skleroglikāns**. To sintezē vairāku sēnīšu *Sclerotium* ģints sugas. Praksē skleroglikāna biosintēzei visbiežāk izmanto *S. glucanicum* un *S. rolfsii* sugas. Sintēze pārsvarā notiek barotnēs ar augstu bāzes saharozes saturu (līdz pat 20%) līdz brīdim, kad iestājas barības vielu deficīts (kad visa saharoze ir "apēsta"). Lai skleroglikāna sintēze būtu efektīva, barotnes sastāvā ir jābūt ogļhidrātiem, fosforam, sēram, kālijam, magnijam, slāpeklim, kā arī jānodrošina pietiekamu skābekļa padevi. Par ogļhidrātu avotiem visbiežāk tiek izmantoti vienkāršie cukuri - glikoze un saharoze. Ierobežota skābekļa padeve fermentācijas laikā palēnina mikroorganisma augšanu, bet paaugstina biopolimēra ražošanas spēju (Survase et al., 2007). Termiskā stabilitāte šim polimēram ir augsta, tas nezaudē savas fizikālās īpašības plašā pH diapazonā. Viela viegli šķīst ūdenī istabas temperatūrā.

Skleroglikānu izmanto gan pārtikas ražošanā, gan farmācijā. Skleroglikāna īpašības var mainīties atkarībā no molmasas un tīrības pakāpes (Survase et al., 2007). Produktu apstrādei pārklājumiem biežāk izmanto 0,5 un 2,0% šķīdumu, bet, ja nepieciešams izmantot kā stabilizatoru produktos, tad tiek izmantota 0,1 – 0,2 % koncentrācija. Skleroglikāns kļūst populārāks pateicoties savam fizikālajām (izturība pret hidrolīzi, temperatūru un elektrolītiem) un reoloģiskajām (plūstamība, viskozitāte u.c) īpašībām (Coviello et al., 2005). Skleroglikāna toksicitāte un ietekmē uz dzīvajiem organismiem tika pārbaudīta in vivo pētījumos ar žurkām, suņiem, jūrascūciņām, trušiem un cilvēkiem (Survase et al.,2007). Skleroglikāns nav toksisks, tas ir atzīts par drošu un tam ir piešķirts GRAS statuss.

Pārtikas rūpniecībā to visbiežāk izmanto kā biezinātāju, želējošo un stabilizējošo aģentu. Pateicoties savai ķīmiskajai stabilitātei, labai noturībai pret augstām temperatūrām un plašam pH darbības diapazonam, tas varētu viegli konkurēt ar ksantānu, kuru arī plaši izmanto pārtikas rūpniecībā. Bet, lai to panāktu, ir jāiegūst augstāka skleroglikāna ražošanas produktivitāte fermentācijas laikā par zemākām izmaksām. Skleroglikāns viegli aizstātu ksantānu daudzos pārtikas produktos - ievārījumus un marmelādēs, zupās, konditorejas izstrādājumos, želejās, saldētos produktos, piena produktos ar zemu kaloriju saturu u.t.t. (Survase et al., 2007). Skleroglikānam ir atklātas vēl arī citas interesantas un vērtīgas īpašības. Klīniskajos pētījumos konstatēts, ka skleroglikānam var būt pretvēža un pretvīrusu iedarbība. Tam ir atrasta augstāka imūnstimulējoša, pretmikrobu un pretaudzēju

iedarbība, nekā jebkuram citam D-glikānam. Farmācijā skleroglikānu plaši izmanto tablešu apvalku ražošanā, oftalmoloģisks šķīdumos, injicējamo antibiotiku suspensijās un Skleroglikāns var samazināt sliktā holesterīna jeb zema blīvuma lipoproteīna līmeni asinīs un paaugstināt lipīdu izdalīšanos no organisma. Skleroglikānu lieto farmācijā kā vielu, kas spēj palēnināt citu vielu uzsūkšanos, kā arī nodrošināt zāļu esošo aktīvo vielu labāku stabilitāti pret apkārtējas vides faktoriem (Survase et al., 2007; Coviello et al., 2005). Kosmetoloģijā to lieto, kā receptūras sastāvdaļu ādas kopšanas līdzekļos, piemēram, dermatologijā - kalamīna losjonos. Lauksaimniecībā to izmanto fitosanitārajās apstrādēs kā pretsēnīšu līdzekli. Skleroglikānu pievieno arī gatavojot izsmidzināmos maisījumus (pesticīdus, herbicīdus) ar mērķi uzlabot izsmidzināto vielu adhēziju/kontaktu ar virsmu (piemēram uz augu lapām vai sēklām). To var izmantot arī kā pārklājumu keramikas glazūrās, ugunsizturīgo materiālu ražošanā u.c. (Survase et al., 2007; Coviello et al., 2005).

Vēl viens mikrobiālas izcelsmes biopolimērs ir **elsināns**. To sintēzē vairāki mikroskopisko sēņu Elsinoe ģints pārstāvji. Pārtikā to izmanto kā plēvi vai ēdamo pārklājumu produktu derīguma termiņa paildzināšanai. Elsinānu izmanto arī farmācijā un citās nozarēs (Misaki et al., 1980;Misaki, 2004). Literatūrā ir minēts, ka Elsinoe leucospila suga, izmantojot 5% saharozes barotni, producē 23-25 g/L elsināna. Tas ir diezgan augsts rādītājs (Misaki, 2004). Fermentāciju sāk veikt ar substrāta sākotnējo pH 5,0, 20 °C temperatūrā, 3 dienas. Šūnas un micēliju no substrāta (no barotnes) atdala filtrējot vai centrifugējot. Elsināns tiek izgulsnēts ar metanolu, etanolu vai acetonu. Nogulsnēto elsinānu filtrē vai centrifugē, iegūto masu izžāvē (Sugimoto un Yokobayashi, 1981; Misaki, 2004).

Elsinānam ir augstā viskozitātes pakāpe. Tas ir stabils plašā pH un temperatūras diapazonā (pH 3 - 11, 30-70 °C), viegli šķīst ūdenī (Misaki, 2004). Plēve no elsināna viegli šķīst karstā ūdenī 80 °C temperatūrā. Temperatūrā, kas zemāka par 40 °C, tas uzbriest, saglabājot sākotnējo formu. Plēve ir ļoti izturīga un elastīga, bioloģiski noārdāma, ar augstu gāzu necaurlaidību (Sugimoto un Yokobayashi, 1981).

Tāpat kā jau iepriekšminētajiem biopolimēriem, arī elsinānam ir atrastas sliktā holesterīna pazeminināšanas, pretvēža un pretiekaisuma īpašības (Širasugi un Misaki, 1992; Misaki, 2004). Elsināna bioplēves ir labi piemērotas tādiem pārtikas produktiem, kas ātri bojājas. To izmanto kā apvalku medikamentiem (vitamīniem, fermentiem, u.t.t.). Plēve vai ēdamais pārklājums ļoti efektīvi saglabā produkta sākotnējās sensorās īpašībās (aromātu un garšu). Elsināns viegli sadalās gremošanas traktā. (Sugimoto un Yokobayashi, 1981). Elsinānam nepiemīt elektrovadītspēja - līdz ar to var izmantot arī elektroniskajās shēmās un instrumentos, kā vadu izolatoru.

Vēl viens interesants biopolimērs ir **levāns**. Levānam kā biezinātājam, kā nesējvielai (angl. carrier) vai arī tā izmantošanai farmācijā un medicīniskiem nolūkiem ir liels potenciāls (Combie, 2006). To spēj sintezēt gan augi, gan mikroorganismi (Melo et al., 2007). Levāns ir dabiski sastopams fruktāns, fruktozes homopolimērs. Levāns ir fruktozes homopolisaharīds, kas neuzbriest ūdenī un kuram ir ārkārtīgi zema iekšējā viskozitāte salīdzinājumā ar citām līdzīgu molekulu biopolimeriem (Combie, 2006; Arvidson et al., 2006). Levāna molekulāra masa un sazarojuma pakāpe atšķiras no mikroorganisma producenta. Tomēr molmasa bakteriālajam levānam ir daudz lielāka, nekā dabā sastopamajiem augu levāniem. Piemēram, bakteriālajam levānam molekulāra masa no 2 līdz 100 miljonu Da, bet augu levānam svārstās no aptuveni 2000 līdz 33 000 Da (Arvidson et al., 2006; Li et al., 2006; Barone un Medynets, 2007; Rairakhwada et al., 2007). Kā jau iepriekš minēts jo lielāka biopolimēra molmasa, jo ir izteiktākas to polimērās īpašības, piemēram, pārklājuma/plēvju veidošanas spējas, izturība, elastība, spīdīgums, barjerīpašības u.c.

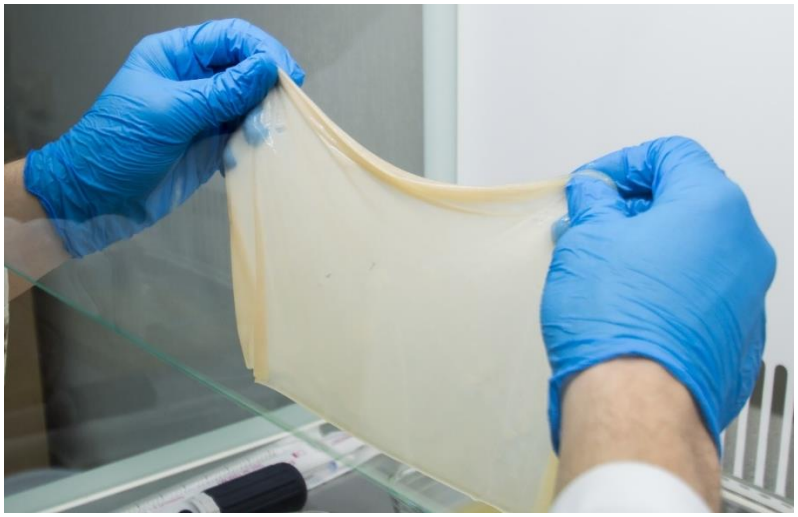
No saharozes ir iespējama biopolimēra **alternāna** sintēze. To spēj pienskābās baktērijas Leuconostoc mesenteroides. Pirmoreiz par mikrobioloģiskās izcelsmes polisaharīdu alternānu ziņots 1954. gadā (Jeanes et al., 1954). Alternānam ir zema viskozitāte un to lieto gan pārtikā, gan arī kosmētikā (Monsan et al., 2001). Hidrolīzes rezultātā baktērijas no saharozes ar enzīmu alternansukrāzi kā katalizatoru producē biopolimēru alternānu. Literatūrā aprakstīti trīs baktēriju celmi Leuc. mesenteroides spēj sintezēt alternansukrāzi NRRL B-1355, NRRL B-1501 un NRRL B-1498 (Jeanes et al.1954). Substrātam no kā tiks fermentēts alternāns, kā ogļhidrāta avots ir jāsatur saharoze - ieteicamā deva ne zemāka par 10% no substrāta daudzuma un ne augstāka par 20%. Substrātam ir jāsatur arī slāpeklis un neorganiskie sāļi. Lai nodrošinātu slāpekļa avotu, substrātā obligāti jāpievieno gaļas peptoni un raugu ekstrakts. Alternāna sintēze tiek veikta aerobos (skābekļa klātbūtnē) apstākļos, +25+30º C temperatūrā, divu līdz trīs dienu laikā. Pēc sintēzes substrāts tiek centrifugēts vai filtrēts, lai no tā atdalītu baktēriju šūnas. Alternānu no substrāta atdala (izgulsnē), pievienojot tam etanolu, metanolu vai izopropanolu. Iegūto masu papildus attīra, pievienojot tai ūdeni un atkārtoti izgulsnējot ar atbilstošo šķīdinātāju. Kā beigu posms ir iegūtās masas žāvēšana vai arī liofilizācija (Leathers et al., 1996; Wyckoff

et al., 1996; Monsan et al., 2001). Šim biopolimēram ir augsta šķīdības pakāpē un zema viskozitāte. Raksturīgākā īpašība ir izturība pret dažādiem mikrobioloģiskās un zīdītāju izcelsmes fermentiem. Vidēja alternāna molmasa ir 106 ± 107 Da (Leathers et al., 1996, 2003). Tā ka tas iz izturīgs pret fermentiem, tas ir labi piemērots funkcionālo ēdienu ražošanā, piemēram, prebiotisko produktu. Alternāna šķīdums ir ļoti stabils un nemaina savas īpašības +4+37 ° C temperatūrā un pH 3-9. Pēc fizikālajām īpašībām tas ir spilgti balts bezgaršīgs pulveris, kas ir ļoti hidroskopisks (Leathers et al., 2003). Tas spēj nomākt pelējuma sēnīšu un patogēno baktēriju attīstību. Alternānam pašam nav emulģējošas īpašības, bet pētnieki strādā pie tādu receptūru izstrādes, lai efektīvi to sajauktu ar emulgatoriem, un nenotiktu vielu atdalīšanās/atslāņošanās (Meinhold, 2012). Alternānam ir komerciāls potenciāls pārtikas produktos un kosmētikā. Tā īpašības ļauj to izmantot kā pildvielu ar zemu viskozitāti un pagarināt pārtikas un kosmētikas derīguma termiņu. Tas varētu būt kā lieku kaloriju nesaturošs mākslīgais saldinātājs pārtikas produktos. Kosmētikā ir potenciāls kā konservantam pievienot krēmos un ziedēs (Cote, 1992). *L. mesenteroides* ir GRAS statuss kas nozīme droši lietojams pārtikā un tas nav patogēns. (Eiropas Komisija, 2000; Colar, 1996).

BAKTERIĀLĀ CELULOZE

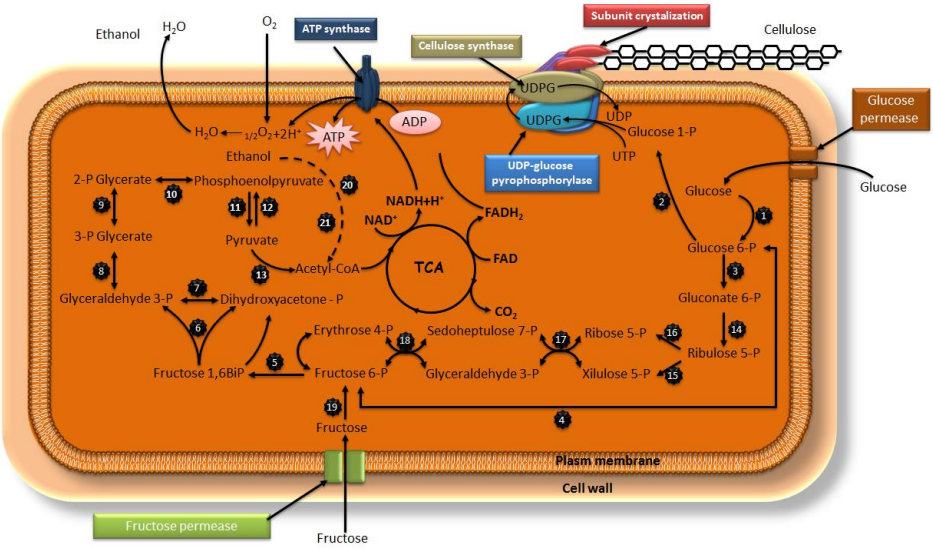
Ievads

BC ir biopolimērs – eksopolisaharīds, kuru spēj sintezēt *Aerobacter, Agrobacterium, Azotobacter, Gluconacetobacter, Pseudomonas, Rhizobium, Sacrina, Dicjeya, Rhodobacter* un citu ģinšu baktērijas (Azeredo et al. 2019). Tomēr par galvenajiem un rūpnieciski perspektīviem BC producentiem tiek uzskatītas aerobas EB, pie kurām pieder *Gluconacetobacter, Acetobacter, Komagataebacter un Novacetimonas* baktēriju ģintis (Gullo et al. 2018).



1. attēls. LU eksperimentu ietvaros iegūtas BC plēves.

Tiek uzskatīts, ka BC tiek sintezēta, kā iespējamais baktēriju pašaizsardzības mehānisms no UV stariem un palīdzot tām atrasties uz gaisa un šķidruma saskarsmes vietas, lai nodrošinātu tām nepieciešamā skābekļa labāku pieejamību (Reiniati et al. 2017). BC biosintēzes procesā notiek glikozes 6-fosfāta polimerizācija par β-1,4-glikāna ķēdēm (2. attēls), kam seko šīs ķēdes (protofibrillas) ekstracelulāra sekrēcija. Ķēdēm savstarpēji veidojot ūdeņraža saites, protofibrillas kristalizējas, kas noved pie BC mikrofibrillas veidošanās (Lustri et al. 2015).



2. attēls, EB *Gluconacetobacter xylinus* metabolisma shēma un BC sintēzes ceļš (Lustri et al. 2015).

Ir zināms, ka BC piemīt augstāka tīrība, salīdzinot ar augu celulozi, tā nesatur lignīnu, pektīnu un hemicelulozi. Augstākā tīrība tādējādi padara BC par tehnoloģiski perspektīvu tīrās celulozes avotu. Augu un BC fizikālo un mehānisku īpašību salīdzinājums ir apkopots 1. tabulā Turklāt BC biotehnoloģiskā ražošana samazina nepieciešamību iznīcināt mežus lai iegūtu augu izcelsmes celulozi, vai arī pārmērīgi izmantot lauksaimniecības zemes (Huang et al. 2014).

1. tabula

Augu celulozes un BC fizikālo un mehānisko īpašību salīdzinājums (Klemm et al. 2005; Chawla et al. 2009; Park et al. 2009

Raksturlielumi	Augu izcelsmes celuloze	Bakteriālā celuloze
Šķiedru diametrs: protofibrillas un mikrofibrillas, nm	3,5 – 6 2500 – 10000	1,5 – 4 25 –100
Polimerizācijas pakāpe	13000 – 14000	16000 – 20000
Kristāliskums, %	40 – 45	70 – 80
Porainība	Vidēja	Augsta
Vispārējā strukturālā organizācija	Pārsvarā amorfa	Pārsvarā ģeometriski definēta, 3D tīklveida, kristāliskā
Ūdens absorbcijas līdzsvars, %	~ 50	> 95
Stiepes izturība, MPa	~ 120	200 – 300
Elastības īpašības: Junga modulis, MPa	20 – 30	79 – 88

BC ir pazīstama ar tādam īpašībām, kā augsta tīrība, elastība, augsta ūdens noturības spēja, mehāniskā izturība, augsta polimerizācijas pakāpe, hidrofilitāte, augsta kristalizācijas pakāpe, tīklveida 3D nanomatricas struktūra, augsta biosaderība (Azeredo et al. 2019; Gorgieva and Trček 2019; Blanco Parte et al. 2020). Turklāt BC šķiedru struktūra var kalpot par kompozītmateriālu matricu, tādējādi palielinot tā noderīgas īpašības, piemēram, hidrofobitāti, elastību, paaugstināt mehānisko izturību, kā arī antibakteriālas, magnētiskas un vadītspējas īpašības, kas nepiemīt pašai BC (Ul-Islam et al. 2015).

Bakteriālās celulozes iegūšanas un tās producentu kultivācijas metodes

BC var iegūt, izmantojot statisko periodisko kultivāciju tai skaitā ar piebarošanu (angl. fed-batch) un dziļumfermentācijas metodi ar skābekļa pievadīšanu un maisīšanu, sintezējot bioreaktoros (Azeredo et al. 2019). Tālāk tiek īsi aplūkotas augstākminētās BC iegūšanas metodes.

Statiskā kultivācija – ar vai bez piebarošanas

Statiskā periodiskā kultivācija metode ir vienkāršākais kultivācijas process, kas visbiežāk tiek izmantots BC ražošanai salīdzinoši zemo izmaksu dēļ (Lin et al. 2020). BC sintezējošā kultūra tiek inokulēta traukā ar lielu virsmu, kur BC sintēze notiek uz barotnes virsmas, dēļ baktēriju ģenerētas CO_2 burbuļu inkorporācijas BC plēvē. Izmantojot šo kultivācijas metodi, BC plēves parasti pieņem trauka formu, kas tiek izmantots. Tas ir noderīgi, kad ir nepieciešams iegūt konkrētas formas BC plēves, piemēram, šāda pieeja tiek izmantota reģeneratīvajās medicīnas materiālu iegūšanai. Kultivācijas laiks parasti aizņem 5 – 20 dienas. Izmantojot statisko kultivācijas metodi, svarīgs faktors BC iznākumā ir barotnes virsmas / šķīduma tilpuma attiecība. Jo lielāka ir tā attiecība, jo efektīvāk tiek izmantota barotne, un lielāka BC plēve tiek sintezēta (Czaja et al. 2004; Lin et al. 2020).

Par galveno trūkumu statiskajai kultivācijas metodei var uzskatīt salīdzinoši ilgāku BC sintēzes laiku un zemu BC iznākumu, kas ierobežo šīs metodes izmantošanu industriālajos mērogos. Statiskajā kultūrā izveidojusies BC plēve var traucēt O_2 piekļuvei baktērijām, ka arī barības vielu daudzums barotnē tiek pakāpeniski izlietots, samazinot BC sintēzi (Dubey et al. 2018).
Lai palielinātu statiskas kultivācijas metodes efektivitāti, var izmantot piebarošanas kultivācijas metodi. Tā ir statiskās kultivācijas metodes modifikācija, kad pēc noteiktā kultivācijas laika kultūrai tiek pievienota papildus svaiga barotne. Parasti pēc līdzīga veida piebarošanas, veidojas jauns BC slānis. Pētījumi rāda, ka piebarošanas metode palīdz palielināt BC iznākumu YP/S no substrāta vienības 2 – 3 reizēs (Chen et al. 2013; Dubey et al. 2018).

Tiek izstrādāti dažādi bioreaktori, ar mērķi uzlabot statiskās kultivācijas metodi. Viens no šādiem bioreaktoriem ir aerosola bioreaktors. Šajā bioreaktorā augšanas barotne tiek izsmidzināta uz reaktora iekšējas virsmas (angl. distribution box), kam seko BC plēves sintēze un papildus barotnes pievienošana. Izmantojot šo metodi, ir iespējams iegūt līdz 9 g/L sausas BC dienā (Hornung et al. 2007). Tomēr, šīs metodes vēl nav komerciāli pieejamas un ir saistītas ar augstam ražošanas un ekspluatācijas izmaksām.

3. attēls. BC statiskās kultivācijas metodes: (A) statiskā periodiskā kultivācija; (B) periodiskā kultivācija ar piebarošanu (Dubey et al. 2018); (C) BC iegūšana, izmantojot aerosola bioreaktoru (Hornung et al. 2007).

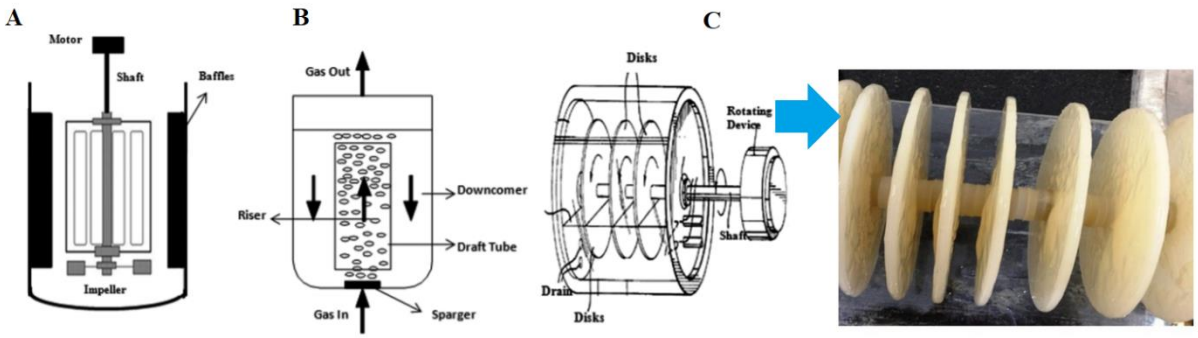
Kultīvēsana bioreaktoros ar maisīšanu un skābekļa pievadīšanu

Šīs metodes palīdz nodrošināt labāku O_2 piekļuvi baktērijām palielinot BC iznākumu no substrāta vienības, salīdzinot ar statisko periodisko kultivāciju (Blanco Parte et al. 2020). Papildus, izmantojot šo metodi ir iespējams iegūt dažāda veida BC, piemēram, hidrogēlus, ka arī dažāda izmēra lodīšu vai zvaigžņveida BC. Parasti BC struktūra ir atkarīga no rotācijas režīma (Sani and Dahman 2010).

Neskatoties uz to, ka BC sintēze parasti ir lielāka, kad tiek izmantota maisīšanas vai skābekļa / gaisa piespiedu pievadīšana, ar to ir saistīti vairāki trūkumi. Pirmais trūkums ir saistīts ar producenta potenciālu mutāciju varbūtības pieaugumu. Izmantojot šādas metodes, daļa producenta šūnu var zaudēt spēju sintezēt BC (BC negatīvo mutantu veidošanās), kas noved pie ievērojamiem zaudējumiem. Lai samazinātu BC-negatīvo mutantu rašanos, tika piedāvāts pievienot barotnei etanolu, kas samazina mutantu veidošanos (Toyosaki et al. 1995; Son et al. 2001). Otrais trūkums ir BC kristāliskuma un polimerizācijas pakāpes samazināšanās, salīdzinot ar statisko kultivāciju (Watanabe et al. 1998). Trešais trūkums ir ievērojami lielāks enerģijas patēriņš maisīšanai skābekļa / gaisa piespiedu pievadīšanai, salīdzinot ar statisko vai statisko piebarošanas kultivāciju, kas neprasa lielu enerģijas patēriņu (Chen et al. 2013).

Šīs metodes īstenojamas, izmantojot dažādas konstrukcijas bioreaktorus (Blanco Parte et al. 2020). Pašlaik eksistē vairāki bioreaktoru tipi, kas ir piemēroti BC sintēzei: bioreaktors ar maisītāju (angl. stirred-tank), gaisa pacelšanas (angl. airlift), rotācijas disku bioreaktors (Blanco Parte et al. 2020). Bioreaktorā ar maisīšanu O_2 tiek efektīvāk piegādāts baktērijām. Gaisa pacelšanas bioreaktorā O_2 piegāde tiek nodrošināta no reaktora apakšas, tam ceļoties uz augšu šūnām tiek pievadīts skābeklis. Process ir enerģētiski efektīvāks nekā bioreaktorā ar maisītāju (Sani and Dahman 2010).

Rotācijas disku bioreaktorā BC plēve veidojas uz speciāliem diskiem, kas ir iegremdēti barotnē. Neskatoties uz to, ka var panākt lielāku BC sintēzi, tehnoloģija rotācijas disku bioreaktoram joprojām atrodas prototipa līmenī (Soleimani et al. 2021). Līdzīgi kā ar aerosola bioreaktoru šo reaktoru galvenais trūkums ir salīdzinoši ir augstas konstrukcijas un ekspluatācijas izmaksas.



4. attēls. Bioreaktori ar maisīšanu skābekļa / gaisa piespiedu pievadīšanu (A) Bioreaktors ar maisītāju; (B) gaisa pacelšanas bioreaktors (C) BC veidošanas process rotācijas disku bioreaktorā (Sani and Dahman 2010; Soleimani et al. 2021).

Bakteriālās celulozes izmantošanas potenciāls

Iepriekš minēto fizikālo īpašību dēļ BC ir daudz potenciālu pielietojumu vairākās jomās, un to var izmantot, lai iegūtu augstas kvalitātes videi draudzīgus produktus. Plašākais BC pielietojums saskatāms pārtikas rūpniecībā, iepakošanas materiālos un biomedicīnā (Azeredo et al. 2019).

Pārtikas rūpniecība

Pārtikas rūpniecībā BC var izmantot kā funkcionalizētu pārklājumu produktiem, kas spēj palielināt to uzglabāšanas laiku, kā arī uztura bagātinātāju pacientiem ar kuņģa-zarnu trakta traucējumiem, aptaukošanos, sirds un asinsvadu slimībām un diabētu (Cho and Almeida; Shi et al. 2014). BC pārtikas pārklājumi ļautu ievērojami samazināt konservantu un citu ķīmisko savienojumu izmantošanu pārtikā (Rydz et al. 2018). Turklāt ir plaši zināms, ka diētas ar augstu tauku saturu var kaitēt cilvēku veselībai. Savukārt BC emulsijas var izmantot kā potenciālu tauku aizstājēju pārtikas produktos, piemēram, kūkās un saldējumā, nezaudējot taukvielām raksturīgās organoleptiskās un tehnoloģiskās funkcijas, vienlaicīgi samazinot produkta kaloritāti (Azeredo et al. 2019). Turklāt BC ir gremošanas trakta mikrobiotai draudzīgs produkts, kas uzlabo cilvēka imūnsistēmu, samazina iekaisuma procesus un holesterīna līmeni asinīs (Holscher 2017), tā ir "vispārēji atzīta par drošu" (angl. generally recognized as safe, GRAS statuss) (Shi et al. 2014). BC izmantošanas piemērs pārtikā ir Nata de Coco, ko tradicionāli iegūst, raudzējot kokosriekstu pienu ar EB un iegūstot BC saturošu želejveida produktu (Phong et al. 2017).

Iepakojumu materiāli

BC var izmantot arī iepakojuma materiālu sastāvā, kas būtu videi draudzīgi un biodegradējamai salīdzinājumā ar plastmasām, kuras joprojām galvenokārt tiek iegūtas no naftas produktiem, nav biodegradējamas un ir kaitīgs videi un cilvēkam (Proshad et al. 2017). Ņemot vērā BC mehāniskās īpašības, tā ir daudzsološa alternatīva videi draudzīgu, izturīgu iepakojuma materiālu ražošanai, un nākotnē tai ir potenciāls aizstāt fosilās izcelsmes plastmasas biodegradējamu iepakošanas kompozītmateriālu sastāvā.

Biomedicīna

BC ir plašs potenciāls pielietojums biomedicīnā: piemēram, funkcionalizētie brūču pārsienamie materiāli, mākslīga āda un asinsvadi, audu inženierijas matricas, nervu segumi, fasciju, saistaudu, kaulu un skrimšļu protezēšanā un ķirurģijā (Wan et al. 2011; Picheth et al. 2017). Jau ir zināms, ka brūču ārstēšanā BC plēves efektīvi nodrošina audu reģenerācijai labvēlīgus apstākļus (Gorgieva and Trček 2019). Šīm brūču apstrādes materiāliem var pievienot antibakteriālus līdzekļus, lai samazinātu infekcijas risku (Rouabhia et al. 2014). BC var apvienot ar dažāda veida zālēm un nodrošināt matricu kontrolētai zāļu pievadīšanai ievainojuma vietai (Pavaloiu et al. 2014; Ullah et al. 2016). Turklāt dažādas sintētiskās protēzes bieži nav bioloģiski saderīgas un var izraisīt organismā atgrūšanas reakcijas, turpretī uz protēzes uz BC bāzes ir bioloģiski saderīgas un veicina šūnu proliferāciju, asinsvadu veidošanu BC protēžu iekšpusē nodrošinot matricas funkciju, (Ul-Islam et al. 2015).

Citas nozares

Elektronikā dažādiem BC kompozītmateriāliem ir potenciāls būt par videi draudzīgam materiālam elastīgu ekrānu (Ummartyotin et al. 2011), gaismas diožu (Legnani et al. 2008), mitruma un gāzu sensoru (Hu et al. 2011) ražošanā. Elastīgās BC plēves ar magnetīta (Fe3O4) nanodaļiņām var izmantot magnētiskās rezonanses attēlu veidošanā (Ul-Islam et al. 2015).

Ir ziņots, ka kosmetoloģijā BC produkti jau tiek izmantoti kā sejas ādas kopšanas maskas, galvenokārt pateicoties tā spējai mitrināt ādu un netoksicitātei. Šādas maskas tiek izmantotas arī, lai mitrinātu pacienta ādu pirms operācijām (Ullah et al. 2016).

BC potenciāli var izmantot kā imobilizācijas platformu ķīmiskajā rūpniecībā. Eksperimenti rāda, ka BC izmantošana enzīmu imobilizācijai ļāva uzlabot rūpniecisko lipāžu īpašības salīdzinājumā ar brīvajām lipāzēm (Sheldon and van Pelt 2013). Ir ziņots, ka BC imobilizētās lipāzes uzrāda uzlabotu aktivitāti gan skābos, gan sārmainos apstākļos, kā arī augstāku aktivitāti temperatūrā līdz 30°C, ļaujot samazināt enerģijas patēriņu ražošanas procesos (Cai et al. 2018).

Turklāt BC var izmantot filtrācijas membrānās, lai nodrošinātu porainu grafēna oksīda tīklu, tās uzrāda labu mehānisko izturību, stabilitāti ūdenī un jonu caurlaidību, tādējādi ļaujot to atzīt par perspektīvām ūdens attīrīšanā (Fang et al. 2016).

Izaicinājumi bakteriālās celulozes iegūšanā un komercializācijā

Neskatoties uz visām BC pielietošanas priekšrocībām, tās rūpnieciskā ražošana joprojām ir problemātiska, kas kavē tās sekmīgu komercializāciju. Vairāki uzņēmumi ir mēģinājuši komercializēt BC, bet lielākoties mēģinājumi bija neveiksmīgi. Deviņdesmitajos gados daži Japānas uzņēmumi un Japānas Nacionālais institūts sadarbojās, lai izveidotu BC ražotni. Tomēr efektīvu fermentācijas sistēmu trūkuma dēļ BC komerciālā ražošana netika panākta. Turklāt Brazīlijas uzņēmums BioFill Produtos Bioetecnológicos izmantoja BC, lai veidotu dažādus biomedicīnas produktu prototipus. Tomēr BC iegūšana tika pārtraukta, jo pāreja uz liela mēroga ražošanu nebija veiksmīga (da Gama and Dourado 2018). Joprojām ir tikai daži BC komercializācijas mēģinājumi vainagojās panākumiem. Kā jau minēts iepriekš, Nata de Coco ir BC izmantošanas piemērs pārtikā, kas tiek īstenots kopš 1954. gada un ko raksturo diezgan lieli ražošanas apjomi, kaut arī samērā zems ieņēmumu līmenis un renabilitāte (Blanco Parte et al. 2020). Uzņēmums Jonsons & Jonsons 20. gadsimta 80. gados uzsāka mēģinājumu BC komercializēt plašā mērogā. Pētījumi galvenokārt tika veikti biomedicīnas jomā. Neskatoties uz vairāku patentu un BC produkcijas prototipu izgatavošanu, uzņēmums nesasniedza komerciālas ražošanas mērogu, iespējams, ražošanas procesu lielu kapitāla un ražošanas izmaksu dēļ. 1996. gadā Xylos Corporation ieguva tiesības izmantot šos patentus un 2001. – 2003. gadā tirgoja vairākus brūču apstrādes līdzekļus. 2012. gadā šo biznesu nopirka uzņēmums Lochmann & Rauscher, kas turpina BC produkta ražošanu līdz šai dienai. Polijas zinātnieki no Lodzas Tehniskās universitātes 2006. gadā publicēja rezultātus par BC pielietojumu dažādas pakāpes apdegumu klīniskajā ārstēšanā. Pēc kāda laika tehnoloģiju nopirka Polijas uzņēmums BOWIL Biotech Ltd., kas ir uzsācis BC brūču pārsiešanas materiālu un kosmētikas līdzekļu ražošanu, tirgojot tos ar tirdzniecības nosaukumu CELMAT® (da Gama un Dourado 2018).

Alternatīvie substrāti bakteriālās celulozes ražošanai

Kā jau minēts, BC izstrādājumu komercializāciju ir grūti panākt to samērā augstu ražošanas izmaksu dēļ. Viena no lielākajām problēmām ir standarta BC augšanas barotnes augstās izmaksas, kas var sasniegt līdz 30% no procesa ražošanas izmaksām (Rivas et al. 2004). Lai samazinātu ražošanas izmaksas, ir jāoptimizē ražošanas process un īpaši BC augšanas substrātu izmaksas. Viens no iespējamiem risinājumiem ir alternatīvu zemu izmaksu oglekļa avotu izmantošana barotnēs (Jozala et al. 2015; Lin et al. 2020). Tāpēc par perspektīviem tiek uzskatīti pētījumi par rūpniecības blakusproduktu un lauksaimniecības atlikumu izmantošanu BC ražošanā, piemēram, jēlglicerīns, kas paliek pāri biodīzeļdegvielas ražošanas procesos, augļu pārstrādes blakusprodukti, melases, un sūkalas (Jozala et al. 2015).

Tomēr ar alternatīvu un lētāku oglekļa avotu izmantošanu, ir saistīti vairāki ierobežojumi jo tas ietekmē ne tikai BC produktivitāti, bet arī tādas tās īpašības kā kristāliskums, O_2 un H_2O caurlaidība un polimerizācijas pakāpe. Turklāt augšanas barotnes prasības un BC produktivitāte ļoti variē starp EB sugām un celmiem (Jozala et al. 2015; Salari et al. 2019).

Sūkalas kā alternatīva izejviela biotehnoloģiskajos procesos

Ir atzīts, ka starp lauksaimniecības un rūpniecības blakusproduktiem, sūkalas ir vienas no problemātiskākajām ņemot vērā to ietekmi uz vidi, lielus apjomus un relatīvi mazās efektīvas valorizācijas iespējas (Zotta et al. 2020). Piena ražošana un pārstrāde visā pasaulē strauji pieaug, pārsniedzot 10% ik pēc četriem gadiem. Piena produktu pārstrādes laikā tikai 10 – 20% piena apjoma tiek pārveidoti par vēlamo gala produktu (siers, kazeīns, biezpiens, jogurts utt.) t.i. 80 – 90% sastāda sūkalas (Panghal et al. 2018). Pasaulē sūkalu apjomi gadā sasniedz aptuveni 180 – 190 × 106 tonnas (Baldasso et al. 2011). Sūkalu sausās masas lielāko daļu jeb 70% sastāda laktoze (kā arī, nelieli daudzumi glikozes, galaktozes, laktulozes un arabinozes). Piena sūkalu labi zināmu augsto bioloģisko vērtību attiecina uz olbaltumvielu (galvenokārt albumīnu un globulīnu), aminoskābju, vitamīnu (B_6 un B_{12}), pienskābes un citronskābju, minerālu, piemēram, kalcija, magnija, fosfora saturu, kā arī citi nenozīmīgi bioloģiski aktīvi savienojumu klātbūtni (Revin et al. 2018). No visiem piena rūpniecības blakusproduktiem sūkalas rada vislielāko vides piesārņojumu (Prazeres et al. 2012). Sūkalu galvenā problēma ir tā, ka tikai aptuveni 50% no šī blakusprodukta tiek atbilstoši utilizēti vai pārstrādāti, bet pārējie tiek uzskatīti par atkritumiem, jo trūkst efektīvu turpmāko pārstrādes tehnoloģiju. Sūkalas rada lielu organisko slodzi, tāpēc tai ir nopietna piesārņojuma ietekme uz vidi un jo īpaši uz ūdeņiem. Sūkalām ir raksturīgs liels bioķīmiskā skābekļa patēriņš un ķīmiskā skābekļa patēriņš – attiecīgi 27 − 60 kg/m^3 un 50 − 102 kg/m^3. Tas liecina par sūkalu augstu noturību pret oksidēšanos jeb noārdīšanos bioloģisko vai ķīmisko oksidējošo aģentu (O2 − ekvivalenti) iedarbībā (Panghal et al. 2018). To nosaka lielā organisko vielu, īpaši laktozes (39 – 60 kg/m3) koncentrācija, kurus noārdīšanās ir apgrūtināta, rezultātā radot nopietnas problēmas gan piena rūpniecībai, gan ārējai videi.

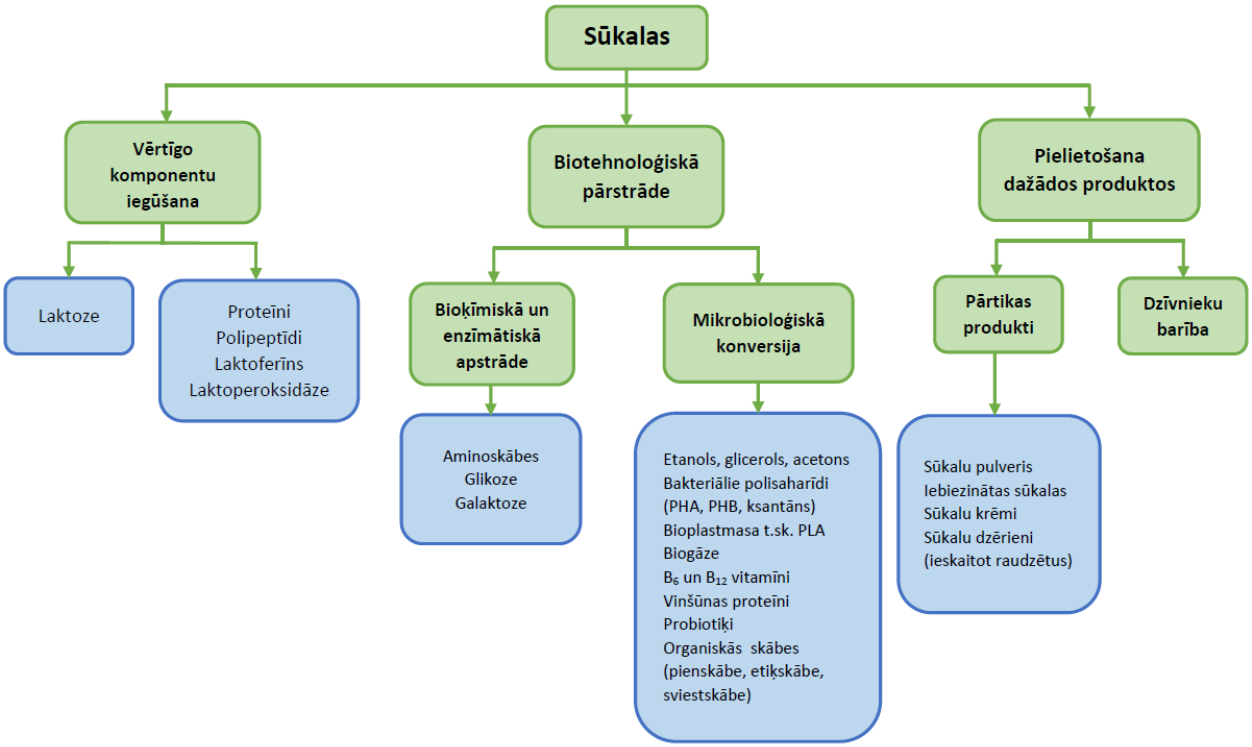
Izšķir divu veidu sūkalas (2. tabula): saldpiena un skābpiena. Saldpiena sūkalas ar pH 5,6 – 6,3 rodas siera ražošanas procesā, ja tiek izmantoti piena recināšanas fermenti, piemēram, himozīns vai pepsīns. Savukārt skābpiena sūkalas ar pH 4,4 – 4,6 atdalās skābpiena sieru un biezpiena ražošanā, kad pienu sarecina ar pienskābi, kas veidojas, pienskābes baktērijām pārraudzējot laktozi (Kaur et al. 2020).

2. tabula

Saldpiena un skābpiena sūkalu salīdzinājums (Kaur et al. 2020).

Sastāvs	Saldpiena sūkalas (siera sūkalas), g/L	Skābpiena sūkalas, g/L
Kopējā sausna	63 – 70	63 – 70
Laktoze	46 – 52	44 – 46
Proteīni	6 – 10	6 – 8
Laktāti	2	6,4
Kalcijs	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fosfāti	1 – 3	2 – 4,5
Hlorīdi	1,1	1,1
pH	6 – 7	<5

Pēdējās desmitgadēs tika veikti vairāki pētījumi ar mērķi atrast jaunas sūkalu valorizācijas metodes un samazinātu sūkalu piesārņojošo iedarbību uz apkārtējo vidi (Koutinas et al. 2009). Sūkalas satur cukuru, kas padara to piemērotu dažādu biotehnoloģisko produktu rūpnieciskai ražošanai (Prazeres et al. 2012). Sūkalu valorizācijai ir vairākas mūsdienīgas pieejas, kas apkopotas 5. attēlā. Papildus 5. attēlā minētajiem pielietojumiem ilgtspējīgu risinājumu sūkalu valorizācijai var sniegt, izmatojot to kā lētu fermentācijas vidi daudzveidīgu biopolimēru un citu bioaktīvu savienojumu ražošanai (Zotta et al. 2020), ieskaitot arī BC.



5. attēls. Sūkalu valorizācijas mūsdienīgas iespējas (Semjonovs et al 2021).

Sūkalas kā substrāts bakteriālās celulozes iegūšanai

Šobrīd joprojām ir salīdzinoši maz pētījumu, kuros sūkalas tika novērtētas kā BC ražošanas substrāts. Pētījumā *Gluconabacter sucrofermentans* B-11267 celms tika izmantots, lai novērtētu sūkalas kā alternatīvu substrātu BC iegūšanai (Revin et al. 2018). Eksperimenti paradīja, ka *G. sucrofermentans* uz sūkalām sintezēja 5,45 g/L BC (sausais svars), kas ir vairāk, salīdzinot ar BC sintēzi uz standarta HS barotnes (2,14 g/L). Produkta maksimālais veidošanās ātrums notika fermentācijas procesa pirmajā dienā. Šajā laikā laktozes daudzums samazinājās no 42,1 g/L līdz 22,4 g/L, norādot, ka šis celms varēja izmantot laktozi kā oglekļa avotu. Šajā pētījumā tika parādīts, ka sūkalas ir samērā labs alternatīvs oglekļa avots, pateicoties galvenokārt celma spējas hidrolizēt laktozi. Tomēr pēc audzēšanas sūkalās tika novērotas izmaiņas BC mikromorfoloģijā un kristāliskumā, salīdzinot ar iegūtu standarta HS barotnē. Izmantojot elektronmikroskopiju, tika noteikts, ka BC mikrofibrilu platums ir 60 – 90 nm un 100 – 180 nm – uz HS standarta barotnes un sūkalām, attiecīgi. Tika konstatēts, ka kristāliskuma indekss BC iegūtai uz sūkalām bija zemāks (50,2%) nekā HS (79,9%) barotnē, tādējādi domājams, ka samazinot arī tās mehānisko izturību un padarot to mazāk piemērotu izmantošanai tādos izstrādājumos, kur šis īpašības ir kvalitāti noteicošas. Tomēr vienlaicīgi tika arī parādīts, ka audzēšana sūkalās neietekmē BC ķīmisko struktūru (Revin et al. 2018). Ir jāsecina, ka BC augšanas barotnes mainīšana, izmantojot alternatīvus C substrātus, piemēram, sūkalas, ražošanas procesa laikā var izraisīt BC mikrostruktūras izmaiņas, tādējādi ietekmējot vēlamā galaprodukta fizikālās un mehāniskās īpašības (piemēram, kristāliskuma indeksu, polimerizācijas pakāpi, molekulmasu, ūdens noturības spēju, skābekļa un ūdens caurlaidības ātrumu) (Jozala et al. 2015; Gorgieva and Trček 2019).

Citā pētījumā tika salīdzināts BC iznākums *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582 celmam, piena sūkalās salīdzinājumā ar standarta HS barotni, kā arī ar barotnēm, kas satur citus alternatīvus substrātus, piemēram, bojātus augļus, ka arī bojātus augļus un sūkalu maisījumus dažādās proporcijās. Eksperimenti parādīja, ka, izmantojot sūkalu barotni, tika iegūts zemāks BC sausais svars (25 mg/ml, slapjais svars), salīdzinot ar standarta HS barotni (30,8 mg/ml) un attiecīgi bojāto augļu barotni (60,2 mg/mL). Tika uzsvērts, ka *G. xylinus* ATCC 53582 vislabāk metabolizē monosaharīdus, piemēram, fruktozi un glikozi. Tika konstatēts, ka šādas jauktās barotnes nav efektīvākas, salīdzinot ar bojātu augļu substrātu bez sūkalu klātbūtnes, tādējādi sūkalām bija konstatēta negatīva ietekme uz BC sintēzi, ko gan varētu skaidrot arī ar citiem faktoriem (piem. ūdens aktivitāti, inhibitoru klātbūtni u.c., kas pētījumā netika aplūkoti). Kā jau iepriekš minēts, galvenais C avots sūkalās ir laktoze, kas ir disaharīds un nav viegli metabolizējams *G. xylinus* (Jozala et al. 2015) un citām EB kultūras.

Dažos pētījumos tika novērots, ka sūkalu un laktozi saturošu barotņu izmantošana bija saistīta ar salīdzinoši zemu BC produkciju. Vienā pētījumā tika konstatēts, ka *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 neefektīvi metabolizēja laktozi. Baktērijas spēja iegūt tikai 1,6 g/L BC, audzējot laktozē, savukārt, audzējot saharozē, tā spēja saražot 4,9 g/L BC (Tsouko et al. 2015). Citā pētījumā *Acetobacter xylinum* spēja sintezēt 1,62 g/L BC, audzējot uz laktozes. Salīdzinājumam – šis celms sasniedza maksimālo BC produkciju uz fruktozes 7,38 g/L (Embuscado et al. 1994).

Pārējie pētījumi rāda, ka laktoze nenodrošina ievērojamu BC sintēzi. Ir parādīts, ka siera sūkalu permeāts nenodrošina *Acetobacter xylinum* 10821 un *Acetobacter xylinum* 23700 BC sintēzi ievērojamu (Thompson and Hamilton 2000). Cits pētījums parādīja zemu BC sintēzes līmeni *Gluconacetobacter sacchari*, kas izolēts no tējas sēnes dzēriena, uz HS barotnēm kas modificētas aizstājot glikozi ar laktozi (0,31 g/L) un siera sūkalu barotnē bez papildu piedevām (0,08 g/L). BC sintēzes līmeņi bija zemāki salīdzinājumā ar standarta HS barotnēm pēc 96 h kultivēšanas, kur tika sasniegti 2,7 g/L (Carreira et al. 2011). Līdzīgi, cits pētījums parādīja, ka Gluconacetobacter xylinus K3 sintezēja vien 0,07 g/L sausas BC uz laktozes (Nguyen et al. 2008). Turklāt citā pētījumā tika konstatēts, ka G. xylinus ATCC 53524 sasniedza 0,09 g/L BC produkciju uz galaktozes (Mikkelsen et al. 2009). Minimālā BC klātbūtne laktozes un sūkalu saturošā barotnē citā pētījumā tika attiecināta uz sējmateriāla paliekām vai brīvās glikozes izdalīšanos laktozes hidrolīzes ietekmē (Carreira et al. 2011). Zemu BC produkciju sūkalās vai laktozi saturošā barotnē var izraisīt *lac*Z gēna trūkums, kas ir atbildīgs par β-galaktozidāzes enzīmu, kas nodrošina laktozes hidrolīzi glikozes un galaktozes monomēros (Thompson un Hamilton 2001; Battad-Bernardo et al. 2004).

Kā risinājums tika ierosināta rekombinantā EB celma izveide, kas spētu hidrolizēt laktozi un sintezēt BC. Ievietojot *lac*Z gēnu (kodē β-galaktozidāzi), tika izveidots *Acetobacter xylinum* rekombinantais celms, tādējādi padarot par iespējamu laktozes hidrolīzi (Battad-Bernardo et al. 2004). Šīs gēns kodē vienu no trim fermentiem, kas atbild par Escherichia coli spēju metabolizēt laktozi. Konstruētais vektors mini-Tn10:lacZ:kan tika ievietots A. xylinus savvaļas tipa celmā ar nejaušās transpozona mutaģenēzes ceļā, tādējādi izveidojot celmu ar spēju patērēt laktozi un sintezēt BC, iegūstot to sintezējošo celmu *A. xylinus* ITz3. Konstatēts, ka *lac*Z gēns tika ievietots baktērijas hromosomā. Celms saglabāja hromosomā ievietota gēna stabilitāti neselektīvā barotnē pēc vairāk nekā 60 paaudzēm. Mutantu celms 1,82 g/L sintezēja BC sūkalu substrātā, kas nozīmē 28 reizes lielāku BC produkcijas pieaugumu, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu (Battad-Bernardo et al. 2004). Neskatoties uz to, BC iznākums joprojām nebija pietiekami liels, lai ieviestu šo celmu komerciālā BC ražošanā.

Cita pieeja BC sintēzes efektivizēšanai ir varētu būt sūkalu sākotnējā hidrolītiskā apstrāde. To var panākt ar divām metodēm: enzimātisku hidrolīzi, pievienojot β-galaktozidāzes fermentu laktozi saturošai barotnei, vai skābu hidrolīzi, ko var panākt, pievienojot skābi enzīma vietā (Amaro et al. 2019) un vēlāk barotni neitralizējot līdz kultūrai optimālajam līmenim. Enzimātiskās pirmsapstrādes lietderīgums tika pārbaudīts izmatojot β-galaktozidāzi sūkalu hidrolītiskajai apstrādei. Rezultāti parādīja, ka šāda siera sūkalu enzimātiskā pirmsapstrāde uzlaboja G. xylinus PTCC 1734 BC sintēzi līdz 3,55 g/L, kas, pēc autoru konstatējuma, bija būtiski augstāka par neapstrādātām sūkalām un augstāka par standarta barotnē HS barotnē (3,2 g/L) sasniegto (Salari et al. 2019). Cits pētījums apskata BC iegūšanu uz sūkalu permeāta, izmantojot β-galaktozidāzes enzīmu. Šajā pētījumā *Komagataeibacter xylinus* DSM 2325 sintezēja 6,77 g/L BC uz enzimātiski apstrādātā sūkalu permiāta (Rollini et al. 2020). Tomēr, neraugoties uz efektivitāti, enzimātiskā pirmsapstrāde ievērojami palielina ražošanas izmaksas (Amaro et al. 2019). Turklāt tika novērotas izmaiņas BC mikrostruktūrā, salīdzinot ar standarta barotnēm, tā, BC kristāliskuma indekss uz sūkalām bija 61,86%, kas ir būtiski zemāks par konstatētu BC kristaliskuma indeksu no enzimātiski neapstrādātās standarta HS barotnes (79,07%) (Salari et al. 2019).

Ābolu pārstrādes produktu izmantošana

Āboli ir viens no pasaulē visplašāk kultivētajiem un patērētajiem augļiem (Tsao 2016 cit. pēc Jaeger et al. 2018). Tas ir otrs visvairāk iegūtais auglis pasaulē, kopā sasniedzot 84 miljonus tonnu 2014.gadā (Bandyopadhyay et al. 2018). Izmantojot ābolus sulas ražošanai, paliek pāri atkritumvielas, kā augļu sēklas, mizas un citas cietās daļas, kas veido apmēram 25 – 35 % no svaiga ābola svara. Šie sulas spiešanas procesā radītie pārpalikumi ir bagāti ar ogļhidrātiem un minerālvielām, tie satur augu celulozi, kuru var hidrolizēt līdz glikozei, izmantojot tālākajā BC sintēzē kā oglekļa avotu (Zhang et al. 2019).

Ābolu sula ir cukuru, oligosaharīdu un polisaharīdu (piemēram, cietes) maisījums (Jarvis et al. 2003). Ābolu sula sastāv aptuveni no 88% ūdens, bet pārējās šķīstošās cietvielas sulas saturā sastāv aptuveni no 98% ogļhidrātu. Galvenie ogļhidrāti ir fruktoze, glikoze un saharoze, kuru aptuvenā attiecība ir 6:3:2 (Wosiacki et al. 2007). Šo cukuru daudzumu attiecību sulā var

ietekmēt tās uzglabāšanas ilgums, jo vienā no pētījumiem pēc sešiem mēnešiem saharozes koncentrācija samazinājās, bet glikozes un fruktozes koncentrācija palielinājās, kas notika hidrolīzes rezultātā. Ābolu sulā nelielā koncentrācijā ir arī K, P, Ca, Na un citi elementi (Mattick and Moyer 1983). Ābolskābe jeb 2-hidroksibutāndiskābe ir viena no galvenajām organiskajām skābēm ābolu sulā. Galvenās aminoskābes svaigā ābolu sulā ir glutamīnskābe, leicīns un alanīns, kas kopā veido 35% no kopējā aminoskābju satura (Zuo et al. 2019). Tomēr jāņem vērā, ka ābolu sulas ķīmiskais sastāvs ir atkarīgs no to šķirnes, audzēšanas reģiona, klimata, augļa gatavības stāvokļa un citiem faktoriem.

6. attēls. Pētījumu ietvaros izmantotie zemas kvalitātes āboli.

Tikai daži pētījumi ir veikti saistībā ar ābolu sulas kā barotnes izmantošanu BC iegūšanai. Vienā no pētījumiem *Acetobacter xylinum* NBRC 13693 BC sintēzi izvērtēja uz neapstrādātas un modificētas ābolu sulas. Iegūtais BC sausais svars ar nemodificētu ābolu sulu bija 0,15 g/L, toties BC sintēze uz modificētas ābolu sulas barotnes (peptons 20 g/L, rauga ekstrakts 5 g/L, citronskābe 1,2 g/L) bija daudz labāka – 3,85 g/L pēc 14 dienu inkubācijas. Šis pētījums parādīja, ka ābolu sula var tikt izmantota, kā efektīvs C avots BC ieguvei, ja tiek pievienoti papildus N avoti sākotnējai barotnei (Kurosumi et al. 2009). Citā pētījumā izmantoja *Gluconobacter xylinum* CCM 3611T, lai izvērtētu BC sintēzi uz ābolu sulas. Ar nemodificēto ābolu sulas barotni tika iegūts 0,2 g/L BC sausā svara, bet modificētajā barotnē, kurai tika pievienots amonija sulfāts 8 g/L, dikālija fosfāts 2 g/L, saharoze 20 g/L, etiķskābe 5 mL/L, tika iegūti 0,4 g/L BC sausā svara. Ābolu sulas barotnē ar 10 mL/L etanola tika iegūts 0,3 g/L BC sausās masas (Bandyopadhyay et al. 2018).

Tika veikti arī mēģinājumi izmantot ābolu spiešanas procesā radītos pārpalikumus kā substrātu BC sintēzei (Urbina et al. 2017; Zhang et al. 2020). Vienā no pētījumiem ābolu izspaidas tika sajauktas ar cukurniedrēm un tika konstatēts, ka maisījums ir potenciāls C avots *Gluconacetobacter medellinensis* ID13488, jo tika novērota augstāka BC sintēze (2,5 ± 0,3 g/L), salīdzinot ar standarta HS barotni (1,8 ± 0,6 g/L). Tomēr BC sintēze uz nemodificētām ābolu izspaidām bija tikai 0,36 ± 0,01 g/L. Citā pētījumā tika izmantots neprecizēts *Gluconacetobacter xylinus* celms BC sintēzes izvērtēšanai uz iepriekš enzimātiski apstrādātas ābolu izspaidu barotnes. BC sausais svars sasniedza 7,19 ± 0,20 g/L (Zhang et al. 2020).

Neskatoties uz zemo BC sintēzi, izmantojot nemodificētu ābolu sulas barotni, tā var tikt izmantota kā lēts C avots. Galvenais ābolu sulas trūkums ir N nepietiekamība barotnē (Kurosumi et al. 2009). Tomēr kombinējot ābolu sulu ar lētu N avotu, ar to var potenciāli iegūt augstu BC sintēzi un būtiski samazināt kopējās ražošanas izmaksas.

Melases izmantošana bakteriālās celulozes iegūšanai

Melase – tumšbrūns, sīrupveida šķidrums – cukura ražošanas blakusprodukts. Atkarībā no pārtikas cukura ražošanai lietotās izejvielas pasaules tirgū ir sastopama cukurbiešu, cukurniedru, palmu, citrusu un citi melases veidi. Melase satur galvenokārt saharozi, bet nelielos daudzumos arī glikozi un fruktozi. Melases sastāvā ir arī dažādi mikroelementi, kā magnijs (Mg), kālijs (K), kalcijs (Ca) un nātrijs (Na). Melases ķīmisko sastāvu var ietekmēt dažādi mainīgie faktori izejvielu augšanas laikā, kā augsnes kvalitāte, audzēšanas klimatiskie apstākļi, pielietotie pesticīdi un minerālmēsli, ražas novākšanas laiks, izejvielu pārstrādes tehnoloģisko procesu nianses, melases uzglabāšana un pārstrādes apstākļi (Kārkliņš u.c. 2002).

Lauksaimniecībā melase tiek izmantota kā ogļhidrātu piedeva lopbarībai. Melases pievienošana lopbarībai uzlabo dzīvniekiem dotās barības (salmu, siena, pelavu) apēdamību un kalpo kā lielisks ogļhidrātu avots lauksaimniecības dzīvniekiem

ziemas mēnešos vai ganību sākumā. Šāds melases izmantošanas veids palīdz samazināt lopbarības izmaksas un tās negatīvo ietekmi uz apkārtējo vidi (Ma et al. 2021; Kārkliņš u.c. 2002).

Melase arī var tikt izmantota kā izejviela biometāna ražošanā anaerobiskos reaktoros. Pētījumā tika pierādīts, ka melases izmantošana biometāna ražošanai ir efektīva (Rodrigues et al. 2021). Melasi kā izejvielu izmanto eksopolisaharīdu ieguvei. Pētījumā melase tika izmantota kā lētāks fermentācijas substrāts, lai iegūtu eksopolisaharīdus no *Bacillus licheniformis* (Asgher et al. 2021). Melasi var izmantot arī etanola ražošanas procesaā. Priekšrocības šajā procesā melasei ir kā cukura ražošanas blakusproduktam un lētam atjaunojamajam dabas resursam (Ergun and Ferda Mutlu 2000).

Lielākoties pētījumos par etiķskābes baktēriju, tostarp BC sintezējošo biotehnoloģiju, melase tiek izmantota kā piedeva vai aizstājēja glikozei jau esošajā standarta Hestrin-Schramm (HS) barotnē (Machado et al. 2018). Veiktā pētījumā melase tika izmantota kā glikozes, kas ir galvenais C avots barotnē, aizstājējs standarta HS barotnē. Pakāpeniski palielinot melases daudzumu un proporcionāli samazinot glikozes daudzumu, pie maksimālās melases un minimālās glikozes koncentrācijas, barotnes izmaksas tika samazinātas par 20%, salīdzinot ar standarta HS (Machado et al. 2018).

7. attēls. Pētījumu ietvaros izstrādātas melases barotnes.

Citā pētījumā glikoze tika proporcionāli aizstāta ar melasi standarta HS barotnē. BC sintēzi veicot ievietojot augšanas kolbas kratītājā, lielākais BC iznākums tika panākts pie glikozes koncentrācijas 0 g/L un melases koncentrācijas 20 g/L. Kā arī tika noskaidrots, ka melases izmantošana, lai aizstātu glikozi standarta HS barotnē būtiski nesamazināja BC izturību. Kristāliskuma indekss HS barotnē ar glikozi bija 88%, bet HS barotnē ar melasi - 84% (Keshk et al. 2006)

Vēl vienā pētījumā tika noteikta optimālā augšanas temperatūra un pH vērtība melasi saturošā barotnē, lai iegūtu iespējami lielāko BC iznākumu. Kā kontrole tika izmantota standarta HS barotne. Tika noskaidrots, ka optimālā augšanas temperatūra melasi saturošai barotnei ir 30°C un optimālais sākuma pH 6,5, kas ir augstāks nekā standarta HS barotnē – pH 6,0 (Esin Poyrazoğlu Çoban 2011).

Nesenā pētījumā tika veikta BC sintēze uz standarta HS un tīras melases barotnes. Pētījumā tika noskaidrots, ka piecas dienas statiskās kultivācijas metodē audzētas BC plēves svars uz melases barotnes pārsniedz divas reizes iegūto svaru, audzējot uz standarta HS. Respektīvi uz melases 2,9 ± 0,1 g/L un uz standarta HS 1,6 ± 0,1 g/L. Kā arī tika novērots, ka kristāliskums uz melases iegūtajai BC ir lielāks nekā uz standarta HS, respektīvi 83,02% un 79,7% (Revin et al. 2021).

Citā pētījumā, zinot, ka melase ir labs C avots, bet tai trūkst N, kas ir nepieciešams baktēriju augšanai, tika pievienots kukurūzas ekstrakts (KE) (angl. corn steep liquor (CSL)). KE palielināja iegūto BC svaru. Respektīvi uz neapstrādātas melases BC svars bija 1,51 ± 0,02 g/L un uz melases ar KE piedevu - 3,12 ± 0,03 g/L (Jung et al. 2010).

Kukurūzas ekstrakts kā alternatīva izejviela biotehnoloģiskajos procesos

KE var tikt izmantots kā piedeva mikrobioloģiskajos augšanas substrātos. Tas satur dažādas aminoskābes, kur metionīns ir pats nozīmīgākais. Metionīns darbojas kā veicinošs faktors augšanas fāzes sākuma stadijā un samazina arī *lag* fāzi (Matsuoka et al. 1996). KE piemīt buferējošas īpašības, kas palīdz noturēt augšanas barotnes optimālu un nemainīgu pH, kas daudzām baktērijām ir svarīgi, jo pH pazeminināšanās samazina daudzu baktēriju produktivitāti. Lai spētu iegūt augstāko iespējamo produktivitāti, nepieciešams noturēt pēc iespējas nemainīgāku baktēriju optimālo pH līmeni (Noro et al. 2004). KE sastāvs var atšķirties no

izgatavošanas partijas, līdz ar to tas var ietekmēt tā izmantošanas procesa gala iznākumu (Noro et al. 2004). KE var tik izmantots kā jēru piebarošanas substrāts. Tas satur daudzas dažādas jēru piebarošanas procesam nepieciešamas vielas, kā augstu proteīnu un enerģijas sastāvu. Bet ne tikai šo īpašību dēļ tas ir labs priekš jēru nobarošanas, KE sastāvā ir daudzi minerāli un B grupas vitamīni, kas ir nepieciešami dzīvniekiem (Azizi-Shotorkhoft et al. 2016).

KE tiek izmantots biosurfaktantu iegūšanai ar dažādu baktēriju palīdzību. KE izmantošana biosurfaktantu iegūšanai, tāpat kā daudzās citās jomās, saistās ar tā zemajām izmaksām, kas līdz ar to ar samazina fermentācijas barotnes izdevumus. Biosurfaktantu iegūšanā KE kalpo kā piedeva fermentācijas barotnē vai kā pilnīgs aizstājējs sintētiskai fermentācijas barotnei (Santos et al. 2013; Gudiña et al. 2015).

Etanola ražošanā, lai samazinātu ražošanas izmaksas, tiek aizstāts dārgāks rauga ekstrakts ar lētāku KE. Tāpat kā rauga ekstras, KE etanola fermentācijas barotnē darbojas kā N un augšanas faktoru avots. Ir veikti pētījumi un novērtos, ka, izmantojot KE kā N un augšanas faktoru avotu, palielinās iegūtais etanola apjoms (Maddipati et al. 2011). KE izmantošana kā N piedeva BC sintēzē nav plaši izpētīta. KE izmantošana jau esošajā standarta HS barotnē spēj aizstāt tādus N un augšanas faktoru avotus, kā rauga ekstraktu un peptonu.

Kā jau augstāk minēts, KE piemīt buferējošas īpašības. Tā izmantošana standarta HS barotnē nodrošina baktērijām optimālo augšanas pH, tādējādi aizkavējot vides paskābināšanos un BC sintēzes samazināšanos. Kā arī KE izmantošana augšanas barotnē pH stabilizēšanas nolūkos spēja sasniegt tādus pašus rezultātus kā pH kontrole ar sensoru vai pH kontrole manuāli (Noro et al. 2004).

Citā pētījumā KE tika izmantots kā N piedeva alternatīvam C avotam kā augšanas barotnei. Šajā pētījumā kā alternatīvie C avoti tika izmantoti jēlglicerīns no biodīzeļdegvielas ražošanas un vīnogu izspiedas no vīna ražošanas. Pievienojot šiem C avotiem KE kā N avotu, tika iegūti labi BC sintēzes rezultāti. Sintezējot BC ar KE piedevu uz jēlglicerīna 10 g/L un uz vīnogu izspiedām 8 g/L (Vazquez et al. 2013).

Ir veikti pētījumi par standarta HS barotnes C un/vai N avotu nomaiņu uz alternatīvajiem. Kā alternatīvie C avoti tika izmantoti melase, acilēta glikoze un veļas mazgātavas notekūdeņi. Kā N avoti tika izmantots KE, rauga ekstrakts un peptons. Labākais rezultāts tika panākts standarta HS barotnē, aizstājot rauga ekstraktu un peptonu ar KE 5,80 ± 0,5 g/L. Otrs labākais iegūtais rezultāts bija standarta HS, aizstājot glikozi ar melasi un rauga ekstraktu un peptonu ar KE 0,90 ± 0,6 g/L (Costa et al. 2017).

LEVĀNS

Ievads

Mikrobioloģiskās izcelsmes levānu sintezē vairākas mikroorganismu sugas (*Bacillus subtilis, B. polimiksa, Aerobacter levanicum, Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp. un *Corynebacterium laevaniformans, Lactobacillus reuteri*). Jāpiebilst, ka visas iepriekšminētās mikroorganismu sugas spēj sintezēt biopolimērus, tomēr konkrētais biopolimēru iznākums ir atkarīgs no izmantotās mikroorganismu sugas un celma. Piemēram, *S. salivarius* vairāki celmi producē enzīmu fruktozes transferāzi (FTF) no kura tālāk jau tiek sintezēts levāns. Literatūrā ir minēti trīs *S. salivarius* sugas celmi -YU10, SS2 un K12 (Abdelahhad, Koshy Philip 2014; Simms et. al. 1990). Pazīstamākais fruktozes transferāzes producenta celms ir *S. salivarius* K12 (Hill et. al. 2019), turklāt vienlaicīgi tas sintezē vēl arī citu vielu bakteriocīnu, kas pieder pie lantibiotikām (http://www.rsc.org/suppdata/c9/cy/c9cy00135b/c9cy00135b1.pdf).

Lantibiotikas ir tādas vielas, ko sintezē daži baktēriju celmi un kam piemīt terapeitiskais efekts infekcijas slimību ārstēšanā. Arī Latvijas aptiekās ir atrodams preparāts (Faringo Pro) kakla infekciju ārstēšanai, kurā pamatā ir *S. salivarius* K12 baktēriju celms. Vienā no publikācijām rakstīts, ka *S. salivarius* K12 producē lielmolekulāro levānu. To molekulāra masa ir 104,2 kDa, savukārt levānam sintezētam ar L. plantarum tikai 27,0 kDa (Hill et. al. 2019). Par konkrēto *Lactobacillus* baktēriju celmu spēju sintezēt levānu šobrīd ir maz informācijas un viennozīmīgi pateikt tieši kuri celmi producē vairāk būs grūti. Pētījumā par L. reuteri spēju producēt levānu no 182 celmiem tika identificēts viens L. reuteri 121 celms (van Hijum et. al. 2001). Arī citos pētījumos minēts, ka levānu producē tieši L. reuteri celms 121 (van Hijum et. al. 2002; Kralj et. al. 2002; Ozimek et. al. 2004; Ozimek et. al. 2006). Zinātniskajā literatūrā minēts, ka levānu spēj sintezēt vairāk nekā 32 dažādu baktēriju sugu (Hill et. al. 2019) un tieši mikroorganismu celmam ir noteicošā loma levāna gan iznākumam, gan kvalitātei. Molmasa variē atkarībā no izmantotā baktēriju celma. Piemēram, *L. plantarum* (celms nav nosaukts) spēj producēt levānu ar molekulāro masu 27,0 kDa, savukārt *L. plantarum* 16 sintezē levānu ar molmasu 93,7 kDa (Hill et. al. 2019). Jāatzīmē, ka iepriekš izpētītajā literatūrā nebija atrasti avoti, kur pieminēts, ka *Lactobacillus plantarum* tiek izmantots levāna sintēzei (izņēmums ir tikai iepriekš minētais raksts). Vienā no pētījumiem levāna (fruktāna) sintēzei izmantoti divi *L. reuteri* celmi, proti TMW1.106, LTH5448, kuri tika pakļauti agresīviem apstākļiem fermentācijas laikā (nepiemērota augšanas temperatūra +45º C) ar mērķi noteikt šo baktēriju spēju sintezēt fruktānu liela stresa apstākļos (Schwab et. al. 2006). Tomēr hipotēze neattaisnojās un lielāks fruktāna iznākums netika sasniegts. Fruktāna iznākums fermentācijas beigās svārstījās diapazonā no 0,2 līdz 0,7 g uz litru, kas ir ļoti mazs (Schwab et. al. 2006).

Levāns, ko sintezē baktērija *Bacillus licheniformis,* nav viskozs un slikti šķīst ūdenī. Pat ja levāna koncentrācija 18 g litrā ūdenī, šķidruma viskozitāte ir līdzīga un nemainās (Ghaly et al., 2007). Levānam piemīt antimikrobiāla aktivitāte. Klīniski pieradīts, ka levāns efektīvi cīnās ar infekcijām agrīnās stadijās (ja ir brūce dziedē, un aizsargā to) (Li et al., 2006). Levāna pielietojumus ir plašs un daudzveidīgs. Pateicoties izcilām hidroskopiskām un oleoskopīskām īpašībām, biopolimēru var izmantot pārtikas produktu ražošana kā emulgatoru un stabilizatoru. Laba adhēzija pie pārtikas produktu virsmām ļauj levānu izmantot kā ēdamo pārklājumu, piemēram, augļu un ogu derīguma termiņa paildzināšanai un kvalitātes saglabāšanai.

Medicīnā levānu izmanto kā pildvielu/saistvielu asins plazmā, bet farmācijā aktīvo vielu stabilitātes uzlabošanai pret apkārtējas vides un kuņģa nelabvēlīgiem faktoriem. Levānu arī var izmantot kā līmi. Var ražot izturīgas plēves, sajaucot levānu ar etilcelulozi (E462) (Barone un Medynets, 2007).

Pateicoties zemai viskozitātei, labai šķīdībai ūdenī, kā arī izcilai izturībai pret skābēm, levāns droši var aizstāt dekstrānu, jo minimāli ietekmē galaprodukta sensorās īpašības (garšu, smaržu, struktūru/konsistenci). Biopolimēram piemīt audzēju šūnu inhibējošā aktivitāte. Lielmolekulāro levānu var uzskatīt par imūnmodulatoru, jo tas spēj ietekmēt makrofāgu (asinsšūnu) attīstību (Leibovici, 1984). Levāns potenciāli izmantojams kosmētikas rūpniecībā kā biezinātājs, iekapsulēšanas aģents un antimikrobiāls līdzeklis (Han, 1990). Tam piemīt mitrinošs efekts. Tam ir arī pretiekaisuma iedarbība, it īpaši pret ādas kairinātājiem (Kim et al., 2005). To var izmantot, kā vienu no sastāvdaļām personīgās higiēnas līdzekļos, jo tas veido spēcīgas virsmas aktīvās vielas. Ar 1% levānu var apstrādāt brūces, tas uz brūces veidos plānu biopolimēra kārtiņu, kura to aizsargās un dziedinās. Levāns nepiesārņo vidi un ir biodegradējams līdz ar to, tā ir potenciāla izejviela, lai aizstātu naftas ķīmijas produktus.

Faktori un substrāti, kas ietekmē levāna biosintēzi

Vēlreiz gribas atkārtot, ka ne tikai ogļhidrātu pieejamība barotnēs un optimālo fermentācijas apstākļu nodrošināšana nosaka biopolimēru iznākumu. Lielā nozīme ir baktēriju celmam. Piemēram, baktērijas Bacillus amyloliquefaciens celmam ΔLP-pHTPgrac levāna iznākums ir 30,5 g uz litru, kas ir par 114% augstāks salīdzinājumā ar kontroles celmu B. amyloliquefacien NK-ΔLP. Savukārt baktēriju celmam ΔLP-Y levāna izmākums vidēji bijis 37,4 grami uz litru kas ir par 161% augstāks, kā kontroles celmam NK-ΔLP (Yanyan Gu et. al. 2017). Kā jau vairākkārt minēts, optimālo apstākļu nodrošināšana fermentācijas laikā būtiski ietekmē biopolimēra iznākumu. Vienā no pētījumiem levānu sintezēja, izmantojat 5 L bioreaktoru, izvelētais baktēriju celms bija B. amyloliquefaciens ΔLP-Y, fermentācijas laikā pastāvīgi tika nodrošināta barības vielu padeve, rezultātā tiek sasniegts 102,0 g levāna uz litra substrāta, kas ir viens no augstākiem radītajiem kurš bija minēts literatūrā (Yanyan Gu et. al. 2017).

Biopolimēru sintēzei var izmantot ne tikai tradicionālos mikroorganismu kultivēšanas substrātus, kas tiek lietoti tradicionāli un ir labi zināms kuros kurš mikroorganisms vislabāk aug un attīstās. Pastāv arī iespējas izmantot kādu citu - lētāku vai plaši pieejamu substrātu, piemēram, pārtikas ražošanas blakusproduktus, piemēram, sūkalas, melasi u.c. Viens no galvenajiem nosacījumiem efektīvai biopolimēru sintēzei ir pietiekama barības vielu (galvenokārt ogļhidrātu) pieejamība. Biopolimēru sintēzei sūkalu substrātā var izmanot dažādas pienskābes baktērijas, piemēram, Leuconostoc mesenteroides. Šai baktērijai ir izteikta laktāzes aktivitāte, tādēļ tā par barības vielu spēj izmantot piena cukuru laktozi. Ja gadījumā sūkalu fermentācijai tiks izmantotas cita veida baktērijas, piemēram, Zymomonas mobilis kurai iepriekš minētā enzīma nav un līdz ar to nav arī spējas sašķelt laktozi līdz glikozei, tad fermentācijas procesa nodrošināšanai sūkalu substrātu vajag papildus bagātināt ar enzīmu - laktāzi, kas palīdzes to sašķelt. Pirms fermentācijas sākšanas, sūkalu substrātam jābūt sterilam, tas ir jānodrošina ar atbilstošu termisko apstrādi. Vienā no aprakstītajām metodikām sūkalas iesaka uzkarsēt 100 °C temperatūrā, 30 min (Lule et al., 2014). Pēc karsēšanas sūkalas ir jāizfiltrē, lai atdalītu cieto piena frakciju, tālāk jācentrifugē pie 10,000 apgriezieniem, 10 min, lai iegūtu caurspīdīgi gaiši zaļo šķīdumu (Abiodun et al., 2002). Iegūtam šķīdumam papildus pievieno 10% saharozi, 0,1 % rauga ekstraktu un 0,1% K2HPO4. Standarta barotne, kas ir izstrādāta speciāli pienskābes baktērijām (De Man, Rogosa and Sharpe MRS) ir 2% glikozes, kuru levāna sintēzei ir jāaizvieto ar saharozi. Sākotnējai pH substrātā jābūt pH 7,0 (pirms sterilizēšanas). Pirms baktēriju pievienošanas fermentējamam materiālam jānosaka baktēriju koncentrācija. Ja baktērijas ir liofilizētā veidā, tad fermentējamam substrātam pievieno tādu daudzumu, lai baktēriju saturs tajā būtu sestajā pakāpē. Ja baktērijas iepriekš bijušas audzētas substrātā, baktēriju saturam ir jābūt 600 nm (nanometriem) no kā fermentācijas šķīdumā pievieno 5% inokulāta. Fermentāciju jāveic 30 °C temperatūrā 18 stundas (Lule et al., 2014). Ir arī vēl citas nianses, kas jāievēro. Piemēram, fermentācijas laikā substrātā saharozes koncentrācijai ir jābūt ne augstākai par 20%.

Kā substrātu fermentācijas procesam levāna biosintēzei var izmantot arī blakusproduktu – sīrupu, kas veidojas krūmcidoniju (*Chaenomeles japonica*) sukāžu ražošanā. Parasti pirms fermentācijas jānodrošina izejvielu un taras sterilitāte. Izmantojot krūmcidoniju sīrupu par ogļhidrāta avotu baktēriju kultivēšanai, sterilizēšana nav nepieciešama, jo tika secināts, ka sīrups ir ļoti skābs (pH ir ļoti zems – 2,5), turklāt šķīstošās sausnas saturs ir 55% Brix. Zems pH un augsts cukura saturs ir vide, kura neļauj attīstīties blakus mikroflorai (nelabvēlīgiem mikroorganismiem). Ja ir uztraukums par krūmcidoniju sīrupa sekundāro piesārņojumu, tad to var arī nosterilizēt. Ja to dara, tad pirms sterilizēšanas krūmcidoniju sīrupa pH ir jāpaaugstina līdz 7,0, jo pretējā gadījumā termiskās apstrādes laikā, zemas skābes un augstas temperatūras ietekmes rezultātā notiks saharozes inversija, izveidosies glikoze un fruktoze – invertcukuri, kuri nav pieļaujami levāna un dekstrāna sintēzei. Ir vēl pietiekami daudzas citas tamlīdzīgas tehnoloģiskas nianses, kuras vēl būtu jāpēta.

Mikrobioloģiskās izcelsmes levāna sintēze no substrātiem ir iespējama tikai tad, ja pamata sastāvdaļa ir saharoze. Pamatā substrāta receptūra levāna vai dekstrāna optimālai biosintēzei ir saharoze, gaļas peptons, rauga ekstrakts, kālija hidroortofosfāts (K_2HPO_4), amonijs sulfāts (NH_4)2SO4 un magnija sulfāts ($MgSO_4$). Ja par ogļhidrātu avotu tiek izmantota laktoze (sūkalas), maltoze (iesals) vai rafinoze (cukurbietes), biopolimēru iznākums būs zemāks. Ja substrātā pamatā ir fruktoze vai glikoze, levāna iznākums būs niecīgs, vai pat vispār nebūs. Zinātniskajās publikācijās minēts, ka par labu ogļhidrāta avotu levāna sintēzei var kalpot cukura ražošanas blakusproduktu melase, tomēr, lai nodrošinātu labu biopolimēra iznākumu būtu nepieciešams substrātam papildus pievienot gaļas peptona buljonu un rauga ekstraktu. Izmantojot melasi levāna biosintēzai, tās iznākums ir krietni zemāks salidzinājumā ar standarta MRS barotni.

Lai iegūtu maksimālo biopolimēra iznākumu fermentācijas procesa ilgumam jābūt ne mazāk ka 10 dienas. Literatūrā pieminēts, ka pēc 10 fermentēšanas dienām lavāna iznākums var sasniegt 50% no kopējā pievienotā ogļhidrātu (saharozes) daudzuma substrātā. Bet Latvijas zinātnieku pieredze rāda, ka efektīvai levāna iegūšanai, sintēzei nav jāpārsniedz 5 dienas. Obligāti jāatceras, ka saharozes (ogļhidrāta avota) saturs substrātā nedrīkst pārsniegt 20%. Lietojot vairāk šī disaharīda, substrātā būtiski palielinās osmotiskais spiediens, kas negatīvi ietekmē mikroorganismu attīstību un līdz ar to arī biopolimēra iznākumu. Levāna fermentācijas laikā baktērijas producē organiskās skābes, kas pakāpeniski pazemina pH substrātā no 7,0 līdz 4,7, tādēļ ir svarīgi arī uzturēt katrai baktērijai optimālo pH vidi. Optimālā temperatūra organismu augšanai un levāna biosintēzei ir aptuveni 30°C, bet temperatūra var variēt atkarībā no izmantotas baktērijas celma un sugas. Levāna biosintēzi labvēlīgi ietekmē saudzīga substrāta maisīšana fermentācijas laikā (līdz 60 apgr. min-1), savukārt piespiedu aerācija var būtiski samazināt levāna iznākumu.

Pēc sintēzes baktēriju šūnas no fermentēta šķīduma atdala centrifugējot, bet levānu izgulsnē, pielejot no 1,5 daļas (no kopēja maisījuma tilpuma) absolūto etanolu (96%, minēts literatūrā). Bet tomēr novērots lielāks biopolimēra iznākums ir, ja levāna izgulsnēšanai izmanto 3 daļas absolūtā etanola pret kopējo maisījuma tilpumu. Ja ir mērķis iegūt pēc iespējas tīrāko biopolimēru, tad to vairākas reizes izgulsnē ar etanolu (Han and Clarke, 1990). Iegūto masu (brūngani baltā krāsā), žāvē vai sublimē vakuuma žāvētājā.

DEKSTRĀNS

Dekstrāns pirmo reizi tika aprakstīts 1874. gadā. To sintezē vairākas *Lactobacillus, Leuconostoc* un *Streptococcus* baktēriju ģintis. Dekstrānu komerciāli ražo, izmantojot baktēriju sugu *L. mesenteroides*. Dekstrāna veidošanās ir saistīta arī ar zobu bojāšanos (zobu kariesu). Saharozes un baktēriju *Streptococcus* mutans klātbūtne cilvēku mutē rada dekstrānu, kas nodrošina adhēziju un ļauj mikroorganismiem veidot kolonijas uz zobu virsmas, rezultātā izraisot to emaljas bojāšanos (Leathers, et al., 2002). Dekstrāns labi šķīst ūdenī, un to var izmantot pārtikās ražošanā kā iepakojuma, plēvju materiālu (Naessens et al., 2005; Khan et al., 2007).

Galvenais nosacījums dekstrāna biosintēzes barotnei - sastāvā jābūt saharozei, gaļas peptonam mikroelementiem un fosfātiem. Fermentācija var notikt gan skābekļa klātbūtnē, gan bez tā, jo *L. mesenteroide*s baktērijas ir fakultatīvie anaerobi. Sākotnējais pH 6,7 - 7,2, temperatūra 25 °C, fermentācijas ilgums 48 stundas. Pirmajās 20 stundās organisko skābju veidošanās dēļ pH pazeminās līdz ~ 5,0. Dekstrāna nogulsnēšana notiek līdzīgi kā citiem mikrobioloģiskās izcelsmes polimēriem (Naessens et al., 2005). Dekstrānu var fermentēt, neizmantojot baktērijas, bet ar enzīmu (fermentu) dekstransurāzi. Ievērojot atbilstošos fermentācijas apstākļus, fermenta dekstransurāzes izmantošana ļauj iegūt ķīmiski tīrāku biopolimēru. Fermentācijas apstākļi ar fermenta izmantošanu ir vieglāk kontrolējami, salīdzinot ar bakteriālo biosintēzi.Optimālā pH vērtība fermentatīvajai sintēzei ir 5,0 ± 5,2, bet bakteriālajai 6,7 - 7,2. Fermentācijai jānotiek 23 ºC temperatūrā. Saharozes koncentrācijai fermentācijas buljonā jābūt aptuveni 0,5 ± 1,0% robežās, jo tas veicina vislielāko dekstransurāzes sintēzes produktivitāti. Enzimātiskā (fermentatīva) sintēze ir labāka, jo tad dekstrāna molmasa ir augstāka un iegūta viela ir tīrāka un kvalitatīvāka. Tomēr šo metodi parasti neizmanto komerciālai dekstrāna sintēzei, iespējams, ekonomisku apsvērumu dēļ (Naessens et al., 2005). Dekstrāna molmasas ir atkarīgas no mikroorganisma producenta celma. Ja dekstrāna molmasas ir zemākas, tad tie ir mazāk sazaroti un tiem ir sliktāk izteiktas biopolimēru īpašības. Savukārt tie dekstrāni, kuriem ir molmasa, kas lielāka par 10000 Da, ir ļoti sazaroti (Naessens et al., 2005; Han. et al., 2007). Ja dekstrāna molmasa ir no 2000 līdz 10 000 Da, tādiem pārklājumiem ir augstāka spīduma pakāpe un elastīgums (Naessens et al., 2005. gads; Khan et al., 2007). Vidēji dekstrānu molmasas svārstās no 107 līdz 108 Da. Atkarībā no īpašībām daži dekstrāni šķīst ūdenī, bet citi nešķīst, bet pārsvarā šķīdība ūdenī tiem ir mazāka par 30 mg/ml. Dekstrāni nešķīst spirtā un acetonā, bet šķīst formamīdos un dimetil-sulfoksīdā. Parasti dekstrānam ir laba šķīdības pakāpe un zema šķīduma viskozitāte. Tomēr šķīduma viskozitāti ietekmē pH, sazarošanās pakāpe, šķīduma temperatūra. Tomēr lielāku molmasu dekstrānu šķīdība ir neliela, > 1,5 masas % (Naessens et al., 2005; Khan et al., 2007). Dekstrānu medicīnā izmanto asins plazmās kā piedevu. Savukārt dekstrānu, kuru producē L. mesenteroides B-512F, var izmantot kā asins plazmas aizstājēju. Tomēr iespējamas alerģiskas reakcijas dēļ, dekstrāna ikdienas izmantošana klīniskās ir ierobežota (Naessens et al., 2005). Dekstrānam ir antitrombotiska iedarbība, to izmanto mikroķirurģijā (Jallali 2003). Medicīnā to lieto arī dzelzs deficīta anēmijas ārstēšanā. Tam ir antikoagulantu un pretvīrusu iedarbība, to lieto arteriosklerozes ārstēšanai. Dekstrāni tiek izmantoti arī vairākās oftalmoloģijas un ādas kopšanas, kosmētikas preparātos (Naessens et al., 2005). Pārtikas produktos to izmanto kā stabilizatorus, emulgatorus vai pārtikas pārklājumos/plēvēs. Konditorejas izstrādājumos to izmanto kā mitruma noturības līdzekli, viskozitātes uzlabošanai un pret cukura kristalizāciju. Želejas konfektēs tos izmanto kā želejvielas. Saldējumos lieto kā kristalizācijas aizkavētājus (inhibitorus) (Vistlers un Daniels, 1990; Diena un Kim, 1993; Jallali, 2003; Khan et al., 2007). Visplašāk izmantotais dekstrāna atvasinājums ir SephadexÕ (nosaukums ir atvasināts no PHArmacia DEXtran), kuru 1959. gadā komercializēja Pharmacia Fine Chemicals (Upsala, Zviedrija). Tas ir gēls, ko var iegūt, reaģējot ar sārmu (dekstrāna šķīdums ar epihlorhidrīnu). SephadexÕ tiek izmantots kā molekulārs siets, kas izraisīja revolūciju attīrīšanas un atdalīšanas tehnoloģijās. Ar to atdala dažādas bioloģiskas makromolekulas, piemēram, olbaltumvielas, nukleīnskābes un polisaharīdus (Jallali, 2003).

Dekstrāniem ir vēl daudz citu potenciālu pielietojumu, piemēram, tie var būt kā emulģējoši un sabiezinoši līdzekļi, ar augstu viskozitāti (Vistlers un Daniels, 1990). Dekstrāni nav iekļauti sarakstā kā pārtikas piedeva ASV vai Eiropā, bet producējošā baktērija L. mesenteroides ir GRAS statusā (drošs lietošanai), turklāt šis mikroorganisms pārtikas rūpniecība jau tiek izmantots un atrodas daudzos raudzētos pārtikas produktos. Ir atrodami patenti, kur dekstrānu izmanto konditorijas izstrādājumos (Jallali, 2003). Pašlaik pārtikas rūpniecībā arvien biežāk sāk lietot gellānu, ko sintezē baktērija *Sphingomonas elodea*. Gellāns ir vislabāk pazīstams kā gēlus veidojoša viela. Produktu iebiezināšanai izmanto koncentrāciju no 0,02% līdz 0,1%. Istabas temperatūrā tas slikti šķīst ūdenī, tādēļ, lai to izšķīdinātu, ūdens temperatūrai jābūt +75+85º C. Lai pagatavotu desertu, iebiezināšanai pievieno 0,2% gellāna un vēl kalcija jonus. Ja produktā ir vairāk nekā 20% saharozes, tad tas samazina gellāna stiprību (Giavasis. et al., 2000). Apstrādei

ar gellānu visbiežāk izmanto vielu kombināciju karagināns, želatīns vai agars. Izvēlētā kombinācija un koncentrācija var mainīt gellāna īpašības (stiprību, elastību, trauslumu, kušanas temperatūru u.t.t.). Gellānu bieži izmanto košļājamo konfekšu ražošanā kā stabilizatoru. To lieto arī jogurta un krējumu ražošanā. Gellāns spēj noturēt ūdeni produktā, tādēļ to lieto batoniņu ražošanā. Gellāns ir stabils augstās temperatūrās, līdz ar to tas bieži ietilpst pīrādziņu, kūku un kēksu mīklu receptūrās, lai palielinātu mīklas viskozitāti (Gibson et al., 2000).

BIOPOLIMĒRU IZMANTOŠANAS IESPĒJAS AUGĻU APSTRĀDĒ

Viena no prasībām, kam jāatbilst labam ēdamajam pārklājumam, ir barjerīpašība -CO_2 un O_2 apmaiņa starp ārējo un iekšējo atmosfēru. Biopolimēri nedrīkst izmainīt savu sākotnējo stāvokli un stabilitāti temperatūras ietekmē, tiem jābūt mehāniski izturīgiem, vienkārši lietojamiem, bioloģiski noārdāmiem, netoksiskiem, drošiem lietošanā, ar zemām ražošanas izmaksām un līdz ar to pieejamiem. Tie nedrīkst ietekmēt produkta organoleptiskas īpašības (Ghanbarzadeh et al., 2007). Ja biopolimēru materiāls/koncentrācija ir izvelēta nepiemēroti, tas var izraisīt pastiprinātu anaerobo elpošanu, radot vairākas nevēlamas vielas, piemēram, acetaldehīda un etanola izdalīšanos, rezultātā produkts ir sabojāts.

Biopolimēru pārklājumiem vai plēvēm var pievienot arī antimikrobiālās vielas (piemēram, ēteriskas eļļas, augu ekstraktus), rezultātā tā var pagarināt uzglabāšanas laiku un samazināt mikroorganismu attīstības līmeni (Gniewosz et al. 2014; Synowiec et al., 2014).

Amerikā veiktajos pētījumos zinātnieki ar biopolimēriem apstrādā ne tikai augļus, dārzeņus un ogas, bet arī gaļu. Vienā no tādiem pētījumiem mērķis bija pagarināt gaļas uzglabāšanas laiku un samazināt patogēno mikroorganismu attīstību. Rezultātā ar biopolimēru (pullulānu) un antimikrobiālām vielām no Paragvajas ileksa (*Ilex paraguariensis, Yerba mate*) un parastā kadiķa (*Juniperus communis* L.) apstrādāta tītaru krūtiņai mikrobioloģiskais piesārņojums ar nelabvēlīgiem mikroorganismiem (L. monocytogenes, *S. aureus, Salmonella typhimurium, S. enteritidis*), salīdzinot ar kontroles variantu, izrādījās daudz zemāks - attiecīgi bija 4,5 log KVV cm-2 un 5,6 log KVV cm-2 (Trinetta et al. 2014).

Augļu un ogu apstrādei ar biopolimēriem ēdamo pārklājumu veidā ir ieteicams izmantot plastifikatorus, piemēram, glicerīnu. Glicerīns pārklājumam nodrošina labāko adhēziju pie uzglabājama produkta virsmas, minimizē plaisu veidošanos un uzlabo elastīgumu.

Levāns kombinācijā ar 20-30 % (no masas) glicerīnu veido viendabīgas elastīgas plēves, ja plastifikatoru daudzums ir zemāks par 10%, plēvēm piemīt trauslums, ir slikta stiepšanas/elastīgums, savukārt, ja plastifikators ir vairāk par 30%, tad plēves nesacietē un ir pārāk šķidras. Efektīvai levāna/glicerīna maisījumu ekstrūzijai (plēvēm) nepieciešams vismaz 25% glicerīna (Barone un Medynets, 2007).Vienā no literatūras avotiem minēts, ka, pievienojot ēdamajam pārklājumam vairāk kā 0,5% plastifikatora (glicerīna), samazinājās augļu (ābolu) aizsardzības funkcijas (Scramin, et al., 2011).

Lai samazinātu ogu augļu mikrobiologisko piesārņojumu, pirms to apstrādes ar biopolimēriem ir ieteicams tos 2-3 minūtes paturēt sāls (0,9%-2% NaCl) šķīdumā. Tam seko augļu/ogu apžāvēšana un tikai tad jāveic apstrāde ar biopolimēriem.

Augļu ogu apstrādei ar biopolimēriem ir vairākas metodes, populārākās ir iemērkšana un izsmidzināšana. Iemērkšana ir piemērotāka neregulārām, nelīdzenām virsmām. Šī metode tiek uzskatīta par efektīvāku, jo biopolimērs apklāj visu apstrādes laukumu. Iegremdējot biopolimērā, ogas ir tajā jāpatur 1-2 minūtes. Pēc apstrādes jāapžāvē istabas temperatūrā līdz 2 stundām (ja ir iespējams, lai ātrāk augļi/ogas apžūtu, jānodrošina gaisa plūsmu~ 2 m/s). Smidzināšanas metode ir piemērotāka gludu virsmu apstrādei. Obligāti jāatceras gan pēc izsmidzināšanas, gan iegremdēšanas jāseko produkta (augļu, ogu) žāvēšanai (Azeredo et al., 2014).

Ir jāatzīmē vairāki svarīgi fakti biopolimēru pielietošana uzturā. Piemēram, tos uzturā drīkst lietot veģetārieši un diabēta slimnieki (Singh et al., 2008). Visa veida biopolimēri ir pieskaitāmi pie ‘zaļiem iepakojumiem’, tātad nepiesārņo vidi, viegli degradējas līdz dabiskam sastāvdaļām, kas vidē noārdās pilnīgi, bez videi bīstamām atliekvielām (Babu et al., 2013).

Diemžēl mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimēru ražošana pagaidām vēl ir darbietilpīgs un samērā dārgs process. Tādēļ to izmaksas ir relatīvi augstas un to lietošana ir joprojām ierobežota. Piemēram, pullulāna ražošanas izmaksas ir no 25 līdz 30 dolāru par kilogramu. Savukārt Sigma-Aldrich katalog piedāvājumā biopolimēra levāna cena par gramu ir 336.00 eur + PVN https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l8647?lang=en&region=LV. Rezultātā tāda veida biopolimēru lietošana pārtikas ražošanā ir ierobežota (Farris et al., 2014). Biopolimēru cenas samazināšanu var panākt lietojot lētus fermentēšanas substrātus un atlasītus mikroorganismu sugas/celmus ar dabiski augstām biopolimēru biosintēzes spējām (Oliveira et al., 2007; Öner et al., 2016). Piemēram, levāna ražošanai liela apjomā izmanto tādas mikroorganismu sugas, kā *Erwinia herbicola* (Keith et al., 1991), *Zymomonas mobilis* (Jang et al., 2001), *Microbacterium laevaniformans* (Moosavi-Nasab et al., 2010), *Bacillus subtilis* (Esawy et al., 2011, 2013), *Bacillus subtilis natto* (Dos Santos, Pineda, Celligoi un Cavalcanti, 2013), *Bacillus methylotrophicus* (Zhang et al., 2014) un *Leuconostoc mesenteroides* (Moosavi-Nasab et al., 2010).

Diemžēl pašlaik biopolimēru ražošanas izmaksas ir relatīvi pārāk augstas, līdz ar to biopolimēru izmantošana ir ierobežota. Ļoti būtiski ir meklēt un pārbaudīt citus lētus izejvielu avotus, kas varētu aizstāt tradicionālos. Turklāt jāveic padziļināti pētījumi mikroorganismu celmu atlasē, izvērtēšanā, nepieciešami pētījumi par biosintēzes produktivitāti, kas būtiski izmainās noteiktās vidēs un apstākļos. Bet, lai sasniegtu ekonomiski efektīvus rezultātus, ir vēl ļoti daudz jāstrādā.

PĀRKLĀJUMI PĀRTIKAS PRODUKTIEM: ĒDAMAIS PĀRKLĀJUMS

Pārtikas plēves ir vienīgais bioloģiski noārdāmā plastmasas iepakojuma veids, kam nav jānodrošina savākšana un utilizācija. Tā ir galvenā ēdamo pārklājumu atšķirība no tradicionāli bioloģiski noārdāmās plastmasas. Savukārt bioloģiski noārdāmā plastmasā sākotnēji bija izstrādāta, kā sintētisko polimērmateriālu (parastās plastmasas) aizstājējs. Vienlaicīgi zinātnieki cerēja, ka bioloģiski noārdāmas plastmasas ražošana pilnībā atrisinās sintētisko polimērmateriālu atkritumu problēmu, kas šobrīd ir viens no globālajiem vides piesārņojuma avotiem (1). Tomēr joprojām bioloģiski noārdāmā iepakojuma pieejamība veikalos ir ierobežota, turklāt patērētajam trūkst informācijas par šāda veida iepakojumiem. Turklāt patērētāji, dzirdot jēdzienu biodegradējamais iepakojums, to asociē ar videi draudzīgu materiālu. Bet diemžēl tas nemaz tā nav, bioloģiski noārdāmā iepakojuma priekšrocības izpaužas tikai tad, ja tas ir pareizi savākts, t.i. atdalīti no citiem atkritumiem un tiek pārstrādāts specifiskos apstākļos. Tikai neliela daļa no tiem sadalās apkārtējā vidē. Jāatzīmē, ka ražošanas iepakojumu apjoms ir samērā neliels, tādēļ tie vienmēr ir dārgāki, nekā parastās plastmasas. Vairums bioplastmasu, atrodoties atkritumu poligona dziļajos slāņos, izdala siltumnīcas efekta gāzi metānu. Bioloģiski noārdāmo plastmasu izejvielu ieguvei jānodrošina tādus pašus augsnes un ūdens resursus, ar kādiem mūsdienās audzē pārtiku (izņemot ļoti nelielu plastmasas daudzumu, kas ražots no lauksaimniecības atkritumiem). Tas nozīmē, ka izejvielas bāze vienmēr būs ierobežota (2).

Bioplastmasa jeb biopolimērs ir plastmasas paveids, kas iegūts no atjaunojamiem biomasas avotiem, piemēram, augu taukiem un eļļas, kukurūzas cietes, zirņu cietes u.t.t.

Par bioplastmasu sauc trīs veida materiālus:

- materiāli, kas iegūti no atjaunojamajiem vides resursiem, bet nav kompostējami,
- materiāli, kas nav iegūti no atjaunojamajiem vides resursiem, taču ir kompostējami un sadalās vidē bez atlikuma,
- materiāli, kas iegūti no atjaunojamajiem vides resursiem (piemēram, no augos esošās cietes, celulozes vai cukura) un ir kompostējami.

Izplatīts bioplastmasas (biopolimēru) veids ir PLA *(Polylactic acid),* kas sadalās 60 ºC temperatūrā. Šādi iepakojumi tiek izmantoti visbiežāk, taču tie arī ir atbilstoši jāvāc, jāšķiro un jāpārstrādā speciālos konteineros, jo, pats par sevi saprotams, komposta kaudzē šāda kārbiņa nesadalīsies.

2015. gada Eiropas parlamentā apstiprināja direktīvu 94/62/EK [3] pa vieglās plastmasas (biezums <50µm) un ļoti vieglās plastmasas iepirkumu maisiņu (biezums <15µm) patēriņa samazināšanu. Pašlaik ekonomisko un tehnoloģisko iemeslu dēļ plastmasas iepirkumu maisiņus pārstrādā ļoti ierobežotā daudzumā. Direktīvā pieminēts, ka līdz 2019. gada 31. decembrim vieglo maisiņu patēriņš uz vienu iedzīvotāju nedrīkst pārsniegt 90 gb., bet līdz 2025. gada 31. decembrim 40 gb.

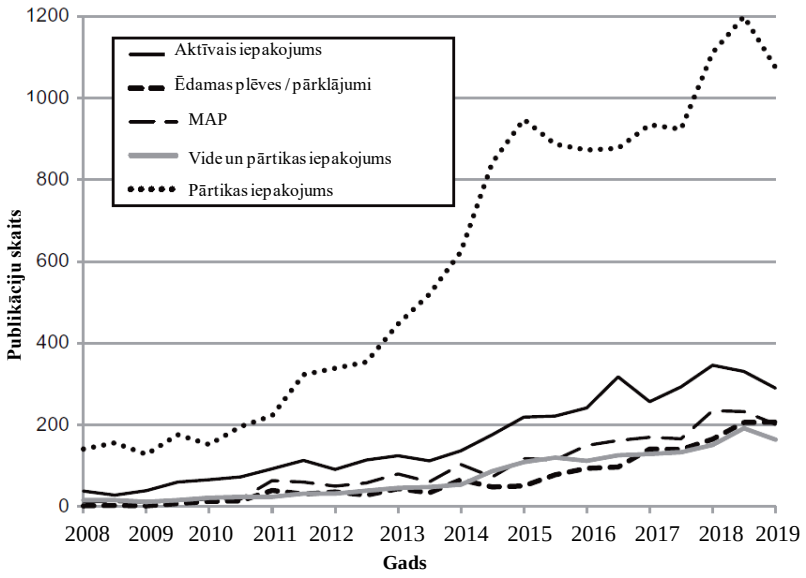
Valstis patēriņa mērķos var neiekļaut ļoti vieglās plastmasas iepirkumu maisiņus. Tajā pašā laikā ir jāizmanto bioloģiski noārdāmi plastmasas maisiņi, uz kuriem obligāti jānorāda marķējums un kompostēšanas nosacījumi.

Pēc 2010. gada pētījuma datiem Eiropas iedzīvotājs gadā vidēji izlieto 200 gb. vieglās plastmasas iepirkumu maisiņus [3]. Sākot ar 2019. gada 1. janvāri, preču vai ražošanas tirdzniecības vietās vieglās plastmasas iepirkumu maisiņus bez maksas neizsniedz.

Minētajos pasākumos var neiekļaut ļoti vieglās plastmasas iepirkumu maisiņus. Dažus plastmasas iepirkumu maisiņus ražotāji marķē kā "oksobioloģiski noārdāmus" vai "oksonoārdāmus". Bet, diemžēl, tāda veida maisiņi sadaļas mazās (mikro) daļiņās, kas tāpat paliek apkārtējā vidē. Līdz ar to ir maldīgi šāda veida maisiņus uzskatīt par "bioloģiski noārdāmiem", jo tie nerisina vides piesārņošanas problēmas, bet gan gluži pretēji – palielina piesārņojumu.

Pēdējos desmit gados ēdamie iepakojumi sākuši ieņemt savu nišu starp plastmasas iepakojuma materiāliem, aktīviem iepakojumiem, MAP (modified atmosphere packaging) iepakojumiem [4].

Kā redzams 1. attēlā, visvairāk publikāciju Scopus datu bāzē ir atrodamas par tēmu "pārtikas iepakojums", bet diezgan maz publikāciju ir bijušas par tēmu "ēdamās plēves/ ēdamie pārklājumi". Šī situācija visticamāk nav saistīta ne ar intereses trūkumu ne arī ar neuzticību ēdamiem pārklājumiem vai plēvēm, bet gan ar neapšaubāmu uzdevuma sarežģītību, ar ko saskaras ēdamo plēvju/ pārklājumu izstrādātāji un ražotāji. Svarīgi, lai ēdamām plēvēm/pārklājumiem būtu noteiktas funkcionālās īpašības (barjeras, mehāniskās, sensorās, pretmikrobialās utt.).



1. attēls – Publikāciju skaits par tēmām: aktīvais iepakojums, pārtikas plēves/pārklājumi, iepakojums ar modificētu gāzu atmosfēru (MAP), vide un pārtikas iepakojums, pārtikas iepakojums [5]

Tādās valstīs, kā ASV, Francija, Vācija, Japāna un Ķīna ik gadu pieaug interese par ēdamiem iepakojumiem/plēvēm, par ko liecina patentu skaits, kas ir piereģistrēts šajās valstīs. 1986. gadā pasaulē vēl nebija vairāk kā desmit uzņēmumi, kas ražo ēdamās plēves, bet līdz 1996. gadam to skaits jau ir pieaudzis līdz 600 uzņēmumiem. Pēdējo piecos gados ieņēmumi no ēdamo iepakojumu pārdošanas ir sasnieguši simts miljonus dolāru [6], kas norāda uz strauji pieaugošu pieprasījumu pēc šāda veida materiāliem un to ražošanas attīstības perspektīvām.

Molekulārā līmenī ēdamo iepakojumu var uzskatīt par bioloģiski noārdāmu biopolimēra materiālu, kas vidē viegli sadalās mikroorganismu (mikroskopisko sēņu un baktēriju) ietekmes rezultātā. Savukārt cilvēku un dzīvnieku kuņģī un zarnās esošo intracelulāro un neakulāro enzīmu (endo- un eksoenzīmu) iedarbībā polimērs tiek pakļauts ķīmiskām reakcijām, fermentu ietekme tiek šķielts, oksidēts un hidrolizēts [7].

Ēdamie iepakojumi tiek ražoti ne tikai kā plēves un pārklājumi, bet arī kā maisiņi un loksnes [8,9]. Plēves atšķiras no loksnēm pēc biezuma: parasti tiek uzskatīts, ka plēves ir līdz 250 mikroniem un loksnes ir vairāk par 250 mikroniem. Ēdamiem pārklājumiem tiek pieskaitītas arī mīkstas želejas kapsulas un cietie apvalki uz tabletēm [10]. Zinātnieki uzskata, ka plānā kārta, kas uzklāta tieši uz produkta, ir saucama par ēdamo pārklājumu, bet iepriekš iegūta plēve, kurā produkts tiek iesaiņots, par ēdamo plēvi [11,12].

Ēdamajiem iepakojumiem atšķirība starp plēvēm un pārklājumiem ir saistīta arī atkarībā no ieguves metodēm. Plēves ir materiāli, kas iepriekš ir sagatavoti sausā veidā un atrodas uz produkta virsmas vai arī starp produkta slāņiem. Tos var aptīt ap izstrādājumu, no tiem var izgatavot somas, maisiņus un pat rokassomas u.t.t. Vairākas plēves var laminēt loksnē. Pārklājumus uz produkta uzklāj ar šķīdumiem - izsmidzinot vai iemērcot. Pārklājumi izžūst uz izstrādājuma.

Ēdamais iepakojums ne tikai pagarina iespējamo produkta glabāšanas laiku, turklāt palīdz arī optimizēt gāzu apmaiņu starp produktu un apkārtējo vidi, bet gala rezultātā kļūst arī par tā ēdamo daļu. "Pārtikas iepakojums ir iepakojuma veids, kā plēves, loksnes, plānas kārtas pārklājums, kas ir neatņemama produkta sastāvdaļa un ko var ēst kopā ar to."[13].

Mūsdienīgajām ēdamajām polimēru plēvēm ir līdzīga loma kā augļu un ogu dabiskajam vaskam, proti: tās novērš mitruma zudumus, kontrolē gāzu apmaiņu (skābekli, oglekļa dioksīdu), piešķir produktam izturību un nodrošina ilgstošas kvalitātes saglabāšanos [14, 15]. Tās palīdz nodrošināt pārtikas produkta virsmas sterilitāti un sastāvdaļu saglabāšanos, piemēram, gaistošās vielas, kas nodrošina pārtikas raksturīgo smaržu un aromātu. Ēdamajam iepakojumam var pievienot arī veselību veicinošas vielas, piemēram, vitamīnus, minerālvielas, flavonoīdus, dažādus ekstraktus utt.

Pašlaik galvenie ēdamo iepakojumu komponenti ir polisaharīdi (cietes, celulozes ēteri, hitozāni, pullulāni, dekstrīni, algināti, karagināni, pektīni, levāni u.t.t.), olbaltumvielas (kolagēni, želatīni, zeīni, lipekļi, sojas izolāti, kazeīni), lipīdi (vaski - bišu vaski, karnauba utt.). Angļu valodas literatūrā šajā grupā ietilpst pat parafīns, kas iegūts no eļļas; acetoglicerīdi, glicerīdi vai to kombinācijas. Vairākās publikācijās [16, 17] polisaharīdu vietā izdala hidrokoloīdu grupu, kas papildus polisaharīdiem ietver arī sintētiskos hidrofilos polimērus, kas ir apstiprināti izmantošanai pārtikas rūpniecībā. Piemēram, ēterus, kuru pamatā ir polietilēna oksīds. Parasti termins "hidrokoloīdi" ir kopīgs nosaukums hidrofiliem (ūdeni piesaistošiem) polimēriem, kuru zemas koncentrācijas šķīdumiem noteiktos apstākļos ir želejveida īpašības [18].

Ēdamo plēvju, fizikālās īpašības ir atkarīgas no pievienotajām vielām un to koncentrācijas. Piemēram, polisaharīdu plēves ir hidrofilas līdz ar to tam var pievienot dažādas ūdenī šķīstošas piedevas: aromātus, krāsvielas utt. Šāda veida plēvēm ir laba skābekļa barjera, bet tie arī labi laiž cauri ūdens tvaikus. Olbaltumvielu plēves arī ir hidrofilas, tāpēc, tāpat kā polisaharīdu plēves, tās labi laiž cauri ūdens tvaikus.

Lipīdu plēvēm, gluži pretēji, ir labas barjeras īpašības attiecībā uz ūdeni, tās to atgrūž, bet diemžēl tām ir ļoti zema mehāniskā izturība [19]. Līdz ar to, pirms ēdamo plēvju ražošanas ir jāsaprot kāds būs iespējamais to izmantošanas mērķis un attiecīgi kādām īpašībām tad būtu jābūt.

Pēc galveno sastāvdaļu veida, kas veido plēvi, izšķirt divas vielu klases: pirmā klase ir daži biopolimēri vai lipīdi, bet otrā - pārtikas produktu, dārzeņu un/vai augļu biezeņu, miltu utt. [20].

Ēdamas plēves, kuru sastāvā ir sulas un biezeņi, galvenokārt satur pektīnvielas. Pirms šādu ēdamo plēvju iegūšanas to izejvielu komponentus sākotnēji pakļauj dehidratācijai, sasaldējot. Piemēram, Brazīlijas lauksaimniecības pētījumu korporācijas un uzņēmuma 'Embrapa Instrumentation' pārstāvji ražo ēdamas plēves no tādiem produktiem kā spināti, papaijas, gvajāvas, tomāti [21], kas pēc īpašībām ir līdzvērtīgas biopolimēru plēvēm.

Uzturvērtības ziņā ēdamās plēves un pārklājumus iedala sagremojamās, no kurām cilvēku organisms iegūst barības vielas un kalorijas (enerģētisko vērtību) un nesagremojamās, kas nedod papildus enerģētisko vērtību un organismā neuzsūcas, bet tiek izvadītas reizē ar citām balastvielām [22]. Sagremojamās plēves un pārklājumus galvenokārt iegūst uz ogļhidrātu, olbaltumvielu, tauku bāzēm. Nesagremojamās parasti ir dabiskie vaski (izdalīti no augiem, kukaiņiem utt.), ūdenī šķīstošie dabiskie un sintētiskie sveķi, ūdenī šķīstošie celulozes atvasinājumi, polivinilspirts, polivinilpirolidons u.t.t.

Tiek uzskatīts, ka nesagremojamos pārklājumus cilvēka organisms var uzņemt tikai noteiktā daudzumā. Ir pierādīts, ka pieļaujamās dienas devas, kas tiek izteikta kā vielas daudzums mg dienā uz 1 kg ķermeņa masas, ikdienišķa uzņemšana organismā visas dzīves laikā negatīvi neietekmē cilvēka veselību [22]. Tāpēc, piemēram, 1980. gadā parafīna vasku, kurš bija iegūts no naftas, Pārtikas un zāļu aģentura (FDA) atļāva izmantot mikrokapsulu ražošanai, kas saturēja garšvielas saldētai picai [23]. Saskaņā ar Amerikas augļu un dārzeņu asociācijas datiem, lai novaskotu 160 tonnu ābolu, pārklājuma emulsijas pagatavošanai nepieciešami tikai 450 grami vaska.

Šajā sakarā gribas piebilst, ka mūsdienu iepakojuma ražotāji cīņā par tirgu, neapzinoties kaitējumu cilvēku organismam, nesagremojamos plēves/pārklājumus/iepakojumus kuri veidoti uz parafīna, vaska, šellaka utt. bāzes, sauc par ēdamiem, bet korekti būtu tos uzskatīt par bioloģiski noārdāmiem vai biodegradējamiem. Šodien patērētājam jābūt ļoti uzmanīgam, jo dažreiz nav pietiekamas informācijas par produktu, kuru jūs gribat apēst. Tāds informācijas trūkums par produktu reizēm var būt maldinošs, var apdraudēt veselību.

Konferencē Briselē 2004. gadā tika apspriesti jautājumi par pārtikas iepakojuma drošību, un ierosināts uz iepakojuma sniegt pilnīgo informāciju pircējam, proti: pārtikas produktu iepakojuma marķējumā ir jābūt datiem par to ķīmisko sastāvu. Tomēr daudziem ekspertiem šķita, ka, padarot šo informāciju pieejamāku, tas nepaaugstinās drošības līmeni patērētājiem, bet gan atklās ražotāju īpašumtiesības [24].

Cilvēku veselībai visā pasaulē piešķir arvien lielāku nozīmi. Zinātnieki aktīvi meklē risinājumus, ar ko un kā varētu aizvietot nesagremojamās plēvēs un pārklājumus - pat tos pie kuriem visi sen jau ir pieraduši. Piemēram, kā alternatīva šellakam, kas ir dabisks sveķis (izdala kukaiņi *Kerria lacca),* ko tradicionāli izmanto šokolādes izstrādājumu pārklājumos, piešķirot tiem skaistu spīdumu, tiek piedāvāta plēve, kuras pamatā ir hidrolizēts kolagēns un kakao sviests. Tika pieradīts, ka šis jaunais izgudrojums ir ne tikai sagremojams cilvēku organismā, bet tam ir arī lielāka elastība. Turklāt tas palēnina saharozes kristalizāciju, rezultātā pagarinot šokolādes derīguma termiņu [25].

Pirmās publikācijas par ēdamajām plēvēm un pārklājumiem parādījās pagājušā gadsimta astoņdesmitajos gados [26], un pirmie plēves ruļļi rūpnieciskos apstākļos tika ieguti 60. gados [27]. Pirmais ēdamais iepakojums tika iegūts senajā Ķīnā 12. gadsimtā, kad jūrnieki, pirms sūtīja lielos attālumos citrusaugļus, tos apstrādāja ar plānu vaska kārtu, lai saglabātu augļos mitrumu un to stingrību. 15. gadsimtā Eiropā šī tehnoloģija saņēma īpašu nosaukumu - *lardings*, kas nozīmēja augļu vai dārzeņu pārklāšanu ar vaska (2. att.), vai tauku slāni, kas neļāva tiem izžūt.

2. attēls Apelsīns, kas pārklāts ar plānu vaska kārtu

3. attēls – Ēdama plēve uz sojas piena bāzes (Yuba) [29]

4. attēls - Ēdamās kafijas tasīte pēc kompānijas Lavazzo pasūtījuma

5. attēls – Uzņemuma MonoSol ūdenī šķīstošs iepakojums

Tomēr *larding* metode nebija laba jo nepareizas gāzu apmaiņas dēļ augļu garša pasliktinājās, rezultātā pasliktinājās arī to kvalitāte. Bet tomēr, 'neatrodot' labāku metodi, *lardings* tika plaši lietots līdz pat 19. gadsimtam [28]. Tajā pat laikā Japānā, lai uzlabotu pārtikas produktu izskatu un saglabātu kvalitāti, izmantoja cita veida ēdamo plēvi, kura tika iegūta, vārot sojas pienu. To nosauca par Yuba (3. attēls) [29]. 18. gadsimtā Japānā tika patentēta tehnoloģija presētam rīsu papīram, lai ražotu vienreiz lietojamus pārtikas traukus: šķīvjus, krūzītes, bļodas u.t.t, kuru pamatā ir rīsu milti. Slavenā kafijas kompānija Lavazzo saviem klientiem piedāvā tādu ēdamu kafijas tasi (4. attēls) [30].

Kolagēna un želatīna pārklājumi Eiropā gaļas produktu uzglabāšanai izmantoti vairāk nekā divus gadsimtus. Pirmais patents ēdamajam iepakojumam gaļas produktu saglabāšanai tika reģistrēts 19. gadsimtā Amerikas Savienotajās Valstīs. Patenta pamats bija gaļas produktu ietīšana želatīna apvalkā [31]. Apvalks samazināja mikrobu attīstību un mitruma zudumus. Pašlaik lielākais ēdamo iepakojumu ražotājs gaļas produktiem ir Vācija [32].

Pagājušā gadsimta sākumā zinātnieki aktīvi sāka meklēt tehnoloģiju, kas ļautu ražot ēdamo pārtikas iepakojumu, kas saglabātu svaigu produktu īpašības, tādas kā krāsu, elastību, ūdens saturu, tauku saturu. Rezultātā 20. gadsimta vidū Amerikas Savienotajās Valstīs bija radīti vairāki ēdamā iepakojuma zīmoli, kas joprojām ir ļoti pieprasīti. Piemēram, labi pazīstamās un iecienītās daudzkrāsainās šokolādes konfektes *M*&Ms, ir ar ēdamo pārklājumu, kas sastāv no cukura, kukurūzas sīrupa un dabīgajiem sveķiem - šellaka. Tās tika ražotas, sākot ar 1941. gadu, kad parādījās problēma konfekšu pārdošanā vasaras mēnešos. Tāds konfekšu apstrādes veids – ēdamais pārklājums - neļauj tai kust. Cietais konfekšu apvalks rada komfortu to patērēšanā.

Iespējamie pārtikas plēvju un pārklājumu praktiskās izmantošanas veidi mēdz būt ļoti daudzveidīgi un interesanti. Lielākais ūdenī šķīstošo iepakojumu ražotājs Monosol (MonoSol) šodien patērētājiem piegādā porciju iepakojumus ar auzu pārslām, graudaugiem, kafiju, kakao, olbaltumvielu kokteiļiem, miltiem, garšvielām, mērcēm. Jaunākā uzņēmuma novitāte ir Vivos plēve, kas dažu sekunžu laikā izšķīst karstā ūdenī un nemaina ēdiena garšu (5. att.). Precīzu porciju iepakojumi ļauj kontrolēt ēdienam pievienoto garšvielu, u.t.t. nebaidoties kļūdīties devā [33].Brazīlijas restorānu tīklā Bob's piedāvā hamburgeru kopā ar ēdamo papīru (6. attēls) [34]. Nesen Land Rover, automašīnu ražošanas kompānija, ir izlaidusi ilustrētu ēdamo ceļvedi (Edible Survival Guide), kuru ekstrēmos apstākļos ir iespējams apēst [35]. Krievijā 2014. gada bija patentēta ēdamā plēve, kuras sastāvā bija gaļas buljons, augļu sula, sausās garšvielas, dilles, ēteriskās eļļas, ķiploki, ekstrakti u.t.t. Šādā plēvē var iepakot atdzesētu gaļu, saldētus augļus u.t.t. Bet, piemēram 2014. gadā amerikāņu zinātniece Tara Makhjū izstrādāja iepakojuma plēvi, kas izgatavota no augļu un dārzeņu biezeņiem, kura palielina produktu glabāšanas laiku un kurai reizē ir arī izejmateriāliem piemītošā uzturvērtība [37].

6. attēls - Ēdamie hamburgeru iepakojumi Bob's restorānu tiklā

7. attēls - D. Edvardsa izgudrojums- WikiCells - saldēts jogurts ēdama iepakojumā

8. attēls – Ēdamais maisiņš ar ūdeni

Zinātnieki par lielisko izgudrojumu atzina Hārvardas universitātes profesora Deivida Edvardsa ēdamo iepakojumu WikiCells [38]. Viņš mēģināja izgudrot ēdamo iepakojumu, kurš butu maksimāli līdzīgs tādam dabīgam apvalkam, kādi ir banāna vai vīnogu mizas.

Rezultātā viņš izgatavoja bumbiņas, kas izgatavotas no želejas, ar pārtikas gabaliņiem (augļiem, dārzeņiem, riekstiem un pat šokolādi), un kuru sastavā ietilpa polisaharīdi (hitozāns, algināts), kā arī kalcija vai magnija sāļi. Šāda veida bumbiņās vai ēdamajos maisiņos var glabāt visu iespējamo pārtiku, ieskaitot pat šķidrumus (7. attēls).

Profesora dibinātā kompānija WikiFoods piedāvā nogaršot tādus jaunumus, kā saldējums, kas nekūst saulē; Gazpacho zupa, kuru var ēst bez karotes; kokteilis Martini, kuru varat ielikt kabatā, atnākot mājas izšķīdināt ūdenī un izdzert.

Nesen (2016. gadā) studentu grupa izgudroja ēdamo plēvi ūdenim, nosaucot to par Ooho [39]. Šis metodes pamats: sasaldētu ūdeni (ledu) ieliek atšķaidītā nātrija algināta šķīdumā, kas satur kalcija hlorīdu. Uz ledus bumbas virsmas uzreiz izveidojas želejai līdzīga plēve, kas ir kā ēdama ūdens pudele pēc ledus izkausēšanas (8. attēls).

Galvenā ēdamo trauku ražotāja valsts ir Vācija. Ēdamie trauki, kuri izgatavoti no putotām pārtikas sastāvdaļām, ir caurlaidīgi mikroviļņu starojumam, tāpēc produktu var tajā karsēt un pagatavot. Bet, ja tāda veida traukus vāra, trauka materiāls tiek pilnībā izšķīdināts ūdenī [40].

Galvenās īpašības, kādam jābūt ēdamajam iepakojumiem ir:

- to saturs nedrīkst būt toksisks vai ar alerģiju izraisošām sastāvdaļām;
- jānodrošina produkta struktūras stabilitāte un mehānisko bojājumu samazināšana transportēšanas, uzglabāšanas un apstrādes laikā;
- jānodrošina gāzu caurlaidība un gāzu līdzsvars iepakojumā;
- jānovērš uzturvērtības izmaiņas un pasliktināšanās;
- jāsaglabā aromāts un produkta organoleptiskās īpašības;
- jānodrošina produkta bioķīmiskā stabilitāte;
- jāsargā produkts no ārējā piesārņojuma;
- jānovērš pasliktināšanās vai jāuzlabo produkta izskats;
- turklāt ēdamo iepakojumu ražošanai ir jābūt tehnoloģiski un ekonomiski izdevīgai.

1958. gadā ASV FDA pārtikas un zāļu pārvalde (Food and Drug Administration) izstrādāja stratēģiju, saskaņā, ar kuru visiem ēdamas plēves veidojošiem komponentiem jābūt pilnīgi nekaitīgiem un jāatbilst GRAS (atzīts par drošu) statusam. GRAS statusu piešķir kvalificēti eksperti, vai arī pats ražotājs veic visus nepieciešamos pētījumus un iesniedz nepieciešamos dokumentus FDA un gaida apstiprinājumu vai noraidījumu. Ja kādai no ēdamas plēves sastāvdaļām nav piešķirts GRAS statuss, bet ražotājs ar daudzu gadu pētījumiem ir pierādījis produkta drošību, tad tas var saņemt atļauju ‘ienākt’ tirgū, pamatojoties uz pašnovērtējumu [6].

Eiropas Savienības valstīs pamatdokuments pārtikas nekaitīguma jomā ir Eiropas Parlamenta un Eiropas Savienības Padomes 2002. gada 28. janvāra Regula Nr. 178/2002., kuru izstrādāja Eiropas Pārtikas nekaitīguma aģentūra (EFSA). Kā jau iepriekš tika minēts, galvenie ēdamas plēves veidojošie komponenti ražošanā ir polisaharīdi, olbaltumvielas, lipīdi un dabiskie sveķi. Jāatzīmē, ka biopolimēri ir polisaharīdi un olbaltumvielas, bet lipīdi un dabiskie sveķi (piemēram, šellaka), pareizāk būtu jāsauc par biomateriāliem[41].

Laboratorijas apstākļos ēdamās plēves iegūst, uzklājot plānu šķīduma slāni uz gludas stikla, metāla vai plastmasas virsmas, kam tālāk seko žāvēšana [42]. Ražošanas apstākļos, iekārta ar šķidro ēdamo plēvi uznes to uz kustīgas lentes vai cilindra,

kam seko žāvēšana. Šo metodi sauc sausā formēšanas metode (dry-spinning). Ir arī "slapjā" formēšanas metode (wet-spinning). Specialā nogulsnēšanas vannā tiek ievietots ēdamās plēves šķīdums, no kuras tiek noliets liekais šķidrums, tam seko tālāka nogulšņu žāvēšana. Iespējams arī šķidro ēdamo pārklājumu izliet speciāli tam paredzētas formās.

Ēdamo plēvju iegūšanas metode ir atkarīga no šķīduma viskozitātes un paredzētā plēves biezuma. Ja šķiro ēdamo plēvju viskozitāte ir 25–35 mPas, to smērē formā, ja viskozitāte ir 1.2–15 mPas, tiek izmantota liešana formā, bet presi ar ruļļiem izmanto, lai iegūtu īpaši plānu ēdamo plēvi. Ļoti svarīgi, lai ēdamas plēves šķidrums uz formas vai ruļļa vai lentes tiek padots zem spiediena [43]. Pateicoties tam, ēdamajam pārklājumam rodas papildus makromolekulas, rezultātā uzlabojas mehāniskās īpašības. Alternatīva ēdamo plēvju iegūšanas metode ir ekstrūzijas ceļā (polimēru rūpniecībā ekstrūziju izmanto visplašāk no visām nozarēm). Tas ļauj iegūt ēdamas plēves ar daudz lielāku ātrumu un ar mazāku enerģijas patēriņu, jo, pielietojot šo metodi, tiek izmantoti koncentrētāki šķīdumi, kuru piegādi iekārta veic daudz ātrāk [44].

Saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes direktīvu (European Parlament and Council Directive EPCD No. 95/2EC, 1995) un ASV standartiem (US Regulations FDA, 2014) ēdamās plēves un pārklājumus var klasificēt kā pārtiku, pārtikas sastāvdaļas, pārtikas piedevas vai pārtikas iepakojuma materiālus. Eiropā sastāvdaļas, kuras tiek pievienotas ēdamām plēvēm, tiek uzskatitas par pārtikas piedevām. Šo direktīvu nesen papildināja, ieviešot pārtikas piedevu tīrības kritērijus.

Pārtikas starptautiskie standarti ir apvienoti Codex Alimentarius un pieņemti FAO / PVO komisijā (Pārtikas lauksaimniecības organizācija / Pasaules veselības organizācija) [101]. Šajā dokumentā ir norādīts pārtikas piedevu maksimāli pieļaujamais lietošanas daudzums, kas ir funkcionāli efektīvs pārtikas produktā un tiek uzskatīts par drošu cilvēku veselībai. Maksimāli pieļaujamais daudzums tiek izteikts mg uz kg produkta un noteikts, pamatojoties uz pieļaujamo dienas devu.

Sākot ēdamo plēvju un pārklājumu rūpniecisko ražošanu, ir jāņem vērā starptautiskie standarti, kā arī katras valsts nacionālie standarti, kuriem jāatbilst ražošanas organizēšanas un kontroles noteikumiem, labai ražošanas praksei. Augsto prasību līmeņa dēļ, kam jāatbilst, ēdamo iepakojumu ražošanas izveidei ir ierobežota attīstība kā rūpniecības nozarei. Starp lielajiem uzņēmumiem ēdamo iepakojumu ražošanā un pārdošanā līderis ir Watson [102], kas tagad ir pazīstams kā BASF, Planet Polymer Technologies, Inc. un pārstāv Ziemeļamerikas reģionu. Pašlaik ēdamo iepakojumu tirgus Rietumeiropā vēl nav panācis Amerikas tirgu, bet sāk darboties aktīvi.

Nesen izveidotā Lielbritānijas kompānija BioFilm Holdings Limited [103] ir laidusi tirgū Listerine Pocket Paks mutē ātri šķīstošās plēves, kas satur elpas atsvaidzinātājus. Ražotāji uzskata, ka šāda tipa produkts ir daudzsološs, jo tajā kā sastāvdaļas var pievienot B12 vitamīnu, melatonīnu utt. Vienīgais mutē šķīstošās plēves trūkums ir iespējamība pievienot aktīvās vielas devu mazā daudzumā - tikai 30 mg uz 100 mg, lai tā nezaudētu savas īpašības. Tomēr jāatzīmē, ka šādas ēdamās plēves var izmantot citu ļoti aktīvu zāļu sastāvdaļu iesaiņošanai, kur nepieciešami mikrodaudzumi, jo īpaši tāpēc, ka šajā gadījumā tās netiks pakļautas kuņģa sulas gremošanas enzīmu iedarbībai, kas samazina zāļu efektivitāti.

Ir iestrādes arī ēdamo plēvju pieejamībai izmantošanai jebkuram interesentam mājas apstākļos. Japānas uzņēmums ražo ēdamās plēves disku veidā, vienā iepakojumā 200 gabali, var iegādāties lielākajā interneta veikalā AMAZON par 8,15 ASV dolāriem. Papildus tiek piedāvāta ierīce plēves metināšanai mājās apstākļos. Uzņēmums izgatavo arī ēdamos maisiņus, vienā iepakojumā 50 gab, ar dažādu garšu (vīnogu, zemeņu) par 6,99 ASV dolāriem. Uzņemums "Devro", kas ir pazīstams ar kolagēna apvalkiem desām un cīsiņiem 2004. gadā izstādē demonstrēja ēdamo olbaltumvielu-alginātu desu apvalku bezšuvju pārklājuma formā, kas pēc uzklāšanas vēlāk sarecēja tieši uz maltās gaļas [104]. Oriģinālu iepakojuma iekārtu piedāvāja kompānija Handmann. Iekārtas darba princips ir divas padeves šļirces un tvertne reaģentu koagulēšanai. 1. tabulā redzami daži pārtikas iepakojuma veidi, kas paredzēti, lai palielinātu pārtikas produktu derīguma termiņu.

1. tabula

Ēdamo plēvju un pārklājumu piemēri pārtikas produktu derīguma pagarināšanai

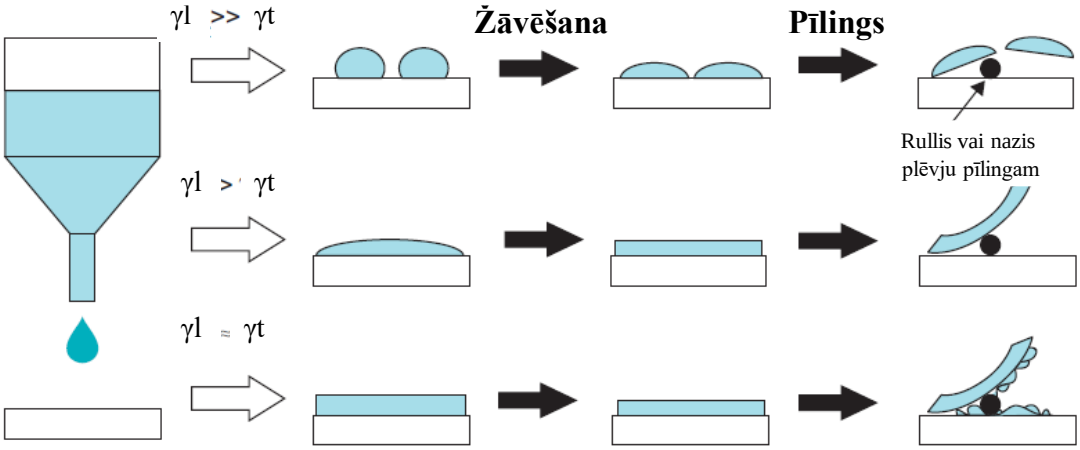
Zīmols	**Ražotājs / Izstrādātājs**	**Plēves/pārklājuma materiāls**	**Pārtikas produkti**	**Valsts**
Tal-ProLong™	TAL Chemicals Company; Courtaulds Group	Saharozes poliesteris	Svaigi augļi	Lielbritānija

FreshSeal®	BASF, Planet Polymer Tech-nologies, Inc.	Hitozāna hidrohlorīds	Svaigi augļi	ASV
NatureSeal®	Mantrose-HaeuserCo., Inc.	Metilceluloze		ASV
ProFruit Provegetable	Production and Innovation on Edible Coatings S.L.	Polisaharīdi ar organisko skābju pievienošanu	Svaigi augļi un dārzeņi, gaļa, zivis, rieksti, saldumi, kūkas, konditorejas izstrādājumi	Spānija
Vere-Coat	Garuda International Inc.	Kukurūzas proteīns (ceīns)	Rieksti un gaļa, saldumi, pārtikas piedevas un tabletes	ASV
Z*Coat™	Zumbro, Inc.	Kukurūzas proteīns (zeīns)	Rieksti šokolādē	ASV
Myvacet	QuestInt.	Acetilēts monoglicerīds	Rieksti	Nīderlande
Articoat DLP2	Chemital S.A.; Mantrose-Haeuser Co., Inc.	Pektīns ar nātrija diacetātu un organiskām skābēm	Gaļas šķēles, cīsiņi, desas un picas	Spānija, ASV
MycoStopGel	AEBGroup	Ksantāna sveķi	Siers	Argentīna

Ir pagājuši vairāk nekā trīsdesmit gadi, kopš parādījās pirmās ēdamas plēvēs un pārklājuma paraugi [26, 105]. Šajā laikā ārvalstu izdevniecības publicēja daudz monogrāfijas [6, 54, 55, 57], kas bija orientētas uz ēdamo iepakojuma materiālu sastāvdaļām un kuri bija jau patentēti [106–109]. Pašlaik aktuāli ir ēdamie pārtikas iepakojumi, kuru pamatā ir polisaharīdi [110–112] olbaltumvielas, lipīdi vai to maisījumi [113, 114], to piedāvājums ir diezgan daudzveidīgs. Ēdamā iepakojuma galvenais mērķis ir pagarināt pārtikas produktu derīguma termiņu, regulējot mitruma un gāzu apmaiņu, palielinot svaigu un minimāli apstrādātu augļu un dārzeņu mikrobioloģisko drošību, pievienojot baktericīdas, fungicīdas, antioksidanta piedevas, saglabājot un (vai) pievienojot smaržu piemēram, ķiploki [115], tomāti [116], šokolāde [117], kokosrieksti [118], melone [119], zaļā tēja [120], piešķirot produktiem papildu aromātiskās īpašības, piemēram, Coca-Cola [121] garšu, kā arī uzlabot vai saglabat izskatu. Daudzsološs virziens ir probiotiku, zāļu, vitamīnu, minerālvielu un nanodaļiņu iekļaušana ēdamajā iepakojumā [122]. Pārtikas polimēru plēves un pārklājumi šobrīd ir kļuvuši par inovatīviem produktiem. Tie tikko ienāca tirgū un nodrošina plašu darbības jomu. Uzņēmumi, kas ražo ēdamos iepakojumus, galvenokārt piedavā produkciju vietējos tirgos un pat nekonkurē savā starpā.

Ēdamo plēvju ražošanā ir svarīgs homogēns formēšanas šķīdums, bez komponentu fāzes atdalīšanas, izņemot gadījumus, kad tiek veidota divslāņu ēdamā plēve un ir nepieciešama fāžu atdalīšana. Tikpat svarīga raksturīpašība ir šķidruma viskozitāte un virsmas spraigums šķīduma un gaisa saskarsmes vietā [45]. Tas, ietekmē nelīdzenumu izlīdzināšanu, kas parādās šķīduma slāņa virsmā mehānisko defektu dēļ, piemēram, var būt nešķīstošās daļiņas, cietās piedevas. Diemžēl, joprojām jautājums par virsmas līdzenumu un ēdamo plēvju šķidruma viskozitātes ietekmi uz virsmas spraigumu nav pietiekami izpētīts. Tajā pat laikā, lai nodrošinātu gatavās ēdamās plēves vieglu atdalīšanos, noņemšanu no pamatnes, ir svarīga šķīduma virsmas spraiguma (γl) un cietās virsmas (substrāta) (γt) attiecība.

9. attēlā ir redzama γl ietekme uz ēdamas plēves adhēziju ar pamatni, uz kuras tiek uzklāts ēdamās plēves šķīduma slānis. Gadījumā, ja uzklāšanas laikā ir ļoti augsta γl vērtība, notiek slāņa *pārrautība,* kā sekas tam pēc žāvēšanas ir gatavās plēves atslāņošanos vai *savelšanās.* Ļoti zema γl vērtība arī nav vēlama. Jo ir mazāka ēdamas plēves un pamatnes virsmas enerģijas atšķirība, jo lielāka ir adhēzija starp tām, rezultātā ir grūtāk noņemt gatavo ēdamo plēvi no pamatnes [15].



9. attēls – Šķīduma virsmas spraiguma (γl) ietekme uz ēdamo plēvju adgēziju (saķeri) veidošanās procesā. γt - ruļļa vai ritošas lentes plakanas cietas virsmas enerģija

Žāvēšanas apstākļi (sauss gaiss, karsts tvaiks, infrasarkanā vai mikroviļņu krāsns sildīšana) arī būtiski ietekmē ēdamas plēves īpašības. Piemēram, žāvējot ēdamo plēvi no sūkalu olbaltumvielas mikroviļņos, tie neietekmē ūdens tvaiku caurlaidību, bet plēves stiepes izturība palielinās. [46].

Kā jau iepriekš bija minēts, ēdamais pārklājumus atšķiras no plēves ar to, ka tas tiek iegūts, uzklājot biopolimēra šķidrumu uz produkta, iemērcējot vai uzsmidzinot, kam seko produkta žāvēšana.

Ēdamā plēve var saturēt hidrofilus polisaharīdus, olbaltumvielas un hidrofobus lipīdus, šāda veida plēvēm piemīt labas barjerīpašībās. Šajā gadījumā formēšanas sastāvu sagatavo emulsijas veidā (šī metode ir lētāka, bet dod mazāk izturīgas plēves), bet, lai iegūtu izturīgākas plēves, ir jātaisa daudzslāņu pārklājumi (metode ir dārgāka). Pašlaik moderna metode ēdamo plēvju ražošanā ir tā saucamas "slānis pēc slāņa", kad lipīdu slāni uzklāj uz polisaharīda vai olbaltumvielu bāzes. Var arī olbaltumvielu pārklājumu uznest uz polisaharīdu plēves [47].

Polisaharīdus un olbaltumvielas var sajaukt arī ēdamās plēves šķidrumā, kam seko plēves veidošanās no diviem vai vairākiem komponentiem. Ja gadījumā šķidruma sastāvdaļas sava starpā ir saderīgas, var panākt to noslāņošanānu molekulārajā līmenī, bet, ja starp šķidruma sastāvdaļām nepastāv termodinamiskā savietojamība, tad sadalīšanas būs supramolekulāro struktūru līmenī [48].

Divslāņu ēdamas plēvesizmanto tādā gadījumā, ja iegūtās plēves sastāvdaļām ir zema adhēzija ar mitro pārtikas produkta virsmu, kas raksturīgs lipīdiem. Pārklāšana ar diviem slāņiem atrisina šo problēmu, bet palielina gala produkta cenu. Alternatīvais variants ir izmantot divu sastāvdaļu emulsijas: hidrofobas un hidrofilas, ar labu adhēziju (saķeri) ar pārtikas produkta virsmu, lai izveidotu viendabīgo pārklājumu. Īpaši grūti ir nodrošināt labu adhēziju, ja pārklājumu uzklāj svaigi sagrieztiem augļiem. Lai samazinātu adhēziju un virsmas spraigumu, tad pārklājuma sastāvā ir jāpievieno virsmas aktīvā viela [49].

Augļu vai ogu apstrādei ir zināma oriģināla metodi, kad tie nav jāmērcē šķidrumā, bet gan jāapber ar karboksimetilcelulozes pulveri. Tas absorbē (uzsūc sevī) augļu/ogu poru izdalīto mitrumu un uzbriest. Rezultātā izveidojas barjeras pārklājums, kas novērš ne tikai mitruma zudumus, bet arī novērš skābekļa iekļūšanu un krāsas maiņu produktā [50].

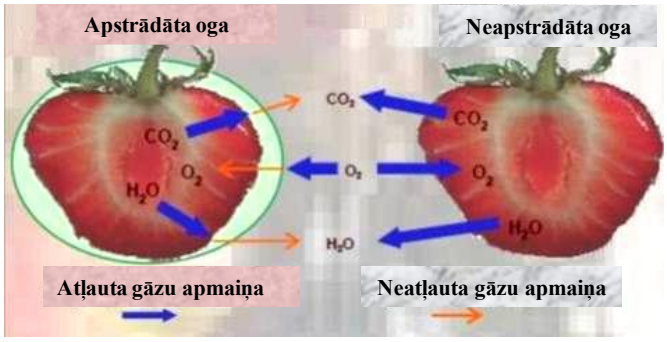
Papildus galvenajām sastāvdaļām pārklājumā vai plēvē ir jābūt plastifikatoriem (glicerīns, propilēnglikols, sorbitols, saharoze, polietilēnglikols, kukurūzas sīrups, ūdens), ja nepieciešams, emulgatoriem (lecitīns, tweens, spans (Laidumi)); lipīdu emulsijām (pārtikas vaski, taukskābes); aromatizētājiem, antioksidantiem, pretmikrobu līdzekļiem, vitamīniem, krāsvielām utt.

Dažreiz veidojot ēdamo plēvi tiek pievienoti šķērssaistīšanas līdzekļi [51]. Piemēram, dialdehīda karboksimetilcelulozi, kā šķērssaistīšanas līdzekli pievieno formēšanas šķīdumam uz želatīna bāzes, ar glicerīnu kā plastifikatoru. Rezultātā palielinās ēdamas plēves izturība un termiskā stabilitāte, bet samazinās garums, ūdens caurlaidība, un uzbriešanas spējas ūdeni. Kā jauns

kvalitātes radītājs jaunizveidotajai plēvei tika iegūtas aizsargbarjeras īpašības pret ultravioleto gaismu/starojumu. Pārtikas produktu iesaiņošana šādā plēvē ļauj palielināt to derīguma termiņu, novēršot UV starojuma izraisītās oksidēšanās reakcijas.

Sastāvdaļu ievadīšana šķidrajā ēdamajā plēvē ir atkarīga no to agregāt stāvokļa un savietojamības ar galvenajām biopolimēra sastāvdaļām. Piemēram, ja augu eļļas, kuras nešķīst ūdenī, tiek pievienotas polisaharīda vai olbaltumvielu ūdens šķīdumam, lai tās vienmērīgi sadalītos pa visu plēves virsmu, ir nepieciešama emulgācija, rezultātā veidojas nanoemulsijas [52]. Turklāt, neskatoties uz to vai ēdamais iepakojums tiek ražots pārtikas nozarei vai farmācijas rūpniecībai, visam ražošanas iekārtam jābūt paredzētam pārtikas nozarei, un jāatbilst ražošanas un kontroles (GMP) organizācijas noteikumiem [53,54, 55].

Vienas no galvenajam pārtikas iepakojuma funkcijām ir barjeras īpašības, stiepes īpašības, izturība. Visnozīmīgākās ēdamo plēvju īpašības ir barjeras īpašības pret mitrumu, skābekli, oglekļa dioksīdu un etilēnu (12. attēls). Ēdamai plēvei jāizveido atmosfēra, kas bagātināta ar oglekļa dioksīdu, bet ar samazinātu skābekļa saturu. Tomēr, ja skābekļa ir par maz, tad var rasties anaerobā "elpošana", kurā cukurs pārvērtīsies alkoholā un parādīsies produktam neraksturīga smarža. Bet, ja skābekļa saturs pārsniegs 9%, sāksies augu audu oksidēšanās process un rezultātā veidosies etilēns, kas veicinās augļu un/vai dārzeņu nogatavošanos [13].



12. attēls - Augļu un dārzeņu gāzes caurlaidības shēma [18]

Zinātnieki konstatējuši, ka ar sliktām aizsargbarjeras īpašībām pret mitrumu (10-100 g · m / m^2) ir plēves ar augstu amilozes cieti, kolagēnu, želatīnu, sojas proteīnu, kazeīnu, sūkalu olbaltumvielām. Vidējas barjeras īpašības pret mitrumu (0,1 / 10 g.m/m^2) ir raksturīgas plēvēm, kas izgatavotas no metilcelulozes, hidroksipropilcelulozes, zeīna, nātrija algināta, lipekļa, kazeīna kombinācijā ar bišu vasku. Bet ļoti labas barjeras īpašībās pret mitrumu (0,01–0,10 g · m / m^2) bija bišu vaska plēvēm, kuras vēl sastāvēja no oksipropilmetilcelulozes-palmitīnskābes-vaska [15]. Salīdzināšanai: zema blīvuma polietilēna mitruma caurlaidība ir 0,08 g · m / m^2). Tāpēc bija piedāvāts izmantot pārklājumus uz zeīna bāzes, lai novērstu mitruma migrāciju no produkta, piemēram no rozīnēm. Tādi ir produkti ar zīmolu Cozeen no kompānijas Zumbro INc. Heifīldu izmanto zeīna bāzes pārklājumus riekstu, gaļas un konfekšu pārklāšanai [56]. Riekstu (*pekanrieksti) derīguma termiņš, uzglabājot tos* temperatūrā 25°C un relatīvajā gaisa mitrumā 50%, ar šādu pārklājumu pagarinājās trīskārtīgi.

Aizsargbarjeras pret skābekli īpašības, kas tika testētas 25°C un 50% relatīvajā gaisa mitrumā, ir labas plēvēm, kuras sastāv no kolagēna, želatīna, lipekļa, sojas proteīna, kazeīna, kazeīna maisījuma ar bišu vasku, sūkalu olbaltumvielu, barotnes (1–10 cm^3·µm / (m^2 dien. kPa)). Vidēji labas (10–100 cm^3·µm / (m^2 dien. kPa)) ēdamas plēves ir ar augstu amilozes cieti, zeīnu, nātrija alginātu. Bet sliktas (100–1000 cm^3·µm / (m^2 ·dien. kPa)) ēdamas plēves ir ar sūkalu olbaltumvielām, bišu vasku, šellaku. Salīdzinājumam – ēdamas plēvēs, kuras pamatā ir etilēna un vinilspirta kopolimērs, skābekļa caurlaidība iepriekš minētos apstākļos ir tikai 0,1 cm^3·µm / (m^2 · dien.· kPa)).

Labas mehāniskās un barjeras īpašības nesen atrastas ēdamajām plēvēm, kuru pamatsastāvdaļa ir glutēns. Tomēr aptuveni 0,5–1,0% pasaules iedzīvotāju ir konstatēta celiakija jeb glutēna nepanesamība, kas izpaužas kā gremošanas traucējumi ar hronisku zarnu trakta iekaisumu, ko izraisa lipekļa klātbūtne pārtikas produktos. Glutēnu (jeb lipekli kviešos, rudzos un miežos) iegūst ar mitrās ekstrakcijas metodi no visu proteīnus nesaturošo sastāvdaļu miltiem. Tas pieder pie lodveida olbaltumvielām, kas nešķīst ūdenī, bet šķīst vielās ar augstu pH vērtību. Piemēram, vienā no pētījumiem olas tika pārklātas ar glutēna bāzes pārklājumu, rezultātā olu glabāšanas laiks pagarinājās līdz 30 dienām [57]. Sojas proteīni arī ir tādi paši lodveida proteīni kā glutēns. Ēdamas plēves no sojas un dažādiem citiem proteīniem, tādiem kā kazeīns, kolagēns, olu baltums, želatīns, cietes vai celulozes atvasinājumiem, kā arī

daudzvērtīgajiem spirtiem (glicerīns, sorbitols, mannīts, propilēnglikols) ir ļoti populārs desu un citu gaļas produktu iepakošanas materiāls. Piemēram, iepakojot šķiņķi, to var veiksmīgi uzglabāt bez mitruma atdalīšanās mīnus 5°C temperatūrā. Bet, piemēram, lipīdu bāzes ēdamajām plēvēm ir labas mitruma barjeras īpašības, bet hidrofobā nepolimēra rakstura dēļ tām ir zemas mehāniskās izturības īpašības. Pārsvarā lipīdu ēdamās plēves sastāv no dažādiem vaskiem, no kuriem visvairāk hidrofobais ir bišu vasks. Bet, piemēram, ēdamo plēvju ražošanā izmantojot karnaubas vasku, kas ir no palmu (*Copoernica cerifera*) lapām, kā arī no Meksikas krūma (*Candelilla schrub*) lapām, iegūst plēvi ar samazinātu gāzes un mitruma caurlaidību. Tos var izmantot kā pārklājums uz augļu mizām, lai palielinātu virsmas spīdumu. Ja pārklājumi uz augļu mizas ir biezi, tie nav jāēd, pirms produkta lietošanas tie būtu jānoņem. Ēdamie tāda veida iepakojumi ir tikai plānie.

Nesen kompānija BASF ir piedāvājusi Freshseal CHC ēdamo pārklājumu uz dabīga biopolimēra bāzes, lai iepakotu zaļos tomātus, papriku un nogatavinātu tos etilēna vidē. Pētījumos, salīdzinājumā ar neapstrādātiem, dārzeņiem kuri bija pārklāti ar Freshseal CHC, bojājumi glabāšanas laikā bija 2,5 reizes zemāki. Savukārt dārzeņiem, kas bija pārklāti ar sintētisko vasku, bojājumi bija tikai 1,5 reizes zemāki nekā neapstrādātiem dārzeņiem. Rezultātā pēc divu nedēļu glabāšanas paraugi ēdamajā iepakojumā bija ne tikai cietāki, bet arī vienmērīgāk nogatavojās, bija vissulīgākie [58]. Pārklājumam uz tomātu virsmas tika pievienots hitozāns, kas uz dārzeņu un augļu virsmas veido elastīgas viendabīgas plēves, kas regulē gāzu apmaiņu, un ietekmē fitopatogēno mikrofloru, kavējot to attīstību[59].

Ēdamas plēves, kuru pamatā ir metilceluloze, hidroksipropilmetilceluloze, hidroksipropilēta ciete, pektīns utt., tiek izmantotas, kā pārklājums gaļas, zivju produktiu, kartupeļu, sīpolu gredzenu utt. cepšanai, lai uz pusi samazinātu eļļas absorbciju (uzsūkšanos). Piemēram, uzņēmums Beloit ir izstrādājis FryShield pārklājumu, ko iegūst, sajaucot vāju metoksilētu pektīna šķīdumu ar maizes drumstalām, kas satur kalcija hlorīdu [60–61]. Japānā līdzīgam mērķim sāka izmantot mikrobiālo polisaharīdu želāna sveķus KELGOGEL, kurus sintēzē baktērija *Pseudomonas elodea* [62–64]. Šis polimērs ir kļuvis zināms tikai pēdējos desmit gados, taču pēc savam īpašībām, it īpaši pēc spējas veidot želejas sāļu klātbūtnē, tas ir līdzīgs alginātam, lai gan, atšķirībā no tā, spēj veidot želejas ar dažādiem joniem, piemēram, nātrija joniem.

Zinātnieki piedāvā izmantot želāna sveķu acilētu un deacilētu formu kopā ar askorbīnskābi, lai iegūtu ēdamu plēvi ar antioksidanta īpašībām [65]. Ir pierādīts, ka deacilētā polimēra un kalcija jonu satura palielināšanās ēdamajā plēvē palielina askorbīnskābes spēju nomākt fermentatīvās brūnēšanas procesus, kas izraisa brūnas krāsas veidošanos, piemēram, glabājot sagrieztus ābolus. Šī produkta krāsas maiņa neietekmē garšu, bet neapmierina pircējus, sabojā produkta izskatu. Vēl viena ēdamo plēvju izmantošanas joma ir svaigi sagrieztu augļu, kas ir „gatavs lietošanai" produkts (RTE, ready to eat, gatavi lietošanai pārtikā). Gataviem lietošanai pārtikā produktiem ēdamo plēvju lietošanas nepieciešamība galvenokārt ir saistīta ar pārklājumu pretmikrobialo aizsargfunkciju.

Pievienojot noteiktas sastāvdaļas ēdamajam iepakojumam, var rasties baktericīdas un fungicīdas īpašības. Apstrādātiem produktiem jābūt ar ilgu lietošanas derīguma termiņu un mikrobioloģiski drošiem. Šodien ēdamās antibakteriālās plēves un pārklājumi piesaista lielu pētnieku un pārtikas rūpniecības uzņēmumu interesi [66].

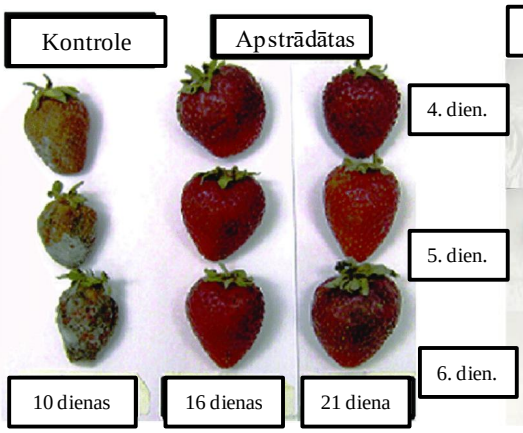
Ēdamajām plēvēm un pārklājumiem ar antimikrobialām īpašībām ir vairākas priekšrocības, piemēram, tie kavē mikroorganismu augšanu un attīstību uz produktu virsmas. Protams, iepakojuma materiāls nevar nodrošināt sanitāri hiģiēniskas prasības pirms to iepakošanas, tomēr tas var palielināt produktu drošību, jo tas samazina patogēno mikroorganismu augšanu un attīstību [67].

Pašlaik daudzi zinātnieki strādā pie dabisku vai sintētisku pārtikas piedevu pievienošanas polisaharīdu vai olbaltumvielu plēvēs ar mērķi maksimāli samazināt mikroorganismu augšanu svaigos un pārstrādātos produktos. Vienā no pētījumiem tika pētīts ēdamo plēvju un pārklājumu antimikrobialā aktivitāte pret *L. monocytogenes, Salmonella sp., E. coli* baktērijām, jo tieši šie patogēni visbiežāk izraisa bīstamu saindēšanos ar pārtiku un slimību uzliesmojumus, nepietiekami apstrādājot vai apstrādes laikā piesārņojot pārtikas produktus [68–74]. Pētījumos konstatēts, ka ēdamās plēves un pārklājumi kavē amonificējošu (pūšanas) mikroorganismu augšanu, radot atmosfēru, kas nodrošina produkta fizikāli-ķīmisko un mikrobioloģisko stabilitāti, palēninot mitruma, aromātisko vielu iekļūšanu un regulējot gāzu apmaiņu. Pētījumos labi rezultāti tika konstatēti plēvēm no polisaharīda hitozāna. To šķīdumi dod viendabīgas, elastīgas plēves, kurām piemīt antibakteriālas īpašības. Pārtikas produktos, kuri bija pārklāti ar hitozāna plēvēm, mikroorganismi neaug. Profesors Janjans Žao no Oregonas Universitātes ASV un Deli universitātes speciālisti izmanto hitozāna

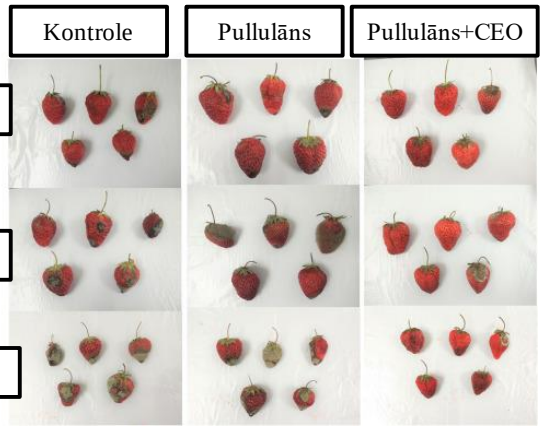
plēves, lai palielinātu svaigu augļu derīguma laiku un paplašinātu eksportu ar vietējiem produktiem, tādiem kā mango, sagrieztiem āboliem un mellenēm [67].

Ēdamajām plēvēm un pārklājumiem pievieno antimkrobiālās vielas, piemēram, organiskās skābes (citronskābe, ābolskābe, laurīnskābe, propionskābe, vīnskābe u.c.), augu ekstraktus, ēteriskās eļļas (oregano, brūns, citrons, sinepes, ķiploki utt.). Atšķirībā no augu eļļām, ēteriskās eļļas ietver daudzkomponentu gaistošo savienojumu (aromātisko, aliciklisko un alifātisko karbonil savienojumu, spirtu, skābju, ēteru u.c.) maisījumus, jāatzīmē, kā tieši ēteriskam eļļām piemīt ļoti spēcīgas antimikrobiālās īpašības.

Pašlaik ir tendence, ka priekšroka vairāk tiek dota dabiskiem augu, dzīvnieku un mikrobialās izcelsmes antimikrobiāliem komponentiem, jo šīs vielas ir nekaitīgas cilvēku organismam. Pētījumi paradīja, ka ja ražojot ēdamas plēves tiek pievienots antimikrobiālais komponents virs 4 mg cm^{-2}, gatavajās plēvēs tas būtiski samazināja stiepes izturības un Young moduļa samazināšanos, palielinoties relatīvajam pagarinājumam. [55]. Vienā no pētījumiem bija testēta ēdamajām plēvēm, gatavotām no cietes, amaranta miltiem un hitozāna ar ēteriskajām eļļām (Meksikas oregano, kanēļa mizas un citronzāles) antimikrobiālās īpašības pret mikroskopiskajām sēnītēm *Penicillium digitatum* un *Aspergillus niger*. Ēdamajām hitozāna plēvēm ar biezumu no 5,33±0,836 līdz 13,26±0,414 μm bija novērotas antibakteriālās īpašības, bet izteiktas īpašības konstatētas plēvēm, kas saturēja Meksikas oregano un kanēļa mizas ēterisko eļļu [59]. Bet, piemēram, ēdamie pārklājumi uz hidrofobizētas hitozāna bāzes, kuru sastāvā bija limonēns (1-metil-4-izopropenil) penilcikloheksēns-1, būtiski palielināja zemeņu glabāšanas laiku (13. att.) [59]. Vēl vienā publikācijā bija pētīts pullulana pārklājums uz zemenēm, kuram pievienoja kanēļa ēterisko eļļu (CEO) un pārbaudīja to ietekmi uz mikroorganismu attīstību un ogu glabāšanas ilguma pagarināšanu. Ogas apstrādāja ar pagatavoto nanoemulsiju CEO (sastāvs: pullunans +glicerīns+ Tween+ kanēļa ēteriska eļļa) sagatavošanai izmantoja ultraskaņas apstrādi, daļiņu izmērs bija mazāks (162,1 nm). Ogas glabāja 20 ° C ± 2 ° C temperatūrā un 70–75% relatīvajā gaisa mitrumā 6 dienas. Rezultātā pēc sešām dienām pullulan-CEO nanoemulsijas pārklājums ievērojami pazemināja augļu masas, cietības, šķīstošas sausnas un kopējā skābuma izmaiņas. Turklāt zemenēm, kas pārklātas ar pullulāna bāzes nanoemulsiju CEO bija izteiktāka pretmikrobialā aktivitāte, salīdzinot ar kontroles neapstrādāto variantuvariantu ar tīra pullulāna pārklājumu (14. att.) [75].



13. attēls – Zemeņu ārējais izskats, pārklātam ar hitozānu ogām kas satur limonēnu kā pretmikrobu piedevu (1-metil-4-izopropenilciklohekseēns-1) un Tvinu (Tween) 80 kā emulgatoru [59]



14. attēls – Apstrādāto ogu izskats, kas tika uzglabātas istabas temperatūra. Kontrole , Pullulāns, Pullulāns +Kanēļa ēteriska eļļa CEO

Pašlaik tiek veikti intensīvi pētījumi par jaunu komponentu meklēšanu, lai nodrošinātu ēdamo plēvju stiepes izturību, mitruma un gāzes caurlaidību, antimikrobiālo aktivitāti, komponentu difūzijas ātrumu iepakojumā un ārpus tā, izturību pret karstumu. Inovatīvie ir infrasarkano staru un spektrofotometriskie pētījumi ēdamo plēvju komponentu saderībai. Turklāt tiek veikti plaši pētījumi ēdamo plēvju virsmas morfoloģijas un struktūras īpašību noteikšanai [76, 77].

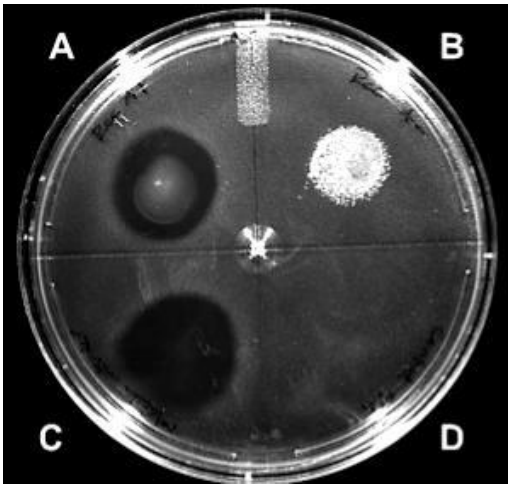
Ēdamo plēvju un pārklājumu jomā ir divi galvenie pētījumu virzieni. Pirmkārt, notiek šķīdumu reoloģisko īpašību un stabilitātes izpēte, īpaši gadījumos, kad formēšanas šķīduma sastāvā ir divi vai vairāki polimēri, vai arī dispersās sistēmas,

piemēram, suspensija, emulsija, nanoemulsija. Otrkārt, mehānisko, optisko, termisko, mitruma un gāzu caurlaidības, šķīdības ūdenī, eļļas izturības, plēvju un pārklājumu virsmas morfoloģijas un mikrostruktūras, pretmikroorganismu īpašību izpēte.

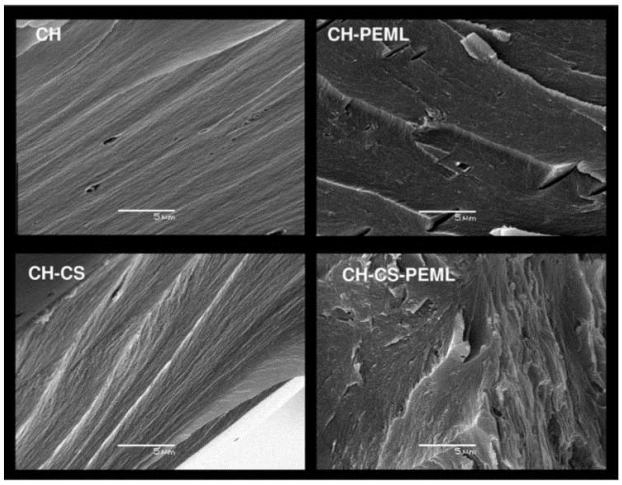
Līdz šim izpētīto ēdamo iepakojuma klāstā lielu interesi rada plēves un pārklājumi no cietes un hitozāna. Tie ir bioloģiski noārdāmi, netoksiski, tiek ražoti no atjaunojamām izejvielām, ko jau izmanto pārtikas un farmācijas rūpniecībā. Bet, diemžēl, bez iepriekšminētajām priekšocībām tām ir arī savi trūkumi. Ēdamajām plēvēm no cietes ir zema mehāniskā izturība un augsta ūdens tvaiku caurlaidība, kas ir saistīta ar cietes hidrofilitāti, kā arī spēja retrogradēties, kas laika gaitā izpaužas kā mehānisko īpašību izmaiņas. Tādēļ joprojām ir jāveic pētījumi cietes bāzes plēvju īpašību uzlabošanai. Lai uzlabotu to īpašības, cietes plēvēm pievieno vēl arī citas sastāvdaļas - virsmas aktīvās vielās un taukskābes, kas saskaņā ar vispāratzīto ēdamo plēvju klasifikāciju tiek iekļautas lipīdu grupā. Vienā no pētījumiem, lai uzlabotu cietes plēvju hidrofobās un pretmikrobiālās īpašības, tika pagatavota nanoemulsija, kuras sastāvā bija oleīnskābes, amiloze, acetilētā ciete [78]. Iepriekšminētas vielas saturēja trīs dabiskas pretmikroorganismu sastāvdaļas: aktonskābi (AA), nizīnu (NIZ) un laurilarginātu (LA) (15. attēls). Var secināt, ka ēdamo plēvju īpašības var būtiski ietekmēt pievienotās vielas un to koncentrācijas.

Pārtikā tiek plaši izmantotas plēves no hitozāna, pateicoties tā zemajai mitruma caurlaidībai un paaugstinātajām antioksidativajām un antibakteriālajām īpašībām. Lai samazinātu hitozāna plēvju pašizmaksas, to ir izdevīgi ražot kopā ar citiem biopolimēriem. Šajā gadījumā mainās šķīdumu reoloģiskās īpašības un no tā izveidoto plēvju funkcionālās īpašības. Vienā no pētījumiem [79] bija pārbaudītas ēdamas plēves, kuru pamatā ir hitozāna un cietes maisījumi, kā piedeva ūdens ekstrakts no ugni jeb Čīles gvajāvas (*Ugni molinae Turcz)* lapām, kuras bagātas ar fenolskābēm (gallskābi, miricetīnu u.t.t.), kā plastifikators bija pievienots glicerīns. Hitozāna sajaukšana ar lapu ekstraktu izraisīja strukturālu veidojumu veidošanos, izveidojās neviendabīgs slānis (16. attēls). Rezultātā ekstrakta pievienošana samazināja ēdamo plēvju izstiepšanu un izturību un palielināja biezumu.

Pašlaik ļoti populāras kļūst ēdamas plēves no augļu biezeņa. To pagatavošana ir diezgan viegla, jo pamatsastāvdaļa ir augļu biezenis ar pievienotu plastifikatoru, tos izžāvē [80]. Šāda veida iepakojumi ir ne tikai veselīgi, bet arī garšīgi.



15. attēls – *L. monocytogenes* inhibīcijas zonu.
A - nanoemulsija ar pretmikrobialam piedevām;,
B - pretmikrobialas piedevās nav,
C - pretmikrobialo piedevu maisījums AA, NIZ , LA,
D – kontrole.



16. attēls –Ēdamas plēves, hitozāna (CH) , hitozāna +cietes(CH-CS), hitozāna + lapu ekstrakts, (CH-PELM), hitozāna +ciete+ lapu ekst hitozāna + lapu ekstrakts, rakts, (CH-CS-PELM). Mērogs 5 mm, × 5000

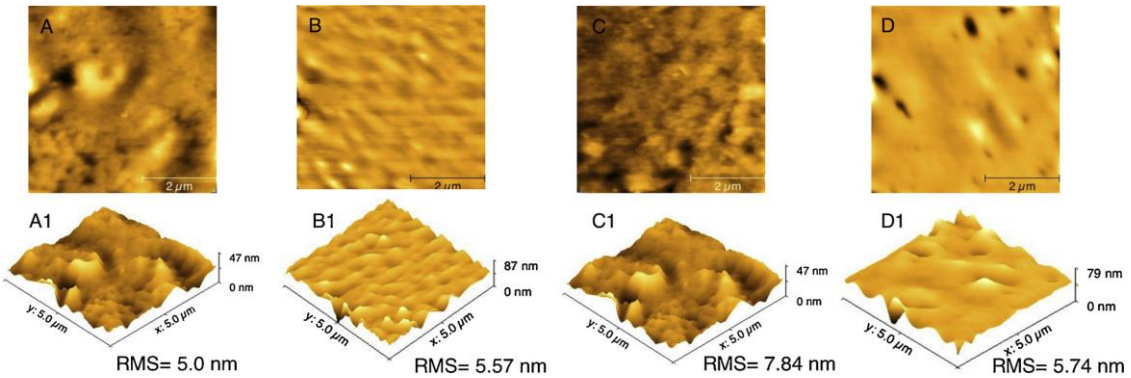
Pēdējos gados pastiprināta uzmanība ir pievērsta mikrobiālās izcelsmes EPS. Tas ir saistīts ar šo biopolimēru unikālajām īpašībām - pateicoties lielai molekulmasai tiem ir izteiktas biopolimēru īpašības. EPS šķīdumiem ir suspendējošas, emulgējošas īpašības, tie spēj mainīt ūdens *reoloģiskās īpašības*. Šāda veida biopolimērus izmanto pārtikas, farmācijas, tekstilizstrādājumu, ķīmijas, medicīnas un lauksaimniecības nozarēs [81,82, 83]. Pasaules tirgū pieprasījums pēc mikrobiālās izcelsmes EPS nepārtraukti pieaug. To apstiprina ksantāna baktēriālo biopolimēru (*eksopolisaharīdu*) ražošanas pieaugums, kā arī arvien jaunu mikrobiālās izcelsmes biopolimēru atklāšana. Mikrobiālais polisaharīds (PS) jeb biopolimērs ir kurdlāns (producē baktērija *Alcaligenes*

faecalis)[84], emulsāns (producē *Acinetobacter calcoaceticus*) [85], dekstrāns (producē *Leuconostoc dextranicum)*, levāns (producē *L.mesenteroides, Zymomonas mobilis),* bioceluloze (producē *Komagataeibacter* (agrāk *Gluconacetobacter*) *spp),* zanflo (producē *Erwinia tahitrisica)*, ksantāns (producē *Xanthomonas campestris*, polimiksāns (producē *Bacillus polymyxa)* [86].

Daudzi mikroorganismi spēj sintezēt EPS, tomēr, biopolimēru iznākums ir ļoti atkarīgs no baktēriju celma un kultivēšanas apstākļiem (pH, aerācija, vielu koncentrācija, temperatūra, spiediens utt.) [87].

Bakteriālās izcelsmes eksopolisaharīdi aktivizē ķermeņa aizsardzību, palielinot izturību pret vīrusiem un infekcijām [88,89]. Efektīvs veids kā var uzglabāt eksopolisaharīdus ir liofilizācija. Tad netiek zaudētas biopolimēra īpašības un bioloģiskā aktivitāte. Liofilizēti EPS viegli šķīst ūdenī, un tos var viegli izgulsnēt spirtā [90]. Bet, piemēram, žāvēšana augstā temperatūrā noved pie tā, ka polimēri kļūst higroskopiski, zaudējot daudzas īpašības - fermenti slikti tos noārda, nešķīst ūdenī un zaudē bioloģisko aktivitāti.

Vienā no pētījumiem levāna sintēzei izmantoja baktēriju *Bacillus subtilis natto* CCT 7712, kuru tālāk izmantoja ēdamās plēvēs ražošanai, vēl otra pamatsastāvdaļa bija maniokas ciete. Tika izvēlētas četras receptūras ar cietes: levāna proporcijām attiecīgi 100: 0, 90:10, 80:20 un 70:30. Kā plastifikatoru izmantoja glicerīnu (20 g / 100 g cietvielu). Cieti ar glicerīnu samaisīja ar destilēto ūdeni un izturēja 95°C, 10 minūtes, viegli to maisot. Iegūto šķīdumu atdzesēja līdz 60°C un tālāk sajauca to ar levānu (noteiktā koncentrācijā saskaņā ar izvēlēto receptūru). Šķīdumu lēja silikona formās (0,47 g formēšanas šķīdums uz cm^{-2}). Žāvēja (35°C) žāvēšanas skapī ar piespiedu ventilāciju, aptuveni 20 stundas. Iegūtajām ēdamajām plēvem (četri veidi) bija labs izskats, bez gaisa burbuļiem un plaisām. Iegūto plēvju mikroskopija parādīja kompaktu un viendabīgu struktūru, kas norāda uz labo saderību starp polimēriem (17. attēls). Levāna pievienošana radīja plēvi ar lielāku šķīdību, stiepes izturību un pagarinājumu, bet zemāku ūdens tvaiku caurlaidību. Secināts, ka, izmantojot levānu kā komponentu ēdamo plēvju ražošanā, uzlabojas to barjeru un mehāniskās īpašības. Turklāt izmantot levānu maisījumos ar zemas izmaksas un augstas pieejamības materiālu tādu, kā ciete, ir rentabli [91].



17. attēls. Ēdamas plēves ar maniokas cieti un levānu, ciete:levāns 100: 0 (A), ciete:levāns 90:10(B), ciete:levāns 80:20 (C), ciete:levāns 70:30 (D).

Vēl vienā pētījumā pētītas ēdamās plēves uz dekstrāna un sorbitola bāzes. Dekstrāns iegūts, izmantojot baktēriju celmu *Leuconostoc mesenteroides* T3. Plēvju formēšanas šķīdumu gatavoja ar 1,5 – 4,5 % dekstrānu (tabula 2.). To šķīdināja siltā (50°C) destilētā ūdenī vienu stundu. Pēc tam pievienoja sorbitolu dažādās koncentrācijās (tabula 1.) un turpināja maisīt vēl vienu stundu istabas temperatūrā. Iegūto formēšanas šķīdumu salēja silikona formās un žāvēja 25°C, 48 stundas. Iegūto plēvi noņēma no silikona formas, glabāja 25°C temperatūrā un 50 % relatīvajā gaisa mitrumā. Iegūto plēvju biezums bija 70 µm.

Iegūtajām ēdamajām plēvēm tika pētītas mehāniskās un ūdens tvaika barjeras īpašības. Secināts, ka dekstrāna un sorbitola koncentrācijai bija ievērojama ietekme uz plēves ūdens tvaiku caurlaidību. Dekstrāns 3,40% koncentrācijā un sorbitols 20,43% koncentrācijā ēdamajai plēvei radīja zemāko ūdens tvaiku caurlaidību bet visaugstāko stiepes izturību un elastību [92].

Pēdejos gados ēdamās plēves sāktas plaši izmantot ne tikai pārtikas ražošanā, bet arī farmācijā terapeitiskas iedarbības vielu iepakošanā, piemēram probiotikām. Apstrādājot zāles ar ēdamajām plēvēm, ražotājs atrisina vienu no būtiskākajām problēmām - pasargā to aktīvās sastāvdaļas no kuņģa agresīvās vides.

2.tabula

Plēvju formēšanas šķīduma komponentu koncentrācijas

Paraugs	Sastāvdaļu koncentrācijas	
	A: dekstrāns, %	B: sorbitols, %
1	3.00	10.0
2	3.00	25.0
3	1.50	25.0
4	3.00	25.0
5	3.75	32.5
6	4.50	25.0
7	3.75	17.5
8	3.00	25.0
9	2.25	17.5
10	3.00	40.0
11	2.25	32.5
12	3.00	25.0
13	3.00	25.0

Ir divi veidi, kā apvienot ārstniecisko vielu ar ēdamo plēvi - aktīvo vielu iekļaušana ēdamo plēvju sastāvā vai arī kapsulu veidošana no ēdamajām plēvēm, kuras pēc tam piepilda ar zālēm [93]. Vienā no pētījumiem aprakstīta probiotiku ievadīšana ēdamajā plēvē, ko izmanto terapeitiskos nolūkos. Ar to apstrādāja maizi. Plēves sastāvā ietilpa nātrija algināts un piena sūkalu olbaltumvielas ar *Lactobacillus rhamnosus GG*. Uz maizes tika izsmidzināts pārklājums, 10 min. žāvēts 60°Ctemperatūrā. Tika konstatēts, ka maizes matrica pēc iekļūšanas kuņģa-zarnu traktā neaktivizē probiotikas darbību. Probiotiķa klātbūtne neietekmēja maizes novecošanas procesu, fizikāli ķīmiskās, termiskās un strukturālās īpašības. Pārklājot atsevišķas maizes šķēli, kas sver 30–40 g un apēdot vienu šādu šķēli, var nodrošināt organismu ar 7,57–8,98 KVV probiotiskām baktērijām, kas pilnībā atbilst Pasaules Veselības organizācijas (PVO) ieteikumiem [94].

Zinātnieki ierosina izmantot ēdamās plēves/pārklājumus kā efektīvu līdzekli dzīvo probiotisko baktēriju šūnu iekapsulēšanai un saglabāšanai. Piemēram, vienā no pētījumiem [95] plēvei pievienoja polisaharīdu kefirānu, kurš izdalīts no kefīra. Tas spēj veidot elastīgas, caurspīdīgas plēves. Plēvēm pievienoja *Lactiplantibacillus plantarum* un raugu *Kluyveromyces marxianus*. Rezultātā baktēriju un rauga dzīvotspēja būtiski paaugstinājās.

Ēdamaās plēves var izmantot kā apvalku zālēm, lai efektīvi tās nogādātu resnajā zarnā, iepriekš nesašķeļot kuņģī [96, 97]. Tādēļ tika pētītas plēves, kuru pamatsastāvs bija hitozāns un ciete. Hitozāna pievienošana cietes plēvēm ievērojami uzlabojā to mehāniskās un morfoloģiskās īpašības, kā arī termisko stabilitāti. Pārbaudot ar antibiotiku antofloksacīnu, konstatēts, ka palielinoties hitozāna saturam, samazinās zāļu difūzijas koeficients un plēves šķīdība ūdenī [98].

Tika pārbaudītas ēdamās plēves no cietes ar ksantāna sveķu un nātrija tripolifosfāta piedevām, lai kontrolētu tādu zāļu, kā ibuprofēna, kofeīna, inulīna uzsūkšanās spēju organismā. Konstatēts, ka šai plēvei ir zema zāļu caurlaidība [99]. Savukārt ēdamajām plēvēm no cietes un pektīna ir fiksēta laba noturība pret aizkuņģa dziedzera enzīmiem. Tas padara tās piemērotas cieto zāļu formu pārklāšanai [100].

Pašlaik polimēru un pārtikas ķīmijas, kā arī ķīmiskās tehnoloģijas jomā ir svarīgi apvienot gan zinātnisko pētniecību, gan ražotāja izmēģinājumus. Pētījumi ēdamā iepakojumā jomā ir jāpaplašina un jādažādo. Veicot plašākus pētijumus, šajā virziena var sasniegt ievērojamus rezultātus un panākumus. Joprojām ir ļoti maz informācijas par ķīmisko, mikrobioloģisko, fizioloģisko ēdamo iepakojumu komponentu ietekmi uz pārtikas produktiem, galvenokārt uz to uzturvērtību un drošību cilvēkiem. Nepieciešams veikt sistemātiskus pētījumus par vairāku polimēru, piemēram, polisaharīdu un olbaltumvielu, kombināciju šķīdumā un cietās fāzēs, lai pētītu to saderību, fāzes stāvokli un mijiedarbības specifiku. Literatūrā ir pieejami dati par formēšanas šķīdumu īpašību izpēti,

piemēram, viskozitātes atkarība no formēšanas šķīdumu sastāva, deformācijas, temperatūras, kā arī reoloģisko parametru aprēķināšana, bet tie ir nepietiekami, fragmentāri pētījumi. Pētījumiem, kas raksturotu ēdamās plēves, jābūt vērstiem uz mehānisko, termisko, optisko īpašību, mitruma caurlaidības, eļļas izturības, antibakteriālās iedarbības pret dažādiem mikroorganismiem u.t.t. izpēti.

Ēdamais iepakojums pilnībā atbilst mūsdienās populārajai "zaļajai" tendencei, tie ir produkti un tehnoloģijas, kas ir nekaitīgas cilvēkiem un videi. Pašlaik var droši apgalvot, ka ēdamo plēvju un pārklājumu ražošanas uzņēmumi palīdzēs samazināt atkritumu daudzumu un nodrošināt ilglaicīgo pārtikas produktu kvalitātes saglabāšanos, ka arī nodrošinās ērtības patērētājiem.

KOPSAVILKUMS

Pozitīvie aspekti:

1. Gan dabiskās izcelsmes no augiem un dzīvniekiem iegūtie biopolimēri (hitozāns, bišu vasks, karnaubvasks, šellaka sveķi, kandelila vasks), gan mikroorganismu sintezētie biopolimēri (kurdlāns, pullulāns, skleroglikāns, elsināns, levāns, alternāns, dekstrāns, gellāns, BC) nav toksiski, tos pašus vai tos sintezējošās baktērijas ir atļauts izmantot pārtikas rūpniecībā;
2. Konkrētie biopolimēru izmantošanas virzieni atkarīgi no to fizikāli-ķīmiskajām īpašībām, kas ir diezgan dažādas. Izmantošana noteikti neaprobežojas tikai ar pārtikas ražošanu, bet tie bieži izmantojami ļoti daudzveidīgi un netradicionāli - arī farmācijā, medicīnā, kosmetologijā, trauku ražošanā, keramikas glazūrās un vēl daudzās citās nozarēs;
3. Mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimēri parasti ir ar lielāku molmasu un tādēļ ir ar vairāk izteiktām polimēru īpašībām - pārklājuma/plēvju veidošanas spējām, plēves izturības, elastības, spīdīguma, barjerīpašībām. Konkrētās īpašības tomēr ir ļoti atkarīgas no izvēlēto producentu celmiem, no biosintēzes substrātiem un sintezēšanas, izdalīšanas vides apstākļiem;
4. Biopolimērus var lietot uzturā arī veģetārieši un diabēta slimnieki;
5. Daudziem mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimēriem ir atrastas antimikrobiālas, antivirālas īpašības. Daļa var būt kā antikoagulanti, ar pretvēža iedarbību, ar holesterīnu pazeminošām īpašībām u.t.t. Daudz kas ir vēl pētījumu stadijā. Tas viss ļoti paplašina biopolimēru potenciālās izmantošanas iespējas un jomas;
6. Biopolimēru pārklājumi ir bez garšas un smaržas, parasti tie neietekmē, nemaina apstrādāto produktu dabiskās sensorās īpašības;
7. Daļa biopolimēru var būt kā pārtikas konservanti;
8. Tie visi ir dabai draudzīgie "zaļie" iepakojumi. Dabisko mikrobioloģisko procesu ietekmē viegli noārdās, nerada bīstamus sadalīšanās produktus, līdz ar to apkārtējo vidi nepiesārņo.

Problēmas, kas vēl būtu jāpēta:

1. Ražošanas tehnoloģijas. Lai mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimērus varētu izmantot plašāk, tos nepieciešams iegūt lētāk un pietiekami lielos apjomos. Tas nozīmē pielāgot lētus fermentēšanas substrātus, atrast jaunus un netradicionālus substrātus - vēlams, pārtikas ražošanas blakusproduktus, pārtikas ražošanas atkritumus, reizē samazinot arī nepārstrādātu atkritumu daudzumu, kas nonāk apkārtējā vidē;
2. Nepieciešams izdalīt iespējami produktīvākās mikroorganismu sugas un celmus dažādu mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimēru sintēzei;
3. Iespējams atrast vēl arī citus perspektīvus biopolimērus, kuri varētu būt labi piemēroti izmantošanai svaigu augļu, ogu pārklājumiem;
4. Konkrētās augļu un ogu apstrādes tehnoloģijas ar biopolimēriem ir jāpielāgo individuāli katram apstrādājamā produkta veidam:
    1. dažus var apsmidzināt, dažus iemērkt, dažus var abos veidos;
    2. dažiem jau pirms pārklājumu uzklāšanas nepieciešami pasākumi mikrobioloģisko bojājumu samazināšanai.
    3. Šādas nianses ir ļoti būtiskas, bet vēl joprojām nav pietiekami izpētītas;
    4. Ir iespējams uzklāt arī pārāk biezu pārklājumu. Tas augļos, ogās var izraisīt anaerobos procesus, līdz ar to nelabvēlīgi ietekmējot produkta garšu, aromātu, sabojājot to neatgriezeniski;
5. Īpašību mērķtiecīga izmainīšana un vadīšana, lietojot biopolimērus kompleksā ar citām vielām - ļoti perspektīva joma, bet daudz kas tehnoloģiski ir vēl jāpēta.

2. SADAĻA: BIOPOLIMĒRU IEGŪŠANAS METODOLOĢIJA

BAKTERIĀLAS CELULOZES IEGŪŠANA – PROTOKOLS

Barotnes

Barotņu sagatavošana BC iegūšanai

Barotņu un kultivācijas trauku sterilizācija.

1. Autoklāvā ielej destilētu ūdeni (1,5 L);
2. Tajā ievieto statīvu, uz kura atradīsies sterilizējamie objekti. Ievietojot borosilikāta stikla pudeles ar barotnēm, pudeles korķi aizgriež līdz galam un tad par 90 grādiem atgriež vaļā. Sterilizējamās kolbas aiztaisa ar vates-marles korķi un pa virsu korķim uzliek papīru, to piesien pie kolbas;
3. Autoklāvam uzliek vāku un kārtīgi to nostiprina;
4. Ieslēdz autoklāvu. Autoklāvēšana notiek 121°C, 1,5 atm, 30 min. (Harrigan et al. 1998);
5. Pēc sterilizācijas un autoklāva atdzesēšanas, izņem sterilus traukus no autoklāva. Borosilikāta stikla pudelēm korķus aizgriež līdz galam. Traukus uzglabā tām paredzētajā laboratorijas tīrajā zonā. Tālākas manipulācijas ar traukiem un barotnēm veic sterilos apstākļos, strādājot lamināras plūsmas boksā.

Standarta HS barotnes sagatavošana

Hestrin-Schramm (HS) barotne tiek izmantota eksperimentālos nolūkos kā standarta barotne etiķskābes baktēriju augšanai un BC sintēzes novērtēšanai.

Barotnes sastāvs: glikoze, 20 g/L, (Sigma-Aldrich, ASV), rauga ekstrakts, 5 g/L (Biolife, Itālija), liellopu gaļas bakterioloģiskais peptons, 5 g/L, citronskābe, 1,15 g/L, $MgSO_4$, 0,2 g/L, Na_2HPO_4, 2,7 g/L.

Barotnes sagatavošana:

1. Ieslēdz elektroniskus svarus;
2. Uz svariem nosver augšminētās HS barotnes komponentes (izņemot glikozi);
3. Nosvērtās komponentes ievieto vārglāzē;
4. Glikozi ievieto atsevišķā vārglāzē. Tas tiek darīts, jo autoklavēšanas laikā glikoze var noreaģēt ar citām barotnē esošām ķīmiskām vielām;
5. Barotnes komponentes izšķīdina destilētā ūdenī, ūdeni piepildot līdz 1 L atzīmei mērcilindrā. Šķīdums tiek sadalīts pa pusēm un pārnests atbilstošās vārglāzēs;
6. Barotnes komponentes izšķīdina līdz galam, novietojot vārglāzi uz magnētisko maisītāju;
7. Izšķīdušās komponentes no vārglāzēm pārnes borosilikāta stikla pudelēs (katra vārglāze atbilstošā pudelē) (1. attēls);
8. Pudeles autoklāvē 121°C 30 min;
9. Pēc sterilizācijas ļauj barotnēs atdzesēties;
10. Sterilajos apstākļos samaisi glikozi ar pārējiem komponentēm (2. attēls). Barotņu pH tiek pārbaudīts ar pH metru;
11. Sterilajos apstākļos pH tiek pieregulēts, ar pipeti barotnēm pievienojot 0,1 M HCl šķīdumu atbilstoši optimālajam mikroorganismu kultivācijas starta pH 6,0 ± 0,1;
12. Uzglāba barotni ledusskapī.

Sūkalu izmantošana

Sūkalu sagatavošanas standarta procedūra

Eksperimentos tiek pārbaudītas sūkalas kā alternatīvs un lēts substrāts etiķskābes baktēriju augšanai un to eksopolisaharīdu sintēzei. Siera sūkalas tika saņemtas no A/S Rankas Piens (3. attēls). Sūkalu sastāvs ir apkopots 1. tabulā. Neapstrādāto sūkalu sastāva analīzes tika veiktas SIA *J. S. HAMILTON* laboratorijā. Laktoze, glikozes un galaktozes koncentrācija tika noteikta, izmantojot laktozes un tās monomēru – glikozes un galaktozes enzīmatiskās kontroles reaģentu komplektus (Megazyme, Īrija).

1. tabula

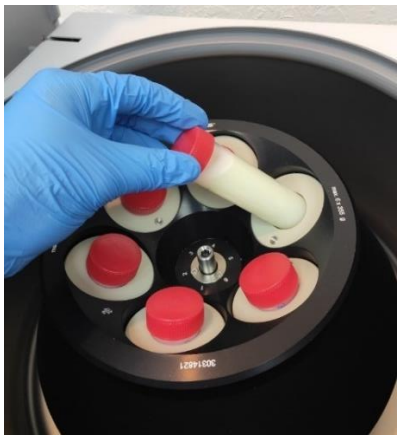
Siera sūkalu sastāvs.

Sastāvs	Mērvienība	Koncentrācija
Laktoze	g/L	47 – 49
Glikoze	g/L	0,8 – 1,1
Galaktoze	g/L	0,3 – 0,4
Proteīni	g/L	8
Tauki	g/100 g	0,8
Mg	mg/100 g	7,83
K	mg/100 g	164
Na	mg/100 g	48,1
Ca	mg/100 g	38,7

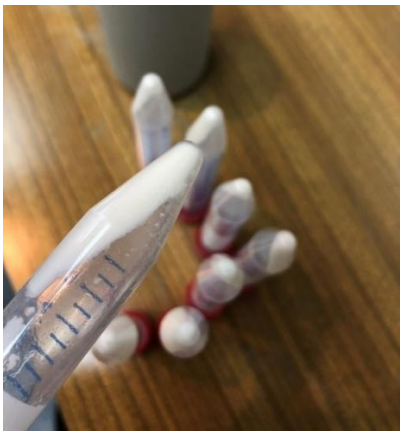
1. attēls. Sūkalas spainī, 15 L. Saņemtas no A/S Rankas Piens.

Barotnes sagatavošana:

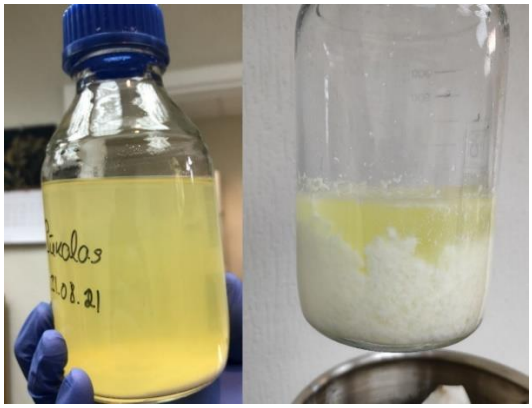
1. Sūkalas izņem no saldētavas un ļauj izkust;
2. Sūkalas pārnes 1 L vārglāzē;
3. Karsē 10 minūtes +90°C nedaudz maisot, lai panāktu proteīna daļēju izgulsnēšanos;
4. Pēc kasēšanas sūkalas centrifugē 8 000 rpm 10 min (FC5816, OHAUS, Vācija), lai atdalītu izgulsnējušos proteīnus (2. attēls). Tas nodrošina proteīnu kopkoncentrācijas samazināšanu no ~8 g/L līdz ~3 g/L (noteikts eksperimentāli), kas būtiski ietekmē baktēriju augšanu (augsta proteīnu koncentrācija inhibē augšanu un polimēru sintēzi);
5. Pēc centrifugēšanas, sūkalu supernatantu pārlej borosilikāta stikla pudelēs un sterilizē autoklavā +121°C 30 min;
6. Pēc sterilizācijas procedūras ļauj šķīdumam atdzesēties;
7. Iegūtai sūkalu barotnei ievērojot sterilitātes prasības regulē pH līdz 6,0 ± 0,1 ar 0,1 M HCl šķīdumu, lai panāktu optimālo baktērijas augšanas pH.



2. attēls. Sūkalu barotnes centrifugēšana 8 000 rpm 10 min.



3. attēls. Izgulsnēts sūkalu proteīns pēc centrifugēšanas.



4. attēls. Sūkalu barotne pēc standarta pirmsapstrādes un sterilizācijas (pa kreisi), neapstrādātas sūkalas pēc sterilizācijas (pa labi).

Sūkalu enzimātiskā hidrolīze

Laktoze ir galvenais limitējošais faktors sūkalu barotnē, tāpēc, lai veicinātu BC sintēzi un mazinātu piesārņojušo vielu daudzumu sūkalās, ir ieteikts veikt sūkalu enzimātisko hidrolīzi. Hidrolīzes laikā laktoze tiks šķelta uz glikozi un galaktozi:

1. Pēc sūkalu standarta pirmsapstrādes tiek pazeminātsūkalu pH līdz pH 5, kas atbilst optimālam līmenim enzīma aktivitātei (Das et al. 2015)
2. 250 mL sūkalu pievieno 0,83 mL β-galaktozidāzes enzīma (35 U/mL; Megazyme, Īrija), lai panāktu pietiekamu enzīma aktivitāti (Das et al. 2015).

3. Inkubē kratītājā 240 min, +35°C temperatūrā, pie 120 apgriezieniem minūtē. Uzkarsē līdz +80°C, lai tiktu inaktivēts β-galaktozidāzes enzīms. Pirms barotnes sterilizēšanas pH regulē uz pH 7.

Sūkalas ar kukurūzas ekstraktu

Eksperimentu ietvaros tika noteikts, ka KE var kalpot kā laba piedeva sūkalu barotnei. KE veicina BC sintēzi un arī sūkalās esošu vielu patēriņu. Pēc standartas sūkalu pirmsapstrādes procedūras sūkalām pievieno KE 15 g/L un veic sterilizāciju. KE sastāvs apkopots 2. tabulā.

2. tabula

KE sastāvs

Sastāvs	Mērvienība	Koncentrācija
Glikoze	g/L	55,2
Saharoze	g/L	4,3
Fruktoze	g/L	3,3
Proteīni	%	37

Ābolu sulas izmantošana BC iegūšanai

Āboli (*Malus domestica*) tika iegūti no vietējām saimniecībām (Latvija, Bauskas nov.). Ābolu sula tika mehāniski izspiesta ar mehāniskās sulas spiedes palīdzību un tika tālāk pasterizēta. Izspiestā ābolu sula tika sadalīta 0,5 L porcijās un sasaldēta –20°C. Izmantotās ābolu sulas cukuru sastāvs: 20,10 ± 2,14 g/L glikozes, 72,88 ± 2,28 g/L fruktozes un 65,73 ± 3,73 g/L saharozes.

Pati pa sevi ābolu sula nespēj nodrošināt augstu BC sintēzi, bet var kalpot ka labs C avots. Eksperimentu laikā bija noteikts, ka gaļas ekstrakts ir labākā no izmantotajām N piedevām. Ābolu sulas barotnes sagatavošanai izmanto sulu, kas atšķaidīta ar ūdeni 1:2 (sula : ūdens) un pievieno 15 g/L gaļas ekstrakta. Pirms sterilizācijas ir nepieciešams padarīt barotnes pH neitrālu ar 1M NaOH šķīdumu.

BC produkcijai izmantotie mikroorganismu celmi

Eksperimentu ietvaros tika noteikti optimālie celmi BC produkcijai alternatīvajās barotnēs:

- ***Komagataeibacter rhaeticus* P 1463** – sūkalu barotne, enzimātiski hidrolizēta sūkalu barotne un sūkalu barotne ar 15 g/L KE.
- ***Novacetimonas hansenii* MSCL 1646** (bijušais *Komagataeibacter hansenii* B22) – ābolu sulas barotne (1:2) ar 15 g/L gaļas ekstraktu.

Sejmateriāla sagatavošana

1. Laminārajā plūsmas boksā (BAVnp-01-"Laminar S"-1,2, Lorica, Krievija) ievērojot sterilitāti, 50 mL barotnes pārnes ar seroloģisko pipeti 100 mL koniskajā kolbā;
2. Barotnei pievieno 5 mL atbilstošas kultūras sējmateriāla (10%), kas iepriekš uzglabāta –18°C ar 10% glicerīna piedevu (13. attēls);
3. Sējmateriālu turpmākiem eksperimentiem audzē izmatojot orbitālo kratītāju-inkubatoru (ES-20, Biosan, Latvija) ar rotācijas intensitāti 150 rpm, 24 h, +30°C temperatūrā (5. attēls).

5. attēls. Inokulāta sagatavošana kratītajā-inkubatorā.

pH kontrole

pH vērtība var būtiski ietekmēt polimēra producentu augšanu un produkta daudzumu. Pēc sterilizēšanas barotņu pH tiek pieregulēts ar 0,1 M HCl šķīdumu atbilstoši optimālajam pH = 6,0 ± 0,1 (6. attēls). Visa eksperimenta laikā pH tiek kontrolēts pēc 3 mL paraugu noņemšanas (pirmajā, piektajā un 10. dienā).

6. attēls. pH noteikšana melases paraugā, izmantojot pH metru.

BC producentu kultivācija

1. Ievērojot sterilitāti (lamināras plusmas boksā), 50 mL barotnes tika pārnestas ar seroloģisko pipeti 300 mL koniskajās kolbās. Lai nodrošinātu pietiekamu atkārtojumu skaitu, katram pētāmam lielumam tika veikti vismaz seši atkārtojumi.

2. Eksperimenta gaitā, ņemot vērā eksperimentā izmantotu nelielu barotnes daudzumu (50 mL) un konisku kolbu izmēru (300 mL), tika ievērota optimāla barotnes virsmas un tilpuma attieciba 50 mL / 75 cm^2 (Ruka et al. 2012);
3. Eksperimentos sējmateriālu pievieno 5% koncentrācijā (2,5 mL);
4. BC producenti tiek kultivēti statiski termostatā (BD56, Binder, Šveice) +30°C temperatūrā, 10 diennaktis, tās eksponenciālās augšanas fāzes posma ietvaros (Harrigan 1998) (7., 8. attēli).

7. attēls. Statiskā BC kultivācija termostatā +30°C.

8. attēls. Statiskā BC kultivācija termostatā +30°C.

Paraugu noņemšana eksperimenta gaitā

No kolbām noņem 1 – 3 mL paraugus (atkarībā no analīzēm), lai noteiktu pH, ka arī cukuru un organisko skābju. Paraugus analizē pirmajā (eksperimenta sākumā) un 10. kultivācijas dienā (9. attēls).

9. attēls. Paraugu ņemšana (1 – 3 mL) sterilajos apstākļos eksperimenta laikā.

BC pēcapstrāde

BC atmazgāšana un sausa svara noteikšana

1. Kultivācijas beigās BC plēves ar pinceti izņem no kolbām un pārnes varglāzēs ar 300 mL +30°C destilēta H_2O (10. attēls);
2. Vārglāzes ievieto kratītājā uz 15 min ar 150 rpm (12. attēls);
3. Pēc skalošanas cikla beigām ūdeni nomaina un procesu atkārto vēl divas reizes;
4. Pēc trešās skalošanas reizes ūdens varglāzē tika nomainīts uz iepriekš sagatavotiem 200 mL 0,1 M NaOH, un BC plēves tiek karsētas 20 min +90°C temperatūrā, lai atbrīvotos no biomasas un barotnes paliekām (13. attēls) (Semjonovs et al. 2017a);
5. 0,1 M NaOH nomaina uz destilēto H_2O, un atkārto skalošanas procedūru vēl divas reizēs līdz pH paliek neitrāls. Izmantojot pinceti, BC paraugus izņem no vārglāzes un nosusina starp filtrpapīra loksnēm 10 min laikā (14. attēls);
6. Izmantojot svarus (Kern PLS, Kern, Vācija) nosver svarglāzes;
7. Tajās ievieto BC paraugus;
8. Ievieto svarglāzes žāvskapī (2B-151,OZMO, PSRS) +105°C temperatūrā uz 24 h, lai pilnībā atbrīvotos no H_2O. Svarglāzes vāciņus atstāj vaļā, lai netraucētu ūdens iztvaikošanai;
9. Pēc kaltēšanas, ar pinceti aiztaisi svarglāzes vāciņu un izņem tās no žāvskapja (15. attēls);
10. BC sauso svaru nosaka gravimetriski (bez vākiem) izmantojot to aprēķinot pēc formulas (Harrigan 1998):

$$BC\ sausais\ svars = S_1 - S_0$$

kur, S_1 – svarglāzes svars kopā ar izkaltēto BC, g/L;

S_0 – svarglāzes svars bez BC, g/L;

BC sausais svars tiek kontrolēts visos paraugos.

10. attēls. Mitra BC plēve pēc kultivācijas.

11. attēls. Mitras BC salīdzinājums: augšā – biezāka BC plēve no HS barotnes; apakšā – plānāka un caurspīdīgāka BC plēve no sūkalu barotnes.

12. attēls. BC plēvju atmazgāšana dH_2O kratītajā-inkubatorā.

13. attēls. BC plēves vārīšana NaOH, lai atbrīvotos no šūnu un barotnes atliekam.

14. attēls. BC plēves nosusināšana pēc atmazgāšanas, pirms žāvēšanas.

15. attēls. Izkaltēti BC paraugi svarglāzēs.

16. attēls. Izkaltētu paraugu svēršana uz elektriskiem svariem.

17. attēls. Izkaltēta BC plēve.

BC biotehnoloģisko radītāju noteikšana

Produktu iznākuma noteikšana

Produktu iznākums (no substrāta vienības) tika noteikts pēc formulas:

$$Y_{P/S} = \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1} \times 100\%$$

kur, $Y_{P/S}$ – iznākums no patērētā substrāta;

P_0 – BC sausais svars eksperimenta sākumā, g/L (tika pieņemts par 0);

P_1 – BC sausais svars eksperimenta beigās, g/L;

S_0 – substrāta koncentrācija barotnē eksperimenta sākumā, g/L;

S_1 – substrāta koncentrācija barotnē eksperimenta beigās, g/L.

BC produktivitātes noteikšana

BC produktivitāte (dienās) tika noteikta pēc formulas:

$$Q_X = \frac{X_1 - X_0}{t}$$

kur, Q_X – BC produktivitāte dienās;

X_0 – BC sausais svars eksperimenta sākuma, g/L (tika pieņemts par 0);

X_1 – BC sausais svars eksperimenta beigās g/L;

t – kultivācijas ilgums, dienas.

Metabolītu kontrole

Paraugu un veicamie testi

- **HS barotnes** paraugiem tika noteikta glikoze koncentrācija, izmantojot glikozes enzimātiskās noteikšanas reaģentu komplektus (ENRK) – D-glucose assay procedure K-GLUC 08/18 (GOPOD-format, Megazyme, Īrija);
- **Sūkalu barotnes** paraugiem tika noteiktas laktoze, glikoze un galaktozes koncentrācijas. Laktozes un galaktozes koncentācijas tika noteiktas, izmantojot ENRK pēc–Lactose & D-galactose (Rapid) assay procedure K-LACGAR 03/20 (Megazyme, Īrija);
- **Ābolu sulas barotnēs** tika noteiktas glikozes, fruktozes, saharozes. Saharozes koncentrācija tika noteikta, izmantojot ENRK pēc – Sucrose, D-fructose and D-glucose assay procedure K-SUFRG 04/18 (Megazyme, Īrija);
- Etiķskābes noteikšana visiem paraugiem, izmantojot ENRK pēc – Acetic acid assay procedure K-ACET 04/18 (Megazyme, Īrija);
- Glikonskābes noteikšana visiem paraugiem, izmantojot ENRK pēc – D-gluconic acid / D-glucono-δ-lactone assay procedure K-GATE 04/20 (Megazyme,Īrija).

18. attēls. ENRK laktozes/galaktoze un saharozes/fruktozes/glikozes noteikšanai.

Glikozes noteikšana

Glikozes noteikšanai tiek izmantots *D-glucose assay procedure K_GLUC 08/18* (Megazyme, Īrija) enzimātiskas noteikšanas reaģentu komplekts (ENRK).

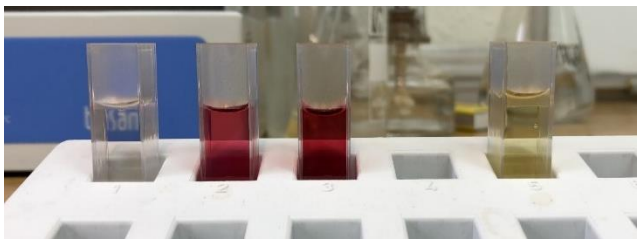
Darba gaita:

1. Absorbcijas lasījumi tiek veikti pie 510 nm viļņu garuma;
2. Tiek sagatavotas kivetes eksperimentam. Tiek atzīmētas *blank* un *standard* kivetes;
3. Visās kivetēs iepilda 3 mL GOPOD reaģenta;
4. Kivetē, kas atzīmēta kā *standart* pievienot 0,1 mL standarta šķīdumu (D-Glucose standard);
5. Parauga kivetēs pievieno pašu paraugu 0,1 mL atbilstošā atšķaidījumā;
6. *Blank* kivetei pievieno destilētu ūdeni 0,1 mL;
7. Visas kivetes samaisa un liek inkubēties 40 – 50°C grādos uz 20 minūtēm (19. attēls);
8. Nolasa absorbcijas rādījumus un veic aprēķinus;
9. $\mathrm{D-glucose\ (\mu g/0{,}1\ mL)} = \frac{\Delta A_{Sample}}{\Delta A_{D-Glucose\ standard\ (100\mu g)}} \times 100$

3. tabula

Reakcijas apkopojums.

Reaģenti kivetē	Blank	Standarts	Paraugs
GOPOD reaģents	3,0 mL	3,0 mL	3,0 mL
D-Glucose standarts	-	0,1 mL	-
Paraugs (ar atbilstošu atšķaidījumu)	-	-	0,1 mL
Buferis	0,1 mL	-	-
20 min inkubācija 40 – 50°C, izmērīt A_1 absorbciju			



19. attēls. Krāsas izmaiņas reakcijas laikā pēc inkubācijas 20 min.

Laktozes un galaktozes noteikšana

Laktozes un galaktozes noteikšanai tiek izmantots *Lactose & D-galactose (Rapid) assay procedure K-LACGAR 02/21* (Megazyme, Īrija) enzimātiskas noteikšanas reaģentu komplekts (ENRK).

Princips: Reakcijas pamatā ir paraugā esošas laktozes hidrolīze ar β-galaktozidāzes enzīmu (no *Aspergillus niger*). Reakcijas rezultātā tiek veidota galaktoze, kas reaģējot ar β-galaktozes dehidrogenāzi veido NADH. NADH, kas ir paralēli proporcionāls laktozes koncentrācijai tiek detektēts, izmantojot sepktrofotometru (340 nm). Izmantojot iegūtus datus un atbisltošas formulas, tiek noteikta laktozes un galaktozes koncentrācija. Reakcijai nepieciešami reaģentu tilpumi ir apkopoti 4. tabulā.

4. tabula

Reakcijas apkopojums

Reaģenti kievetē	**Laktoze**		**Galaktoze**	
	Blank	Paraugs	Blank	Paraugs
Paraugs (ar atbilstošu atšķaidījumu)	-	0,20 mL	-	0,20 mL
Solution 4 (β-Galactosidase)	0,20 mL	0,20 mL	-	-
10 min inkubācija 25°C				
Destilētais H_2O	2,20 mL	2,00 mL	2,40 mL	2,20 mL
Solution 2 (bufferis)	0,20 mL	0,20 mL	0,20 mL	0,20 mL
Solution 3 (NAD+)	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL
3 min inkubācija 25°C. Izmērīt A_1 absorbciju				
Suspension 5 (β-GalDH/GaIM)	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL
6 min inkubācija istabas 25°C. Izmērīt A_2 absorbciju				

Darba gaita:

1. Absorbcijas lasījumi tiek veikti pie 340nm viļņu garuma;
2. Tiek sagatavotas kivetes eksperimentam atsevišķi laktozei un galaktozei. Tiek atzīmētas *blank* un paraugu kivetes;
3. Gan laktozes, gan galaktozes paraugu kivetēs pievieno pašu paraugu 0,2 mL atbilstošā atšķaidījumā;
4. Laktozes visās kivetēs pievieno 0,2 mL *solution 4* (β-Galactosidase);
5. Samaisa un liek inkubēties uz 10 minūtēm 25°C grādos;
6. Tālāk pievieno destilētu ūdeni: laktozes kivetēm – *blank* 2,20 mL un parauga 2 mL, galaktozes kivetēm – *blank* 2,40 mL un parauga 2,20 mL;
7. Visām kivetēm pievieno 0,20 mL *solution 2* (buffer) un 0,10 mL *solution 3* (NAD^+);
8. Samaisa un aptuveni pēc 3 minūtēm nolasa pirmos absorbcijas rādītājus (A_1)
9. Sāk reakciju pievienojot visām kivetēm *suspension 5* (β-GalDH/GaIM);
10. Samaisa un aptuveni pēc 5 minūtēm nolasa pēdējos absorbcijas rādījumus (A_2);
11. Iegūtos rezultātus ievieto *Megazyme excel* kalkulāciju tabulā un iegūst paraugos esošo cukuru koncentrāciju g/L;
12. $c = \frac{V*MW}{\varepsilon*d*v} * \Delta A \left[\frac{g}{L}\right]$

    V = gala tilpums (mL);

    MW = vielas molekulmasa (g/mol);

    ε = ekstinkcijas koeficients NADH 340 nm = 6300 ($l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$);

    d = gaismas ceļš (kivetes platums) (cm);

    v = parauga tilpums (mL).

Saharozes noteikšana

Saharozes/glikozes/fruktozes noteikšanai tiek izmantots *Sucrose, D-fructose and D-glucose assay procedure K-SUFRG 04/18* (Megazyme, Īrija) enzimātiskas noteikšanas reaģentu komplekts (ENRK). Nepieciešami raģentu tilpumi ir apkopoti 5. tabulā.

Princips: D-glikozes koncentrāciju nosaka pirms un pēc saharozes hidrolīzes ar β-fruktozidāzi (invertāzi). D-fruktoze saturu nosaka līdzīgi kā nosaka D-glikozes saturu tikai pēc izomerizācijas ar fosfoglikozes izomerāzi (FGI). Pie pH 7,6 heksokināze (HK) katalizē D-glikoze ar adenozīna-5'-trifosfātu (ATP) līdz glikozes-6-fosfātam (G-6-P) ar vienlaicīgu adenozīna-5'-difosfāta veidošanos (ADP). Heksokināze arī katalizē D-fruktozes fosforilēšanos līdz fruktozes-6-fosfāts (F-6-P) ar adenozīna-5'-trifosfātu (ATP). Pie pH 4,6 saharozi hidrolizē ar β-fruktozidāzi līdz D-glikozei un D-fruktoze.

5. tabula

Reakcijas apkopojums

Reaģenti kivetē	**Saharoze**		**D-glikoze/D-fruktoze**	
	Blank	Paraugs	Blank	Paraugs
Solution 6 (β-fructosidase)	0,20 mL	0,20 mL	-	-
Paraugs (ar atbilstošu atškaidījumu	-	0,10 mL	-	0,10 mL
5 min inkubācija 25 – 30°C				
Destilēts ūdens	2,00 mL	1,90 mL	2,20 mL	2,10 mL
Solution 1 (buferis)	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL
Solution 2 ($NADP^+$/ATP)	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL
3 min inkubācija, izmērīt A_1 absorbciju				
Suspension 3 (HK/G6P-DH)	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL
5 min inkubācija, izmērīt A_2 absorbciju				
Suspension 4 (PGI)	-	-	0,02 mL	0,02 mL
10 min inkubācija, izmērīt A_3 absorbciju				

Darba gaita:

1. Absorbcijas lasījumi tiek veikti pie 340 nm viļņu garuma;
2. Tiek sagatavotas kivetes eksperimentam atsevišķi saharozei un glikozei/fruktozei. Tiek atzīmētas *blank* un *standard* kivetes;
3. Saharozes visās kivetēs iepilda 0,20 mL *solution* 6 (β - fructosidase) un paraugu kivetēs pievieno arī pašu paraugu 0,10 mL, atbilstošā atšķaidījumā;
4. Glikozes / fruktozes paraugu kivetēs pievieno tikai pašu paraugu 0,10 mL;
5. Samaisa un ievieto termostatā inkubēties uz 5 min 25 – 30°C grādos;
6. Saharozes *blank* kivetei pievieno 2 mL destilēta ūdens, bet paraugu kivetei pievieno 1,90 mL destilēta ūdens. Glikozes/fruktozes *blank* kivetei pievieno 2,20 mL destilēta ūdens, bet paraugiem pievieno 2,10 mL destilēta ūdens;
7. Visās kivetēs pievieno *solution 1* (buffer) 0,10 mL un *solution 2* ($NADP^+$/ATP) 0,10 mL;
8. Samaisa visas kivetes un aptuveni pēc 3 min nolasa pirmos absorbcijas rādītājus (A_1);
9. Tālāk tiek sākta reakcija, visām kivetēm pievienojot *suspension 3* (HK/G6P-DH) 0,02 mL;
10. Samaisa visas kivetes un aptuveni pēc 5 min nolasa otros absorbcijas rezultātus (A_2), ja reakcija vēl nav beigusies, turpina nolasīt absorbcijas rezultātus ar 2 min intervālu;
11. Saharozes tests ir beidzies šajā posmā;
12. Glikozes/fruktozes kivetēm vēl pievieno *suspension 4* (PGI) 0,02 mL, samaisa un aptuveni pēc 10 min nolasa trešos absorbcijas rezultātus (A_3);
13. Iegūtos rezultātus ievieto *Megazyme excel* kalkulāciju tabulā un iegūst paraugos esošo cukuru koncentrāciju g/L;
14. $c = \frac{V*MW}{\varepsilon*d*v} * \Delta A \left[\frac{g}{L}\right]$

V = gala tilpums (mL);

MW = vielas molekulmasa (g/mol);

ε = ekstinkcijas koeficients NADPH at 340 nm = 6300 ($l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$);

d = gaismas ceļš (kivetes platums) (cm);

v = parauga tilpums (mL).

Etiķskābes noteikšana

Etiķskābes noteikšanai tiek izmantots *Acetic acid assay procedure K-ACET 04/18* (Megazyme, Īrija) ENRK. Nepieciešami raģentu tilpumi ir apkopoti 7. tabulā.

Princips: Acetil-koenzīma A sintetāze (ACS) notiek adenozīna-5-trifosfāta (ATP) un koenzīma A (CoA) klātbūtnē pārvēršot etiķskābi (acetātu) acetil-CoA, veidojoties adenozīnam-5'- monofosfātam (AMP) un pirofosfātam. Citrāta sintāze (CS), acetil-CoA klātbūtnē oksaloacetātu pārvērš citrātā. Reakcijā nepieciešamais oksaloacetāts tiek veidots no L-malāta un nikotinamīda-adenīna dinukleotīda (NAD+) klātbūtnē L-malāta dehidrogenāze (L-MDH). Šajā reakcijā NAD+ ir reducēts līdz NADH.

7. tabula

Reakcijas apkopojums

Reaģenti kivetē	Blank	Paraugs
Destilēts ūdens	2,10 mL	2,00 mL
Paraugs (ar atbilstošu atšķaidījumu)	-	0,10 mL
Solution 1 (buferis)	0,50 mL	0,50 mL
Solution 2 (NAD^+/ATP/PVP/CoA)	0,20 mL	0,20 mL
3 min inkubācija, izmērīt A_0 absorbciju		
Suspension 3 (L-MDH/CS)	0,02 mL	0,02 mL
4 min inkubācija, izmērīt A_1 absorbciju		
Suspension 4 (ACS)	0,02 mL	0,02 mL
12 min inkubācija, izmērīt A_2 absorbciju		

Darba gaita:

1. Absorbcijas rādījumus nolasa pie 340 nm viļņu garuma;
2. Tiek sagatavotas kivetes darbam. Uz kivetēm veic *blank* un paraugu atzīmes;
3. Visās kivetēs iepilda destilētu ūdeni: *blank* kivetē 2,10 mL un paraugu kivetēs 2 ml;
4. Paraugu kivetēs tiek pievienots pats paraugs 0,10 mL;
5. Tad tiek pievienots *solution 1* (buffer) visās kivetēs 0,50 mL, kā arī *solution 2* (NAD^+/ATP/PVP/CoA) visās kivetēs 0,20 mL;
6. Samaisa un aptuveni pēc 3 minūtēm nolasa pirmos absorbcijas rādījumus (A_0) visām kivetēm;
7. Tad sāk reakciju, pievienojot *suspension 3* (L-MDH/CS) visās kivetēs 0,02 mL;
8. Samaisa un aptuveni pēc 4 minūtēm nolasa otro absorbcijas rādījumu (A_1) visām kivetēm;
9. Tālāk sāk nākamo reakciju, pievienojot *suspension 4* (ACS) visās kivetēs 0,02 mL.
10. Samaisa un aptuveni pēc 12 minūtēm nolasa pēdējo – trešo absorbcijas rādījumu (A_2) visām kivetēm;
11. Iegūtos rezultātus ievieto *Megazyme excel* kalkulāciju tabulā un iegūst paraugos esošās etiķskābes koncentrāciju g/L;
12. $c = \frac{V*MW}{\varepsilon*d*v} * \Delta A_{acetic\ acid}\ [g/L]$

    V = gala tilpums (mL);

    MW = etiķskābes molekulmasa (g/mol);

    ε = ekstinkcijas koeficients NADH 340 nm = 6300 ($l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$);

    d = gaismas ceļš (kivetes platums) (cm);

    v = parauga tilpums (mL).

Glikonskābes noteikšana

Glikonskābes noteikšanai tiek izmantots *D-gluconic acid / D-glucono- -lactone assay procedure K-ACET 04/18* (Megazyme, Īrija) ENRK. Nepieciešami raģentu tilpumi ir apkopoti 8. tabulā.

Princips: D-glikonskābi (D-glikonātu) ar adenozīna-5'-trifosfātu (ATP) un fermentu fosforilē par D-glikonāta 6-fosfāta glikonāta kināzi (GCK), veidojot adenozīna-5'- difosfāts (ADP). Nikotinamīda-adenīna dinukleotīda fosfāta klātbūtnē (NADP+), D-glikonāts-6-fosfāts ir oksidatīvi dekarboksilēts ar 6-fosfoglukonāta dehidrogenāzi (6-PGDH) līdz ribulozei-5- fosfātu, veidojot samazinātu nikotinamīda-adenīna daudzumu dinukleotīda fosfāts (NADPH).

8. tabula

Reakcijas apkopojums

Reaģenti kivetē	Blank	Paraugs
Destilēts ūdens	2,10 mL	2,00 mL
Paraugs (ar atbilstošu atšķaidījumu)	-	0,10 mL
Solution 1 (buferis)	0,20 mL	0,20 mL
Solution 2 ($NADP^+$/ATP)	0,20 mL	0,20 mL
Suspension 3 (6-PGDH)	0,02 mL	0,02 mL
5 min inkubācija, izmērīt A_1 absorbciju		
Suspension 4 (GCK)	0,02 mL	0,02 mL
6 min inkubācija, izmērīt A_2 absorbciju		

Darba gaita:

1. Absorbcijas lasījumi tiek veikti pie 340 nm viļņu garuma;
2. Metabolīta noteikšanai tiek sagatavotas kivetes. Uz kivetēm veic *blank* un paraugu atzīmes;
3. Visās kivetēs iepilda destilētu ūdeni: b*lank* 2,10 mL un paraugu kivetēs 2 mL;
4. Paraugu kivetēs pievieno pašus paraugus 0,10 mL;
5. Pievieno *solution 1* (buffer) visās kivetēs 0,20 mL, kā arī *solution 2* ($NADP^+$/ATP) tādā pašā daudzumā visās kivetēs 0,20 mL;
6. Kā pēdējo pievieno *suspension 3* (6-PGDH) visās kivetēs 0,02 mL;
7. Samaisa un pēc aptuveni 5 minūtēm nolasa pirmos absorbcijas rādījumus (A_1);
8. Pēc rādījumu nolasīšanas tiek uzsākta reakcija, pievienojot *suspension 4* (GCK) visām kivetēm 0,02 mL;
9. Samaisa un reakcijas beigās, aptuveni pēc 6 min, nolasa pēdējo absorbcijas rādījumu (A_2);
10. Iegūtos rezultātus ievieto *Megazyme excel* kalkulāciju tabulā un iegūst paraugos esošās glikonskābes koncentrāciju g/L;
11. $c = \frac{V*MW}{\varepsilon*d*v} * \Delta A_{D-gluconic\ acid}\ [g/L]$

    V = gala tilpums (mL);

    MW = D-glikonskābes molekulmasa (g/mol);

    ε = ekstinkcijas koeficients NADPH 340 nm = 6300 ($l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$);

    d = gaismas ceļš (kivetes platums) (cm);

    v = parauga tilpums (mL).

Proteīnu koncentrācijas noteikšana sūkalās

Proteīnu koncentrācija sūkalās nosaka, izmantojot Bredforda reaģenta krāsu reakciju (Kruger 2009), krāsu reakcijas intensitāti kontrolējot ar spektrafotometru (UV5Bio, Mettler Toledo, Šveice).

Bredforda metode ir ātrs un precīzs proteīnu noteikšanas tests, kas tiek plaši pielietots laboratorijās. Bredforda tests balstās uz krāsvielas *Coomassie Blue* G250 saistīšanos ar paraugā esošām olbaltumvielām. Detalizēti pētījumi liecina, ka brīvā krāsviela var pastāvēt četros dažādos veidos jonu formās, kurām pKa vērtības ir 1,15, 1,82 un 12,4 (2). No trim uzlādētas krāsas formas, kas dominē skābā testa reaģenta šķīdumā, katjoniskākajām sarkanajām un zaļajām formām ir absorbcijas maksimums pie 470 un 650 nm attiecīgi. Turpretī krāsvielas anjoniskākā zilā forma, kas saistās ar olbaltumvielām, absorbcijas maksimums pie 590 nm. Tādējādi daudzums olbaltumvielu var noteikt, nosakot krāsvielu daudzumu zilajā jonā formā. To parasti panāk, mērot šķīduma absorbciju pie 595 nm.

Ir zināms, ka krāsa visspēcīgāk saistās ar arginīna un lizīna atlikumiem olbaltumvielas un mazākā mērā arī histidīnu un aromātiskās atliekas (triptofāns, tirozīns un fenilalanīns). Šī specifika var izraisīt atšķirības testa reakcija uz dažādiem proteīniem, kas ir galvenais trūkums šai metodei.

Materiāli

1. Testa reaģenta pagatavošana: 100 mg *Coomassie Blue* G250 reaģenta izšķīdina 50 ml 95% etanola kolbā.
2. Pēc tam šķīdumu sajauc ar 100 ml 85% fosforskābes un uzpilda līdz 1 L ar destilētu ūdeni.
3. Reaģents filtrē caur filtru *Whatman* No1 un pēc tam uzglabā kolbā tumsā istabas temperatūrā. Tas ir stabils 4 – 6 nedēļas (20. attēls). Tomēr šajā laikā no šķīduma un tā uzglabātais reaģents var izgulsnēties krāsviela, tāpēc pirms lietošanas ir nepieciešams atkārtoti nofiltrēt šķīdumu.
4. Olbaltumvielu standarta pagatavošana: liellopu γ-globulīns koncentrācijā 1mg / ml (100 μg / ml mikrotestam) destilētā ūdenī izmanto kā pamatšķīdumu. Šis jāuzglabā sasaldēti mazās alikvotās –20°C temperatūrā.
5. Testā izmantotajiem plastmasas un stikla izstrādājumiem jābūt pilnīgi tīriem un bez mazgāšanas līdzekļiem. Kvarca (silīcija dioksīda) spektrofotometra kivetes nedrīkst lietot, jo krāsviela testā reaģents saistās ar šo materiālu un būtiski ietekmē reakciju.

20. attēls. Bredfora reaģenta sagatavošana. Reaģenta filtrēšana pirms paraugu analīzes.

21. attēls. Sūkalu barotnes proteīnu koncentrācijas noteikšana ar Bredforda analīzi.

22. attēls. Paraugu analīze ar Bredforda reaģentu sūkalu barotnēs. PRoteīņu patēriņa novērtējums eksperimenta sākuma, vidū un beigās.

Standarta testa metode

1. Mēģenē pārnes no 10 līdz 100 µg olbaltumvielu parauga, pievienojot līdz 100 µL kopējā tilpuma. Ja aptuvenā olbaltumvielu koncentrācija paraugā nav zināma, pārbaudiet diapazonu atšķaidījumu (1, 1/10, 1/100, 1/1000). Katram paraugam ir nepaciešams sagatavot atkārtojumus;
2. Kalibrēšanas līknes sagatavošana pipetē 10, 20, 40, 60, 80 un 100 µL tilpumus 1 mg / ml γ-globulīna standartšķīduma mēģenēs un katru uzpilda līdz 100 µL ar destilētu ūdeni. Pipetē 100 µL destilēta ūdens atsevišķā mēģenē lai sagatavotu *blank* reaģentu;
3. Katrā mēģenē pievieno 5 mL testa reaģenta un labi samaisa, apgriežot vai maigi vorteksējot. Svarīgi izvairieties no putām, kas novedīs pie sliktas rezultātu reproducējamības;
4. Parauga absorbciju izmēra pie 595 nm garumā un olbaltumvielu standartus salīdzinājumā ar *blank* reaģentu 5 līdz 60 minūtes pēc sajaukšanas. Standarta pārbaudei, kas satur 100 µg olbaltumvielu, absorbcijas 595 vērtībai jābūt apmēram 0,4. Standarta līkne nav lineāra, un precīza absorbcija mainās atkarībā no testa reaģenta vecuma;
5. Olbaltumvielu koncentrāciju nosaka, izmantojot statistiskas analīzes programmas (JASP vai SPSS), iegustot regresija vienādojum, un ievietojot iegūtus datus formulā:

$$\mu g\ proteīnu = \frac{Absorbcija - y\ šķersošanas\ punkts}{slīpums}$$

PROBIOTISKO BAKTĒRIJU *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS K12*, UN *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* SUGU IZMANTOŠANA FERMENTĀCIJĀ EKSOPOLISAHARĪDA (EPS) VEIDOŠANAI – PROTOKOLS

1. Metodes pielietojums

Probiotisko baktēriju *Streptococcus salivarius K12, Leuconostoc mesenteroides,* sugu augšanai un fermentācijā EPS veidošanai.

2. Analizējamais paraugs

Iegūtie EPS paraugi: levāns un dekstrāns, kā arī barotnes substrāts pēc fermentācijas tika analizēti, izmantojot šķidruma hromatogrāfijas metodes.

3. Materiāli, metodes, reaģenti un iekārtas:

3.1. **Nepieciešamais aprīkojums EPS iegūšanai, mikroorganismi, to uzturēšanas un kultivācijas apstākļi, barotnes:**

- Baktērija EPS producents (*Streptococcus salivarius K12, Leuconostoc mesenteroides), var arī izmantot citu producentu.*
- *Streptococcus salivarius K12 tika izolēts no* dabiskās mutes mikrofloras, un tā identitāte tika pārbaudīta, izmantojot PCR testu (1). Savukārt *Leuconostoc mesenteroides* suga iegādāta no NCTC baktēriju kolekcijas.[1]
- Kultūras saglabā sasaldētas. Ņem 1 ml baktēriju suspensijas *MRS Broth* (1. tabula) vai *Nutrient Broth* barotnē un pārvieto 2 ml Ependorfa stobriņā, pievieno 1 ml 50% sterila glicerola, samaisa vorteksējot un ievieto glabāšanai – 80ºC saldētavā. Kultūru aktivē pārsējot atbilstošā barotnē (2; 3; 4) un 48 h audzējot 37˚C temperatūrā.

1. tabula.

Barotnes sastāvs *probiotisko baktēriju* kultivācijai eksopolisaharīdu ieguvei, MRS modificēta barotne (MRS broth)

Komponentes	Koncentrācija, g/L
Peptone	10
Beef Extract	10
Yeast Extract	5
Sucrose	20
Di-potassium Hydrogen Phosphate	2
Sodium Acetate	5
Di-amonium Citrate	2
Magnesium Sulphate	0.2
Manganous Sulphate	0.05
Tween® 80	1

[1] https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/bacteria/detail.jsp?refId=NCTC+10817&collection=nctc

3. tabula.

MRS agara sastāvs references kultūru reaktivēšanai (MRS agar) [2]

Komponentes	**Koncentrācija, g/L**
Peptone	10
Beef Extract	10
Yeast Extract	5
Glucose	20
Di-potassium Hydrogen Phosphate	2
Sodium Acetate	5
Di-amonium Citrate	2
Magnesium Sulphate	0.2
Manganous Sulphate	0.05
Tween® 80	1
Agar	15

- Saldētava -80°C *Labfreez instruments* (kultūras saglabāšanai).
- Analītiskie svari ar svēršanas precizitāti 0,0002 *'Kern EW'* (barotņu sagatavošanai).
- Sterilas cilpas
- 2ml sterili stobriņi
- Etanols dehidrētais 99,5%
- *Sterilas* Petri *plates* (tīrkultūru reaktivēšanai).
- Autoklāvs barotņu sterilizēšanai, caurplūdes režīmā *Sanyo Labo Autoclave* (0.5 at,15 min, 121°C).
- Autoklāvējamās laboratorijas pudeles ar iedaļām, ar skrūv. PP vāciņiem. Tilpums, ml 2000
- Laminārais *bokss* BIO II A/M (Telstar, Spānija)
- Optiskā blīvuma mērītājs Densitometrs DEN-1B
- McFarland standartu komplekts (0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0)
- Cirkulārais maisītājs Vortex
- Sterilie stobriņi 50ml
- Centrifūga **LMC-4200R** 7 min, 9500 apgr./min, 0°C
- Ledusskapis Whirlpool W5 911E
- Sublimēšanas kalte - liofilizators - FreeZone -50 °C 0.038.

4.Metodes apraksts

4.1. Tīrkultūru reaktivēšana

Efektīvam fermentācijas procesam izmanto svaigas mikroorganismu kultūras (*Streptococcus salivarius K12, Leuconostoc mesenteroides),* atkausē tīrkultūru un reaktivē uz neselektīvā agara (De Man, Rogosa and Sharpe, MRS agar, tabula 2.) Petri *platē.* Baktēriju tīrkultūru inkubē 48h +37°C. (ISO 9332:2003), lai nodrošinātu sterilu apkārtējo vidi darbu veic laminārā *boksā*. Subkultivētās mikroorganismu kultūras var uzglabāt ledusskapī +2+6 °C temperatūrā ne ilgāk kā 3 dienas un šajā periodā tās var izmantot darba kultūru iegūšanai. Tomēr vēlams būtu izmantot svaigi reaktivētās kultūras.

[2] http://biolifeit.com/public/cartellina-allegati-schede-certificazioni/schede-tecniche-inglese/TS-541728.pdf

4.2. Fermentācijas procesa apraksts

- Autoklāvējamās laboratorijas pudelēs (ml 2000) ar iedaļām, iesver MRS modificēto barotni (koncentrācija 27,6 g/L) katrā pudelē ielej 0,5 litri ūdens, kārtīgi samaisa un autoklāvē, oglekļa avotu var palielināt no 2% līdz 15% (litrā saharozes).
- Sterilizēšanas / autoklāvēšanas režīms (0.5 at, 15 min, 121°C).
- Ar McFarland standartu 3.0 vai 4.0 nokalibrē iekārtu (Densitometrs DEN-1B).
- Reaktivētās mikroorganismu kultūras pēc inkubācijas izmanto testa suspensijas iegūšanai. Ņem mēģeni ar 9 ml sterila fizioloģiskā šķīduma (0,9% NaCl) iepriekš uzsildīta termostatā 32,5 ± 2,5°C temperatūrā. Ar sterilo cilpu ņem kultūru no agara virsmas un pārnes mēģenē. Virpinot cilpu pirkstos, panāk kultūras suspendēšanos šķīdumā. Mēģenes saturu sajauc maisītājā Vortex un mēra suspensijas optisko blīvumu. Šādi rīkojas vairākkārt līdz iegūta kultūras suspensija ar optisko blīvumu pēc McFarland standarta 3.0 - 4.0 (10^8 – 10^9 KVV/ml). Paralēli, lai apstiprinātu tīrkultūras suspensijas koncentrāciju, veic uzsējumus (izmantojot MRS agaru).
- Iegūto tīrkultūras suspensiju (5 ml) pievieno sterilai MRS barotnei (tilpumā 0.5l, vai arī citiem baktēriju augšanas substrātiem, piemēram, sterilajām piena sūkalām atbilstoši protokolam ME.PL.012.2021. Piena sūkalu izmantošana fermentācijā procesa eksopolisaharīda (EPS) veidošanai).
- Fermentē 96 stundas jeb 4 diennaktis temperatūrā +37 ±1°C, substrāta maisīšanas ātrums (20 apgr. min^{-1}).
- Pēc fermentācijas substrātu ielej 50 ml stobriņos (pa 45 ml) un atdala baktēriju šūnas centrifugējot (7 min, 9500 apgr./min, 0°C).
- Nocentrefugētu substrātu ielej pudelēs 2000 ml (pa 500 ml).
- Daļu substrāta (10 ml) ņem analīzei, nosakot tam glikozes, fruktozes, saharozes, glikonskābes, etiķskābes un fruktānu koncentrācijas (izmantojot gāzu hromatogrāfu (Clarus 580), kas aprīkots ar liesmas jonizācijas detektoru.).
- Pie nocentrefugētā substrata pielej dehidrēto etanolu (99,5%), attiecība 1:3 (1 daļa substrāta : 3 daļas etanola jeb 100 ml substrāta pret 300 ml etanola).
- EPS izgulsnē 48h +4 °C, lai iegūtu to tīrību, izgulsnēšanu jāveic divas, trīs reizes (iegūto eksopolisaharīdu izšķaida ūdeni un atkārtoti izgulsnē ar dehidrēto etanolu).
- Pēc izgulsnēšanas šķidro frakciju nolej (lai nezaudētu etanolu, to ietvaicē ar rotācijas ietvaicētāju), bet cietāko frakciju pārlej 50 ml stobriņos un centrifugē (7 min, 9500 apgr./min, 0°C).
- Iegūto EPS sublimē/kaltē liofilizatorā – 50°C 0.038 bar 24 h.
- Iegūtām EPS nosaka polimerizācijas pakāpi, noteikšanai izmanto ultra augstas izšķirtspējas šķidrumu hromatogrāfu Waters Acquity UPLC H-class, kas aprīkots ar kvaternārās darbības sūkni Quaternary Solvent Manager un degazācijas iekārtu, kā arī ar automātisko paraugu ievadīšanas sistēmu, kolonnas termostatu un fluorescentās gaismas detektoru.
- EPS uzglabā hermētiskā iepakojumā sausā telpā +2 līdz +8°C.

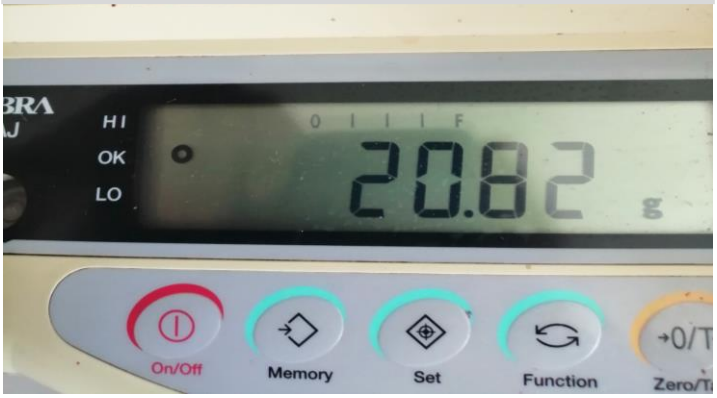
Attēli no biopolimēra sintēzes procesa

Biopolimēra sintēzes process

Etanola

Substrāts pēc 48h +4 ^{o}C etanola pievienošanas

Biopolimēra iznākums no 1 L substrāta



PIENA SŪKALU IZMANTOŠANA EKSOPOLISAHARĪDU IEGUŠANAI FERMENTĀCIJAS PROCESĀ – PROTOKOLS

1. Metodes pielietojums

Sūkalu izmantošana fermentācijā EPS veidošanai (1).

2. Analizējamais paraugs

Piena sūkalas. Ķīmiskais sastāvs noteikts, izmantojot šķidruma hromatogrāfijas metodes (1. tabula).

3. Materiāli, reaģenti un iekārtas:

a. Nepieciešamie materiāli un reaģenti EPS iegūšanai:

- Plīts un katls sūkalu karsēšanai.
- Autoklavējamās laboratorijas pudeles ar iedaļām, ar skrūvējamiem PP vāciņiem. Tilpums, ml 2000.
- Filtrpapīrs un piltuves.
- Centrifūga LMC-4200R 10 min, 1000 apgr./min, 0°C.
- Analītiskie svari ar svēršanas precizitāti 0,0002 *'Kern EW'* (barotņu sagatavošanai).
- *pH metrs.*
- Sterili stobriņi 50ml.
- Spektrofotometrs.
- *Sterilas* Petri *plates* (uzsējumu sagatavošanai).
- 10 ml un 1000 µl pipetes un sterili pipešu uzgaļi (atšķaidījuma sagatavošanai).
- *Termostats ar kratītāju*, (fermentēšanas procesa nodrošināšanai).

Nepieciešamie materiāli, iekārtas, baktēriju reaktivēšanai un EPS ieguvei, uzglabāšanai, sk. protokolā "Probiotisko baktēriju *Streptococcus salivarius* K12, un *Leuconostoc mesenteroides* sugu izmantošana fermentācijā EPS veidošanai".

4.Metodes apraksts

4.1. Piena sūkalu apstrāde barotnes sagatavošanai

- Piena sūkalas tika iegādātas no uzņēmuma "Rankas Piens". Iegādāto sūkalu ķīmiskie radītāji atspoguļoti tabulā 1.
- Sūkalas karsē 100°C temperatūrā 30 minūtes, pēc tam filtrē caur filtrpapīru (1. attēls), lai noņemtu redzamās, cietās piena atliekas un centrifugē pie
  10 000 apgriezieniem 10 minūtes, lai iegūtu dzidru šķīdumu gaiši zaļganā krāsā (2).
- Iegūtajām sūkalām pievieno 5% saharozi (var arī vairāk līdz pat 15%) izmantojot to kā oglekļa avotu, rauga ekstraktu 0.5% un K_2HPO_4 0,5% (kālija hidrogēnfosfātu).
- Sākotnējam pH pirms autoklāvēšanas jābūt 7 (to jānormalizē ar NaOH 0,2 M (nātrija hidroksīds)).
- Sagatavoto barotni autoklāvē režīmā: 0.5 at, 15 min, 121°C.

1. tabula

Fermentācijas procesā izmantoto sūkalu ķīmiskie radītāji

Test	Method	Unit	Result
* Protein (N*6,25)	PB-116 ed. III of 11.08.2020	%	0,8
Acidity	PN-75/A-86130	%	0,2
* Lactose (as monohydrate)	PB-265 ed. II of 27.11.2020	%	4,7
* Fat	PN-75/A-86130	g/100g	0,80
* Magnesium	PB-223/ICP, ed. II of 12.01.2015	mg/100 g	7,83
* Potassium	PB-223/ICP, ed. II of 12.01.2015	mg/100 g	164
* Sodium	PB-223/ICP, ed. II of 12.01.2015	mg/100 g	48,1
* Calcium	PB-223/ICP, ed. II of 12.01.2015	mg/100 g	38,7

4.2. Fermentācijas procesa apraksts

Tīrkultūras reaktivēšanu jāveic saskaņā ar protokolu "*Probiotisko baktēriju Streptococcus salivarius K12,* un *Leuconostoc mesenteroides* sugu izmantošana fermentācijā eksopolisaharīda (EPS) veidošanai".

- Barotni fermentē ar 10 % tīrkultūras sējmateriālu (OD 1 pie 600 nm), lai pārbaudītu sējmateriāla aktivitāti. Paralēli veic uzsējumu izmantojot MRS agaru (ja fermentēšanas procesā tiek izmantota baktēriju suga *Leuconostoc mesenteroides,* agaram jāpievieno 30 µg/mL vankomicīnu ($C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$), lai to padarītu par selektīvo, uzsējumi jāveic līdz desmitajai pakāpei).
- Fermentēšana jāveic 48 stundas, 30°C (2. attēls).
- EPS izgulsnēšanu (3. attēls), ieguvi (4. attēls) un uzglabāšanu veic saskaņā ar protokolu "*Probiotisko baktēriju Streptococcus salivarius K12,* un *Leuconostoc mesenteroides* sugu izmantošana fermentācijā eksopolisaharīda (EPS) veidošanai".

1. attēls. Piena sūkalu filtrēšana pēc karsēšanas

2. attēls. Piena sūkalas pēc 48 stundu fermentācijas

3. attēls. Piena sūkalas pēc 48 stundu izgulsnēšanas

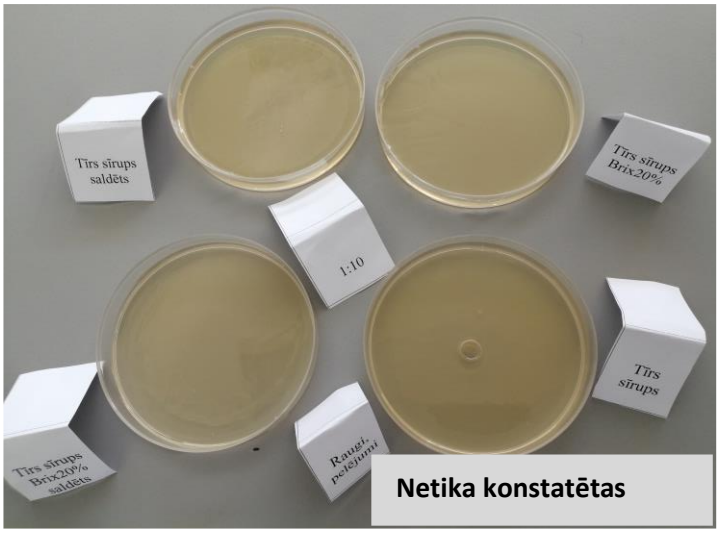
4. attēls. Piena sūkalu izveidotais EPS pēc centrifugēšanas

Literatūras saraksts

1. Vaibhao K Lule, Rameshwar Singh, Sarang D Pophaly, Poonam, Sudhir K Tomar. (2016) *Production and structural characterisation of dextran from an indigenous strain of Leuconostoc mesenteroides BA08 in Whey.* Society of Dairy Technology. 69, 1-12.
2. Abiodun I, Sanni A A, Onilude S T, Ogunbanwo I F and Fadahunsi R O A (2002) Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods in Nigeria. European Food Research and Technology. 214, 405–407.

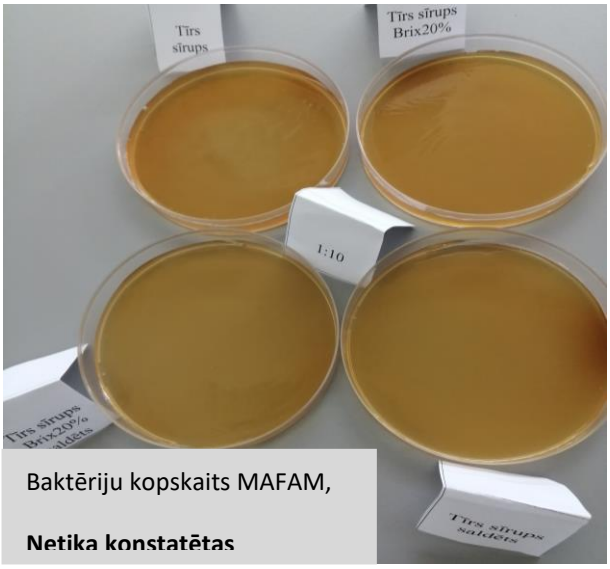
KRŪMCIDONIJU SĪRUPA IZVERTEŠANA, KĀ *POTENCIĀLU OGLEKĻA AVOTU* EKSOPOLISAHARĪDA (EPS) *SINTĒZEI*

Projekta realizēšanas laikā tika meklēti piemēroti blakusprodukti EPS sintēzei. Viens no blakusproduktiem, kā substrāts fermentācijas procesam levāna un/vai dektrāna biosintēzei ir krūmcidoniju (*Chaenomeles japonica*) sīrupu, kas veidojas sukāžu ražošanā. Ļoti būtiski pirms fermentācijas procesa nodrošināt izejvielas un taras sterilitāti. Tādēļ tika pārbaudīta krūmcidoniju sīrupa mikrobioloģiskā drošība. Tika vērtēti četri krūmcidoniju sīrupa paraugi (tīrs sīrups, tīrs sīrups pēc saldēšanas, atšķaidīts sīrups līdz 20% Brix, atšķaidīts sīrups līdz 20% Brix pēc saldēšanas). Paraugiem noteikta raugu un pelējumu klātbūtne 1. attēls, kā arī baktēriju kopskaita noteikšana 2. attēls.



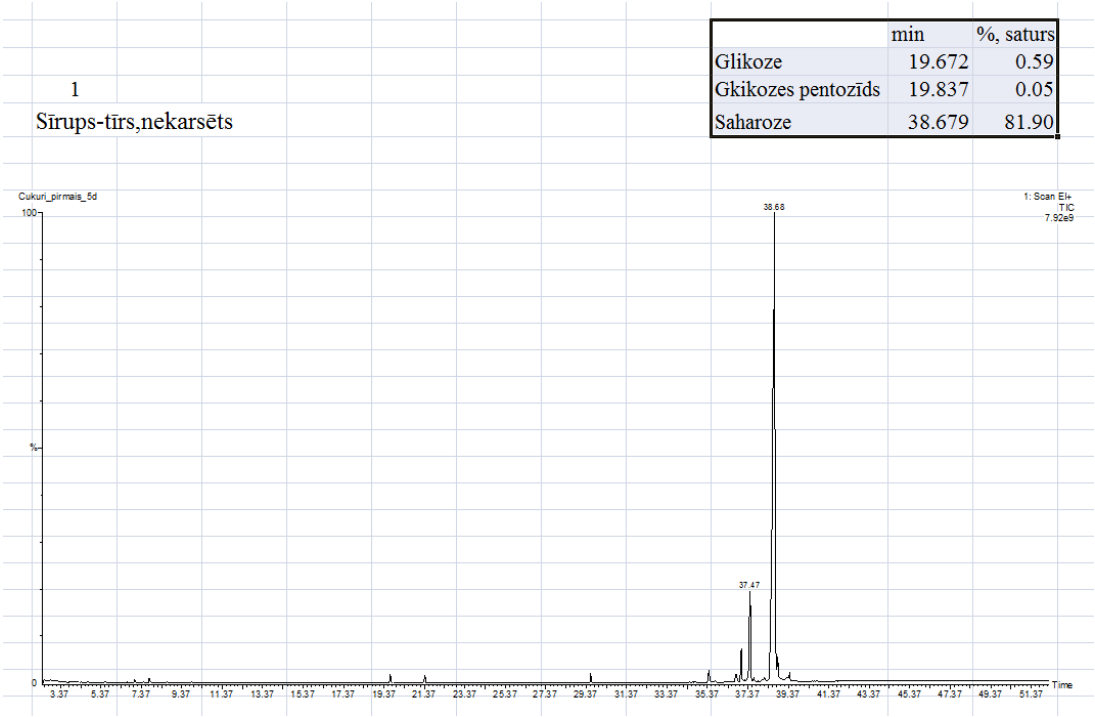
1. attēls. Raugu un pelējumu klātbūtnes noteikšana krūmcidoniju sīrupā.

Izmantojot krūmcidoniju sīrupu par ogļhidrāta avotu baktēriju kultivēšanai, sterilizēšana nav nepieciešama, jo tika secināts, ka sīrups ir ļoti skābs (pH ļoti zems – 2,5), turklāt šķīstošās sausnas saturs ir 55% Brix. Zems pH un augsts cukura saturs ir vide, kura neļauj attīstīties blakus mikroflorai (nelabvēlīgiem mikroorganismiem).



2. attēls –Baktēriju kopskaita noteikšana krūmcidoniju sīrupā.

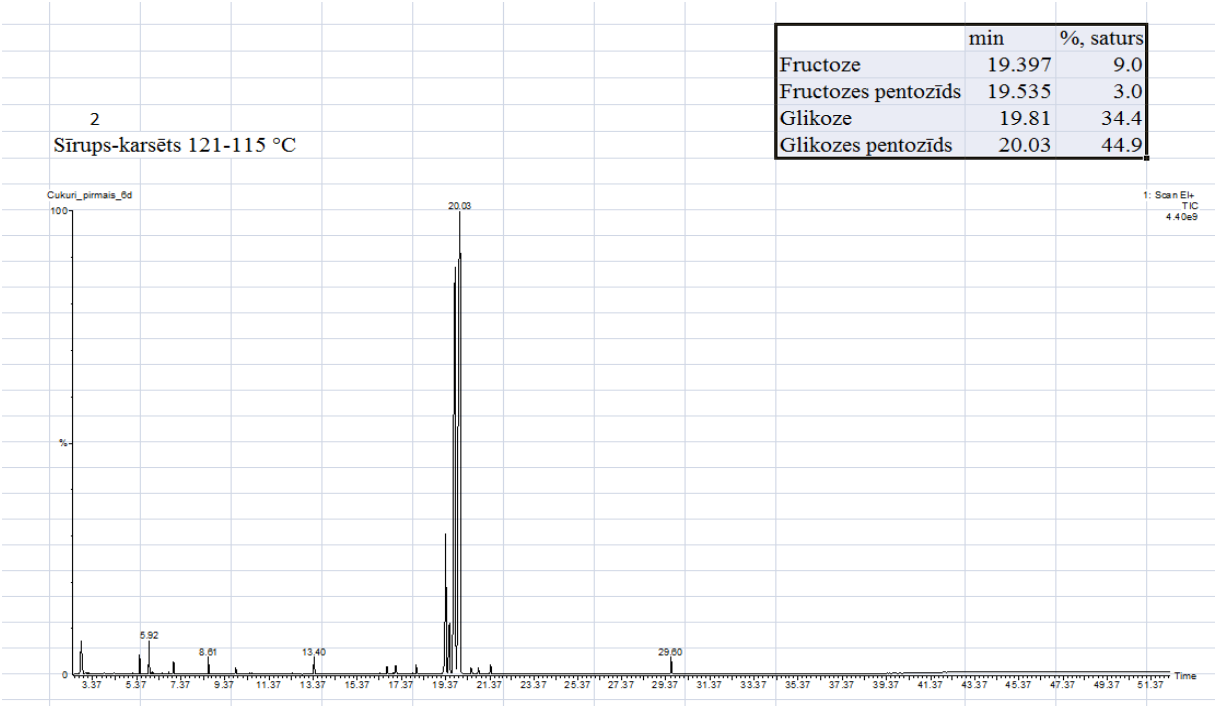
Ja ir uztraukums par krūmcidoniju sīrupa sekundāro piesārņojumu, tad to var arī nosterilizēt. Izpētot svaiga krūmcidoniju sīrupa ķīmisko sastāvu konstatēts, ka pamata saturs ir saharoze 3 attēls. Mikrobioloģiskās izcelsmes levāna un/vai dekstrāna sintēze no substrātiem ir iespējama tikai tad, ja pamata sastāvdaļa ir saharoze. Līdz ar to svaigs krūmcidoniju sīrups lieliski piemērots biopolimēru sintēzei.



	min	%, saturs
Glikoze	19.672	0.59
Gkikozes pentozīds	19.837	0.05
Saharoze	38.679	81.90

3. attēls – Svaiga krūmcidoniju sīrupa ķīmiskā sastāva izvērtēšana.

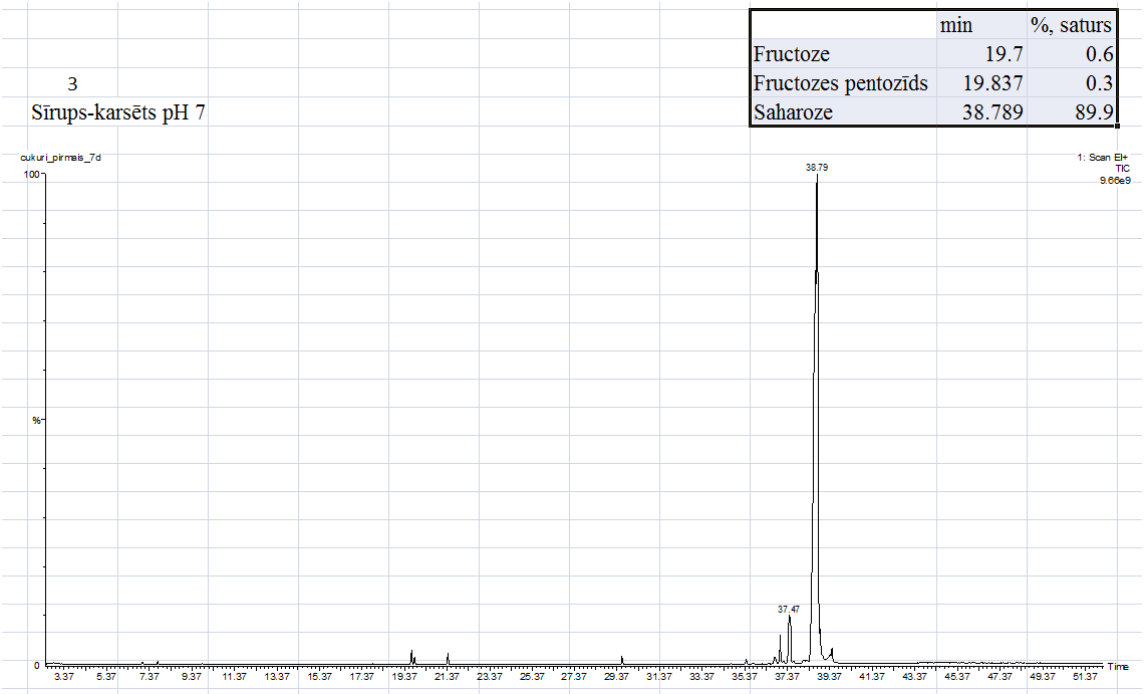
Noskaidrots, ka termiskās apstrādes laikā, zemas skābes un augstas temperatūras ietekmes rezultātā notiks saharozes inversija, izveidosies glikoze un fruktoze – invertcukuri, kuri nav pieļaujami levāna un dekstrāna sintēzei 4 attēls.



	min	%, saturs
Fructoze	19.397	9.0
Fructozes pentozīds	19.535	3.0
Glikoze	19.81	34.4
Glikozes pentozīds	20.03	44.9

4. attēls. Sterilizēta krūmcidoniju sīrupa ķīmiskā sastāva izvērtēšana

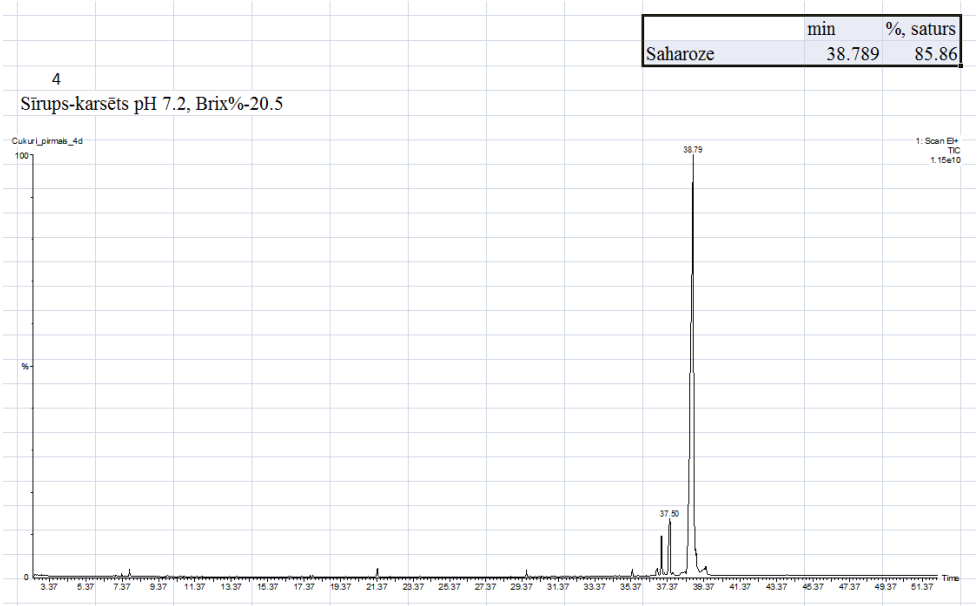
Lai izvairītos no saharozes inversijas, būtiski pirms krūmcidoniju sīrupa sterilizēšanas paaugstināt pH līdz 7,0, 5 attēls.



	min	%, saturs
Fructoze	19.7	0.6
Fructozes pentozīds	19.837	0.3
Saharoze	38.789	89.9

5. attēls – Sterilizēta ar paaugstināto pH krūmcidoniju sīrupa ķīmiska sastāva izvērtēšana

Bakterijas EPS producenti nevar dzīvot augstā saharozes koncentrācijā, tai jābūt robežās no 20 vai nedaudz virs 20%. Ja saturs ir augstāks tas negatīvi ietekmē šūnu osmotisko spiedienu rezultātā baktērijas iet bojā. Lai izvairītos no sekundāra krūmcidoniju sīrupa piesārņošanas pēc sterilizēšanas ir ieteicam sterilizēt, gatavo fermentācijai substrātu. Izvērtējot substrāta ķīmisko sastāvu 6. attēls noteikts, ka esošās saharozes saturs tajā ir pietiekošs EPS sintēzei.



	min	%, saturs
Saharoze	38.789	85.86

6. attēls – Sterilizēta ar paaugstinātu pH, atšķaidīta krūmcidoniju sīrupa ķīmiskā sastāva izvērtēšana.

EKSPERIMENTĀLA BIOREAKTORA TEHNISKĀ RASĒJUMA UN PROTOTIPA IZSTRĀDE

Projekta ietvaros tika izstrādāts biopolimēru (BC) iegūšanas prototips – rotācijas disku bioreaktors (RDBR). Balstoties uz zinātniskās un tehniskās literatūras izpētes, tika izdarīts secinājums, ka šāda reaktora konstrukcija var būtiski uzlabot BC sintēzi. Savukārt, reaktora konstrukcija ir pietiekami vienkārša. RDBR izmēģinājumi paradīja, ka bioreaktors spēj būtiski (aptuveni 3 – 5 reizēs atkarībā no substrāta un izmantota baktēriju celma) palielināt BC sintēzi, salīdzinājumā ar statisko kultivāciju, ka arī samazināt kultivācijas ciklu aptuveni divās reizēs.

Rotācijas disku bioreaktora darbības princips

Diski

RDBR izmanto horizontāli novietotu cilindrveida reaktoru, uz kura ass nostiprināti vairāki diski. Baktērijas, piestiprinoties pie diska virsmas, sintezē BC. RDBR ar perforētiem diskiem pieļauj BC plēves augšanu uz abām diska pusēm. Diski (līdz 14 gab.) atrodas uz rotējošas ass, kas nodrošina disku pārmaiņus iemērkšanos barotnē un izcelšanos gaisa vidē. Perforēti diski ir efektīvāki par necaurumotiem diskiem, jo tie ļauj BC plēves augšanu cauri diskam un spēcīgāku sasaisti ar to. Ir noteikts, ka optimāla BC sintēze notiek uz diskiem ar sieta izmēru 3 mm (caurumu diametrs).

Disku materiāls: nerūsējošais tērauds vai plastmasa. Optimālais disku diametrs – 100 mm un biezums – 1,5 mm. Reaktora korpusu (parasti cilindrs; iekšā atrodas diski un barotne) izgatavo no stikla, kas pieļauj caurredzamību un vieglu tīrīšanu. Cilindra diametru veido tādu, lai attālums no cilindra sienas līdz rotējošajam diskam būtu aptuveni 5 mm. Attālums starp diskiem: 25 – 60 mm robežās. Tādējādi kopējais reaktora korpusa garums, kurā rotē 14 diski, var būt 400 – 1000 mm un augstums/platums 110 – 120 mm.

Barotnes sterilizācija, pievadīšana bioreaktorā un sterilitāte

Pirms kultivācijas ir iespējams sterilizēt barotni (autoklavēt vai pasterizēt), lai BC sintēze notiktu veiksmīgi. Jābūt sterilas barotnes pievadīšanas sistēmai. Arī jābūt iespējai sterili pievadīt inokulātu (BC sintezējošus mikroorganismus), lai sāktu kultivāciju. Pēc kultivācijas cikla (5 – 10 dienas), jābūt iespējai izņemt BC plēves un iztīrīt reaktoru, lai izvārīties no kontaminācijas.

Barotnes homeostāze

Lai homogenizētu šķidro barotni un bioreaktorā uzturētu nemainīgu temperatūru, ir nepieciešams peristaltikas sūknis barotnes cirkulēšanai (70 – 100 mL/min) pa visu bioreaktoru un cauri termostatiskai vannai, kas barotnē uztur kultivēšanai nepieciešamo +30°C temperatūru. Barotnes daudzums bioreaktorā – lai disku būtu iegremdēti uz 1/3 (3 – 3,5 L).

Rotācija

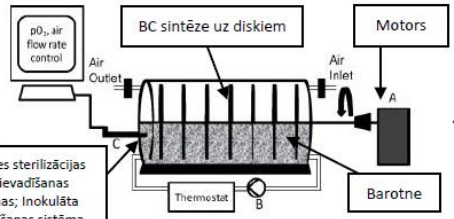
Disku rotāciju nodrošina motors. Kultivēšanas laika disku griešanās ātrums 5 – 30 apgr/min. Jābūt iespējai kontrolēt rotācijas ātrumu, lai noskaidrotu pēc iespējas optimālāku ātrumu. Rotācija nodrošina aerāciju un vienmērīgu fermentācijas barotnes maisīšanu,

RAŽOŠANAS LĪNIJAS SHĒMA

1

Inokulāta sagatavošana kolbās. Kultivācija termostatā-inkubatorā.

2



Barotnes sterilizācijas un pievadīšanas sistēmas; Inokulāta pievadīšanas sistēma

Baktēriju kultivācija rotējoša tipa bioreaktorā +30°C, 7 – 14 dienu laikā sterilajā vidē. Bakteriālas celulozes (BC) sintēze notiek uz rotējošiem diskiem (6 gab.), kas ir iegremdēti uz pusi barotnē. Motora griešanas ātrums ap 10 – 30 apgr/min. Pirms kultivācijas barotne tiek autoklavēta vai pasterizēta. Jābūt barotnes un inokulāta pievadīšanas sistēmai. Kad izņem BC, bioreaktoru jāsagatavo jaunajam kultivācijas ciklam.

3

Pēc kultivācijas BC plēves izņem no bioreaktora. Tad tās tiek atmazgātas stikla/metāla tvertnē H_2O un NaOH. Jānodrošina karsēšana.

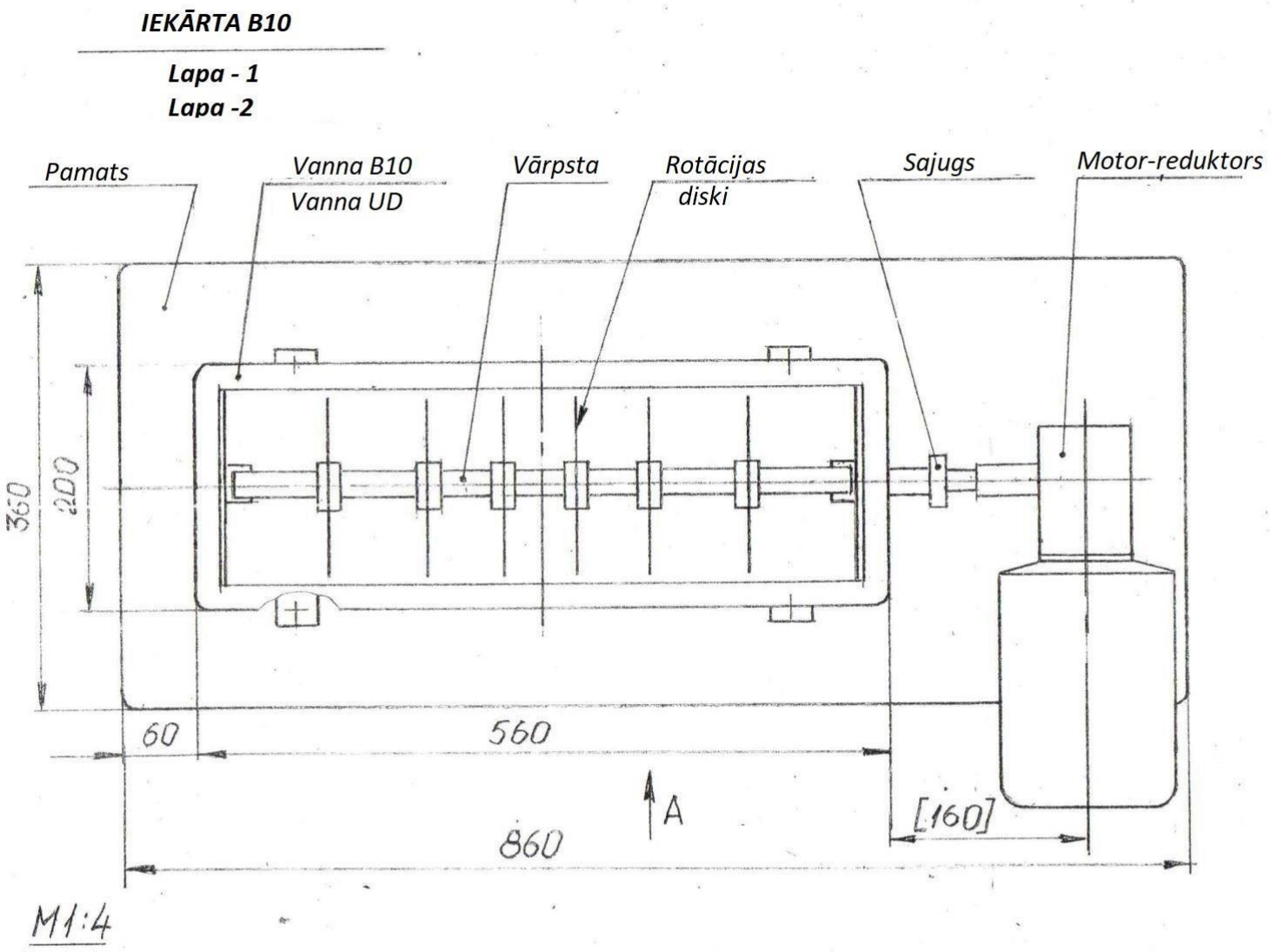
4

BC smalcināšana blenderī, lai izveidotu homogēnu BC (mikrošķiedru) masu.

5

BC mikrošķiedru sterilizācija un uzglabāšana

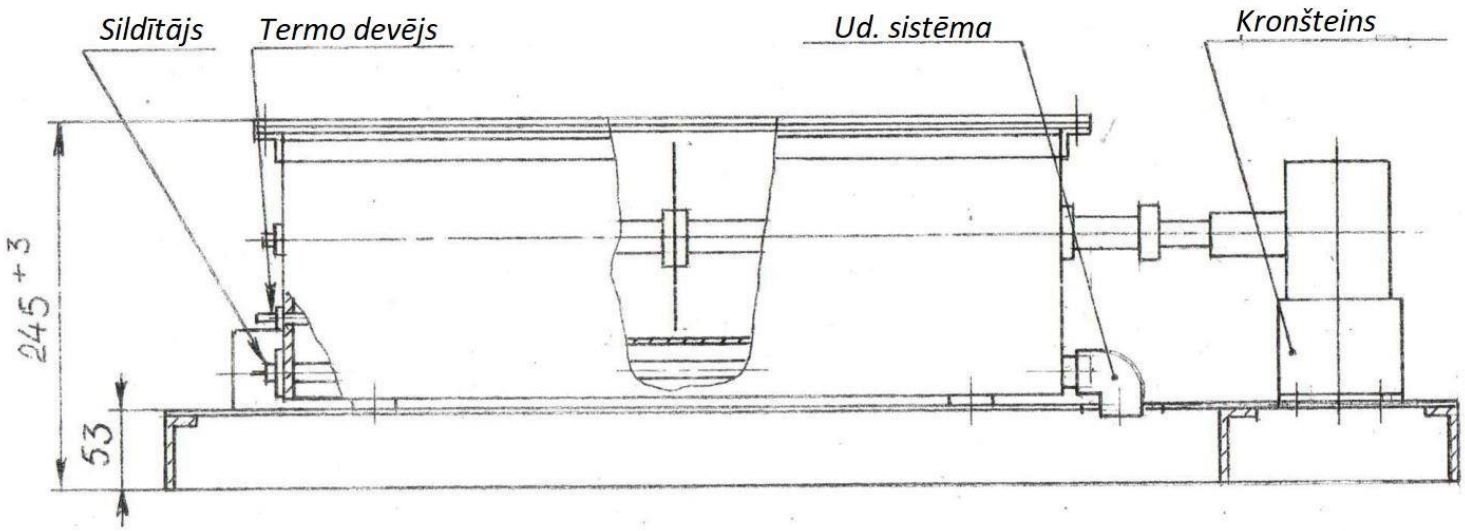
Eksperimentālā bioreaktora prototipa biopolimēru iegūšanai tehniskais rasējums



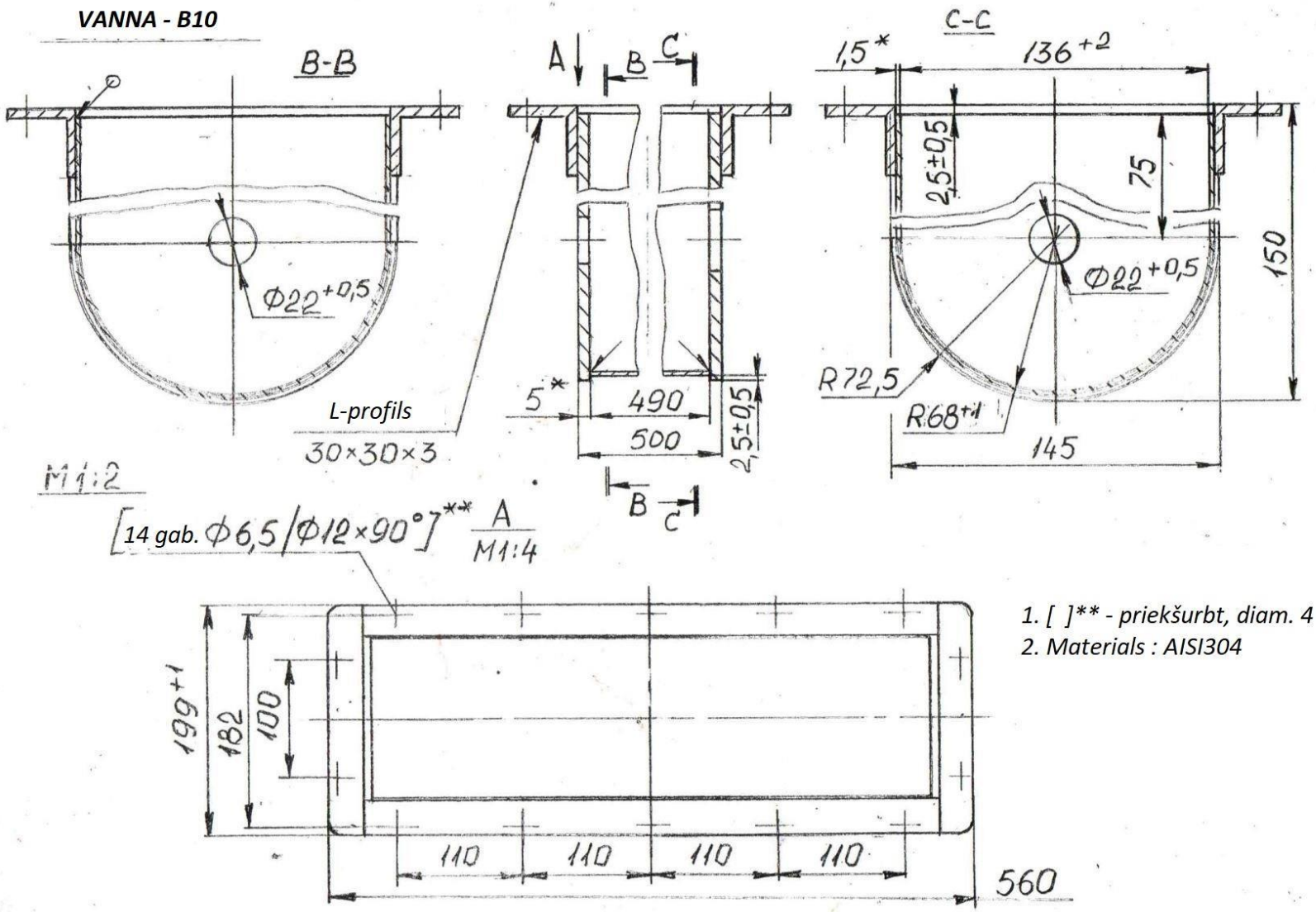
IEKĀRTA B10

2 lapa

A

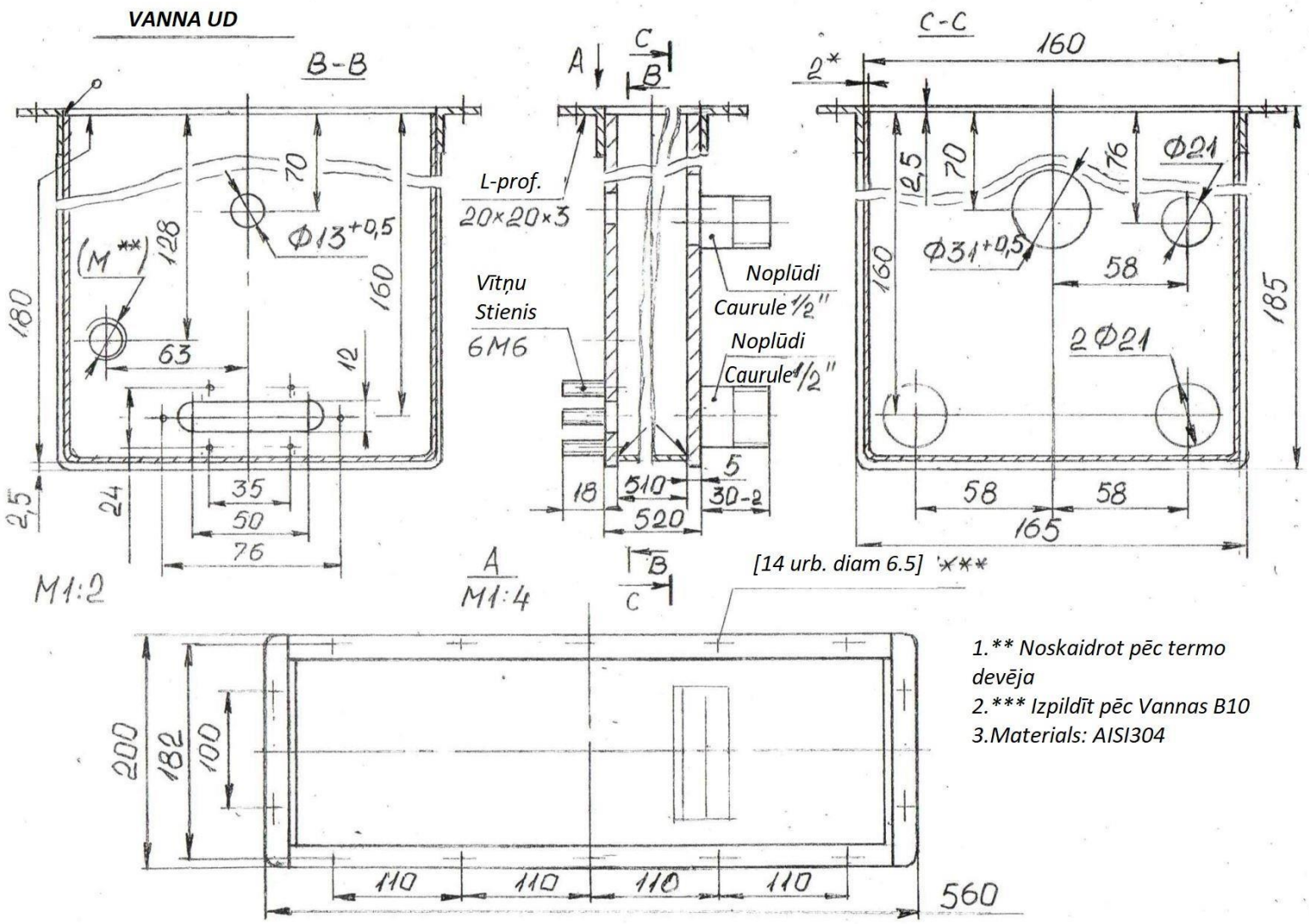


VANNA - B10

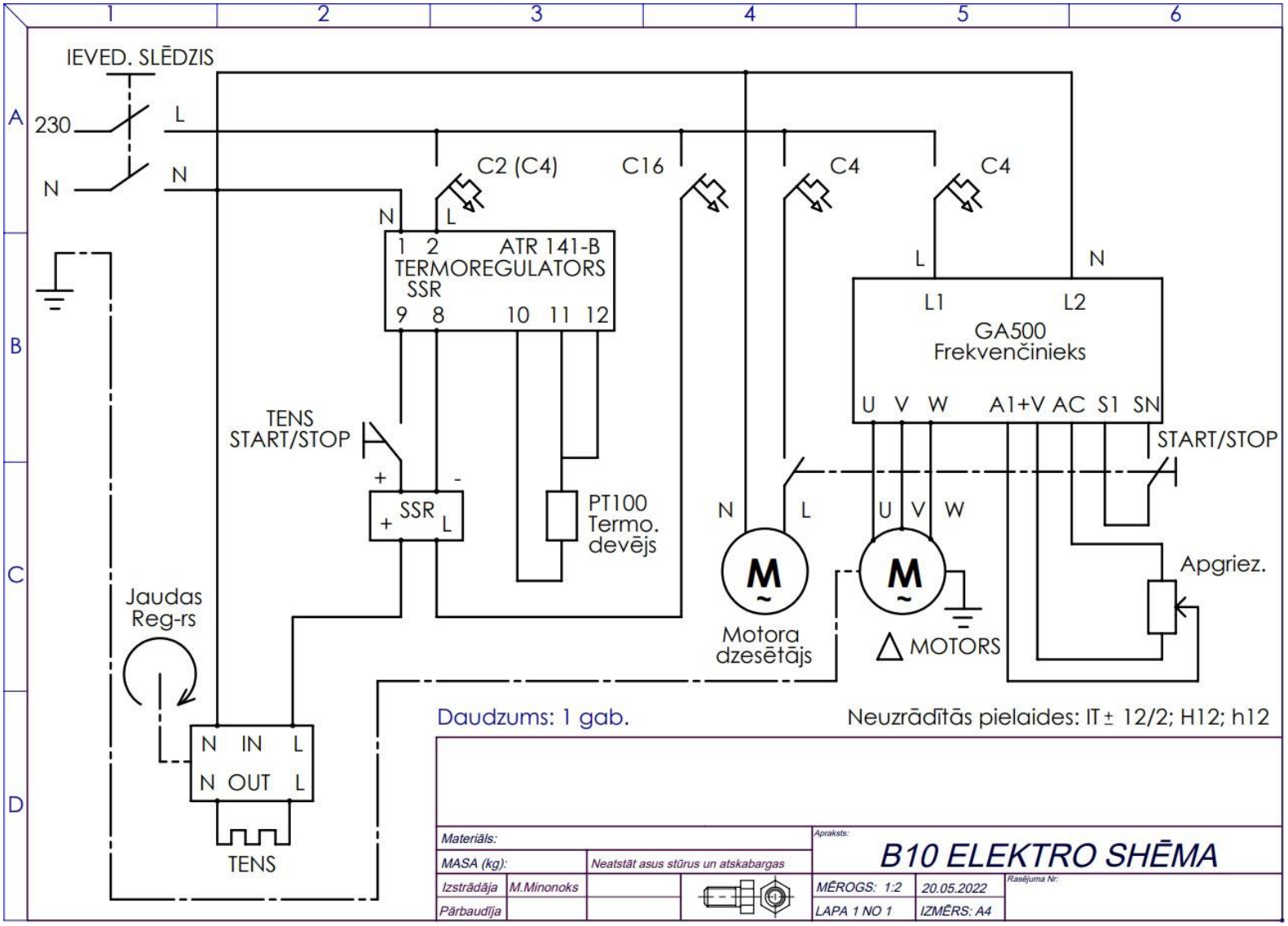


*1. [ ]** - priekšurbt, diam. 4*

2. Materials : AISI304



1.** Noskaidrot pēc termo devēja
2.*** Izpildīt pēc Vannas B10
3.Materials: AISI304


IEVED. SLĒDZIS
230
L
N
N
C2 (C4)
C16
C4
C4
N
L
1 2 ATR 141-B
TERMOREGULATORS
SSR
9 8 10 11 12
L
N
L1 L2
GA500
Frekvenčinieks
U V W A1+V AC S1 SN
START/STOP
TENS
START/STOP
+ -
SSR
+ L
PT100
Termo.
devējs
N L
U V W
M
M
Apgriez.
Jaudas
Reg-rs
Motora
dzesētājs
MOTORS
N IN L
N OUT L
TENS
Daudzums: 1 gab.
Neuzrādītās pielaides: IT ± 12/2; H12; h12
Materiāls:
MASA (kg):
Neatstāt asus stūrus un atskabargas
Izstrādāja
M.Minonoks
Pārbaudīja
Apraksts:
B10 ELEKTRO SHĒMA
MĒROGS: 1:2
20.05.2022
LAPA 1 NO 1
IZMĒRS: A4
Rasējuma Nr:

SPECIFIKĀCIJA:

1. IEKARTĀ IZMANTOTAS MATERIALI :
   - AISI320L
   - MISINŠ
   - Gumijas
   - Plastmasi

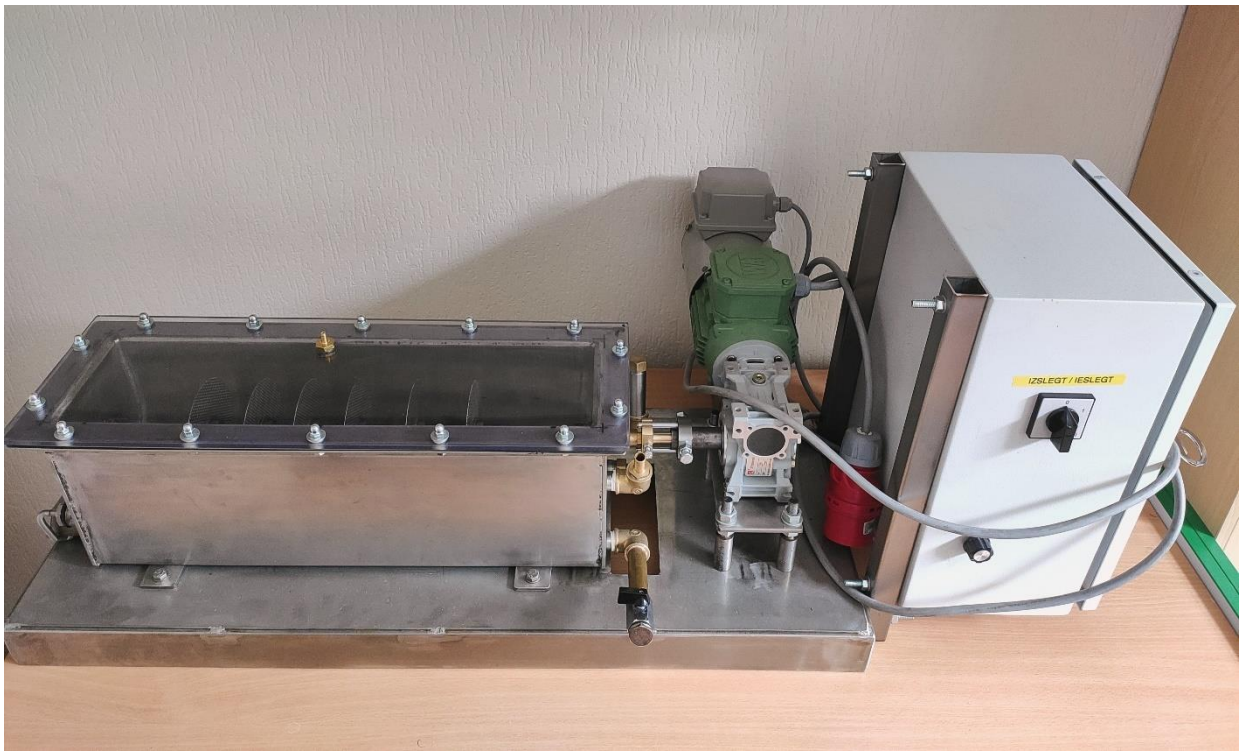
ELEKTRO APRIKOJUMS:

1. DISSIP. WF151200 25A - DIN ADAPTER SO sērijām, radiators
2. SSr slēdzis 25A, 1f, 12-280Vac/7-30Vdc/Led
3. Metāla sadales skapis 1 durvis IP65 H=400 W=300 D=210 mm
4. Sild.Elements 02.631 800W230V
5. M.reduktors NMRV40 i=60 63B14 , WAT motors 0,12kW 4P 63B14 TB2 + forced cooling
6. Potenciometers 2.2 kOhm
7. Sledzis On/Off
8. Frekvenčinieks GA500 200V Single phase. ND 1.9 A o.37 k, HD 1.6A 0.25 kW, without EMC filter

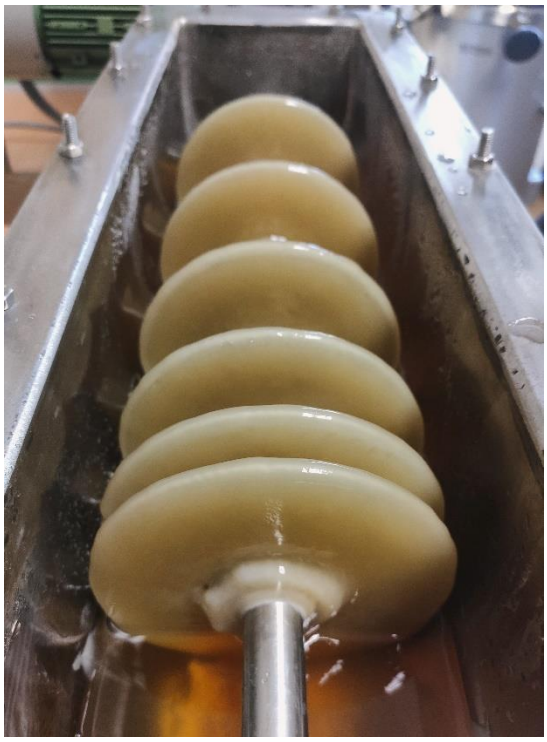
Neuzrādītās pielaides: IT ± 12/2; H12; h12

Materiāls:				Apraksts:		
MASA (kg):		Neatstāt asus stūrus un atskabargas				
Izstrādāja	M.Minonoks			MĒROGS: 1:2	20.05.2022	Rasējuma Nr:
Pārbaudīja				LAPA 1 NO 1	IZMĒRS: A4	

Attēli – reaktora izmēģinājums



1. attēls. Biopolimēru iegūšanas prototips



2. attēls. BC veidošanās uz reaktora diskiem kultivācijas laikā.

3. SADAĻA: OPTIMĀLU BIOPOLIMĒRU PĀRKLĀJUMU IZSTRĀDE UN PĀRBAUDE

BAKTERIĀLĀS CELULOZES PALIKTŅI OGĀM

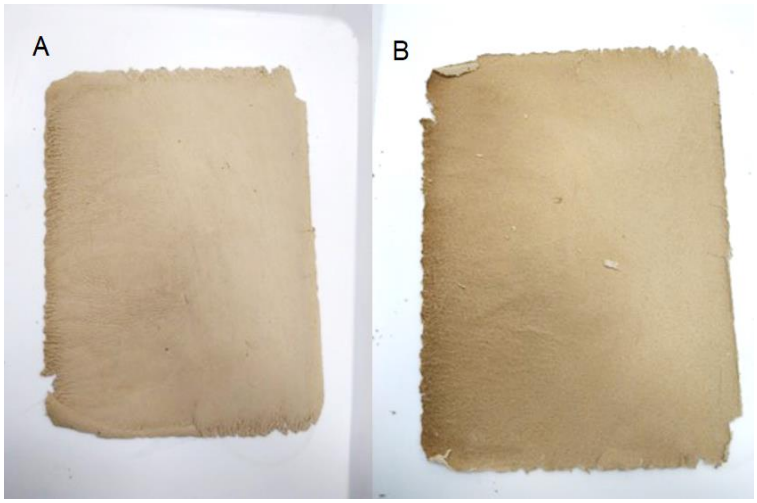
Apraksts: pētījumu ietvaros tika izstrādāti BC paliktnīši ogām, kurus ir paredzēts ievietot ogu iepakojumos mitruma kontrolei. Pašlaik šiem nolūkiem tiek izmantoti paliktnīši ar augstu sintētisku materiālu saturu.

Sastāvs: 2 paliktņu papīra paraugu veidi: 1) 100% augu celuloze un 2) 50% augu celuloze +50% BC (1. attēls). Par augu celulozes avotu kalpoja kaņepes paliekas.

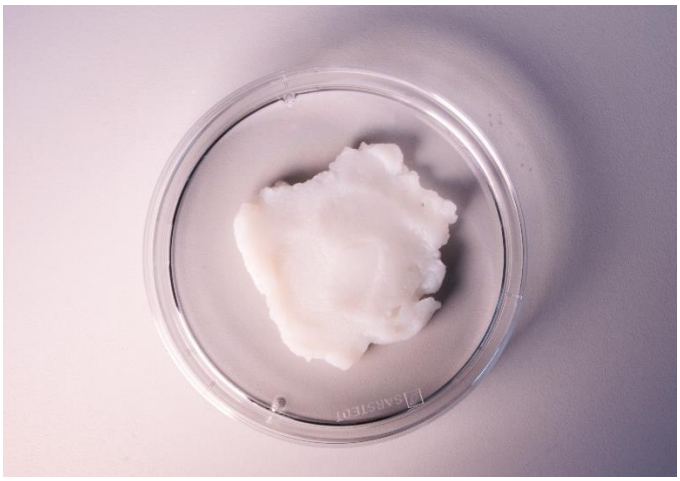
Pagatavošana:

1. BC sintēzei izmanto vienu no augstāk minētām alternatīvas kultivācijas barotnēm;
2. Pēc fermentācijas BC plēves ir nepieciešams 1 stundu vārīt 0,1 M NaOH šķīdumā;
3. Trīs reizēs noskalot ūdenī vai destilētajā ūdenī 20 min laikā, lai pilnībā izskalotu NaOH. Pārbaudīt pH, līdz tas paliek neitrāls (pH = 7);
4. BC ir nepieciešams sasmalcināt, lai būtu iespējams izstrādāt biokompozītu – 1 st. homogenizācija blenderī;
5. Komponentes ir nepieciešams manuāli sajaukt pēc svara destilētajā ūdenī, un atliet formā 10 x 20 cm;
6. Žāvē 2 dienas +40°C temperatūrā;
7. Ievieto paliktnīti ogu iepakojumā.

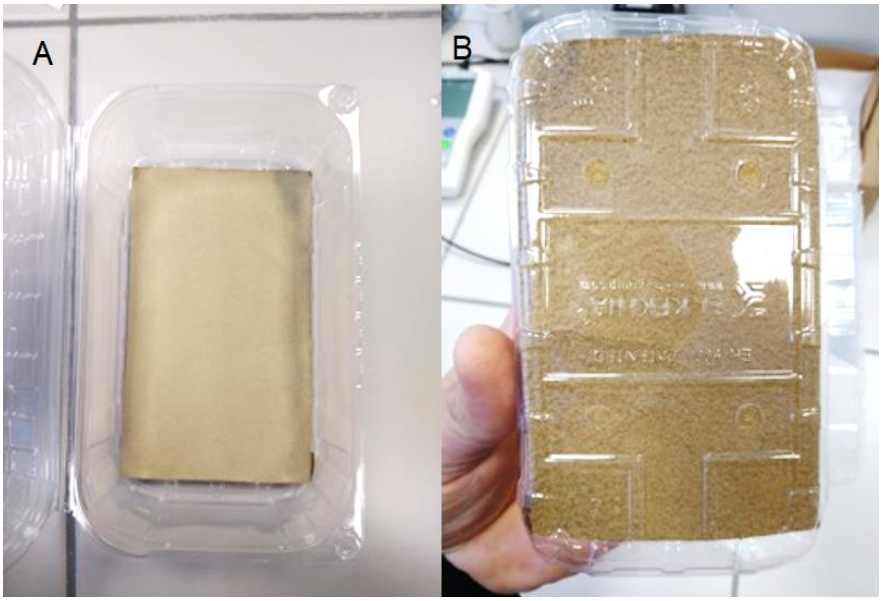
Mehānisku un fizikālo īpašību izpēte paradīja, ka BC saturoši papīri (2) uzradīja augstākās sorbcijas un stiprības-deformatīvās īpašības, jāatzīmē, abi papīri uzradīja ļoti līdzīgas ekspluatācijas īpašības validējot paliktņu ūdens saistīšanas funkciju uzglabājot vīnogas, zemenes un avenes.



1. attēls. BC paliktņi ogām: A) 100% augu celuloze; B) 50 %Augu celuloze ar 50% BC.

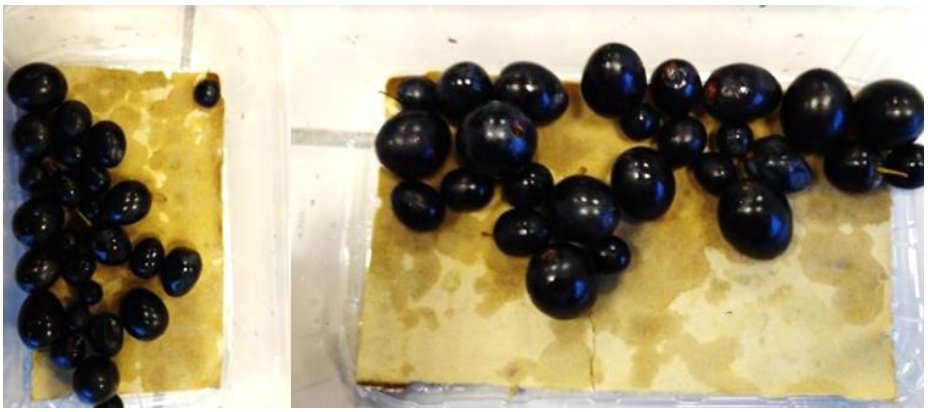


2 .attēls. Homogenizēta BC.



3. attēls. BC paliktnīši ievietoti ogu kastītēs mitruma kontrolei.

4. attēls. Paliktnīšu pārbaude – vīnogu uzglabāšanas eksperimenti.



5. attēls. BC paliktnīšu sorbcijas demonstrācija.

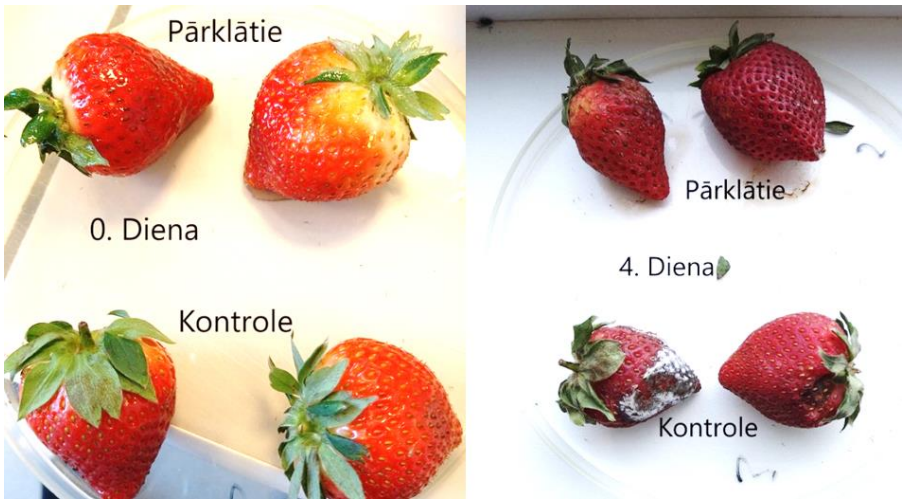
BAKTERIĀLĀS CELULOZES SUSPENSIJA OGU UZGLABĀŠANAS TERMINA PAGARINĀŠANAI

Apraksts: pētījumu ietvaros tika pagatavota BC suspensija, lai aizsargātu ogas un dārzeņus un pagarinātu to uzglabāšanas laiku. Pārklājumu var droši ēst kopā ar ogām.

Sastāvs: eksperimentu gaitā tika atlasīts optimālais suspensijas sastāvs: BC 2% un pektīns 2%. Dotais sastāvs veido vienmērīgu ogu pārklājumu, kas uzlabo ogu uzglabāšanas termiņu un ir drošs cilvēkam.

Pagatavošana:

1. BC sintēzei izmanto vienu no augstāk minētām alternatīvas kultivācijas barotnēm;
2. Pēc fermentācijas BC plēves ir nepieciešams 1 stundu vārīt 0,1 M NaOH šķīdumā;
3. Trīs reizēs noskalot ūdenī vai destilētajā ūdenī 20 min laikā, lai pilnībā izskalotu NaOH. Pārbaudīt pH, līdz tas paliek neitrāls (pH = 7);
4. BC ir nepieciešams sasmalcināt, lai būtu iespējams izstrādāt biokompozītu – 1 st. homogenizācija blenderī;
5. Ūdenī samaisi nepieciešamas komponentes;
6. Atstāj kratītajā uz 5 stundām, 120 rpm., vai blenderī – 1 st;
7. Iegremdē ogas pagatavotajā šķīdumā uz 5 sek. un var uzreiz likt iepakojumā.



1. attēls. BC šķīduma testi: zemenes eksperimenta sākumā un pēc 5 dienām. Biopolimēru pārklājums nodrošina ogu aizsardzību pret mikroorganismiem (pelējums), ka arī saglabā mitrumu.

PROTOKOLS: BAKTERIĀLAS CELULOZES PLĒVJU IZGATAVOŠANA SIERA NOGATAVINĀŠANAS PROCESĀ

Apraksts: šajā pētījumā tiks pārbaudīta BC spēja veidot optimālu pārklājumu siera nogatavināšanas procesā. BC plēve potenciāli var nodrošināt optimālu gāzu apmaiņu un aizsardzību no mikrobiāla piesārņojuma.

Izmantotais celms: *Komagataeibacter rhaeticus* P 1463

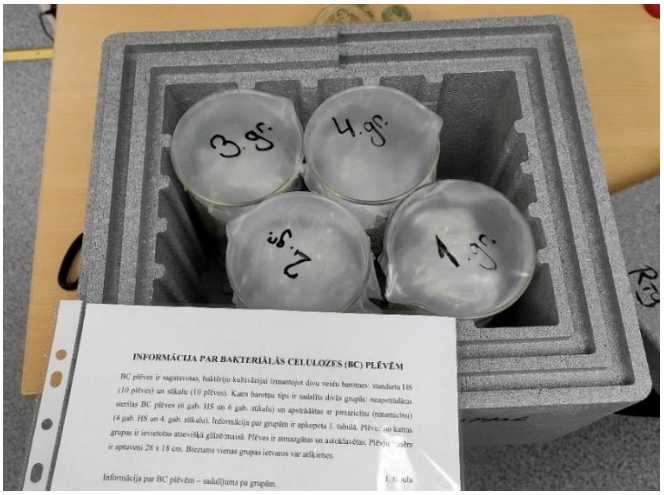
BC plēvju sagatavošana

1. Sagatavo standarta HS un sūkalu barotnes atbilstoši standarta sagatavošanas procedūrai;
2. Inokulātu sagatavo 95 mL HS barotnei pievienojot 5% *K. rhaeticus* P 1463 sējmateriālu (izmanto 250 mL konisku kolbu). Inokulātu atstāj uz 24 h kratītajā-inkubatorā 150 rpm +30°C;
3. Baktēriju kultivāciju veic sterilajām stikla paplātēm (izmērs: 28 x 18 cm) pievienojot 180 mL atbilstošas barotnes (standarta HS vai sūkalu barotne) un 10% *K. rhaeticus* P 1463 inokulātu;
4. Paplātes ar fermentācijas barotni ievieto sterilajos maisos ar marles korķi, lai nodrošinātu aerāciju;
5. Paplātes ievieto termostatos uz piecām diennaktīm +30°C;
6. Pēc kultivācijas veic standartu BC plēvju atmazgāšanas procedūru;
7. Pēc atmazgāšanas sterilizē plēves termoizsturīgajos maisos;
8. Noteiktiem paraugiem (1. tabula) pievieno iepriekš sagatavotu natamicīna (pimaricīna) šķīdumu. Šķīdumu pagatavo 0,01 g/L natamicīna izšķīdinot 1 L destilētajā ūdenī (dH_2O). Natamicīns ir dabisks pretsēnīšu konservants, kas pasargās sieru nogatavināšanas procesā;
9. Sagatavo BC plēves transportēšanai, ievietojot tās sterilajos konteineros. BC plēvi izmanto kā iepakošanas materiālu siera nogatavināšanas procesā, ievērojot visu ražošanas metodoloģiju.

1. attēls. BC plēvju sintēze paplātēs (28 x 18 cm) ar *K. rhaeticus* P 1463 celmu, izmantojot HS barotni.

2. attēls. BC plēves uz HS barotnes virsmas pēc piecām statiskas kultivācijas dienām ar *K. rhaeticus* P 1463 celmu.

3. attēls. BC plēve pēc piecām kultivācijas dienām ar *K. rhaeticus* P 1463 celmu.



4. attēls. Sagatavotas transportēšanai BC plēves.

Rezultāti

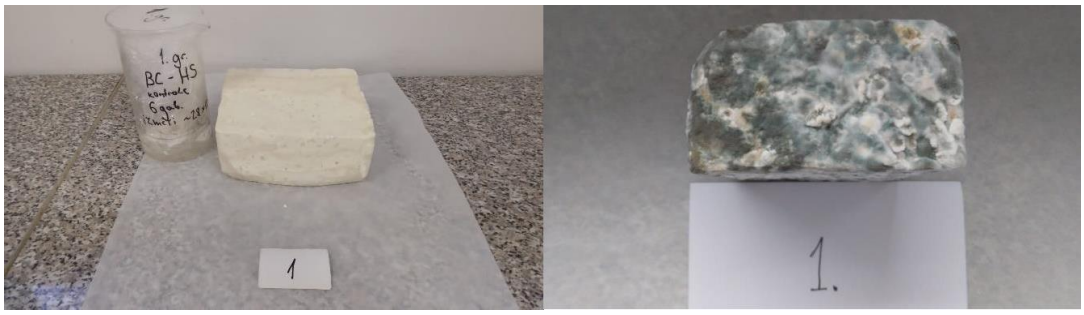
Siera kvalitātes testi paradīja, ka vislabākā pelējuma attīstība bija novērota grupai – BC plēves, kas izveidotas sūkalu barotnē un apstrādātas ar natamicīnu (4. grupa). Tās spēj nodrošināt gan nepieciešamu gāzes caurlaidību, gan aizsardzību pret nevēlamiem mikroorganismiem. Savukārt, BC plēves palīdz samazināt siera zudumus, salīdzinājumā ar kontroles grupām (ietīts marlē). Papildus ir novērots siera sensoro īpašību uzlabojums.

1. tabula.

Informācija par BC plēvēm – sadalījums pa grupām.

Grupas Nr.	Barotnes veids	Natamicīns 0,01 g/L, ir/nav
1.	HS	Nav
2.	HS	Ir
3.	Sūkalas	Nav
4.	Sūkalas	Ir

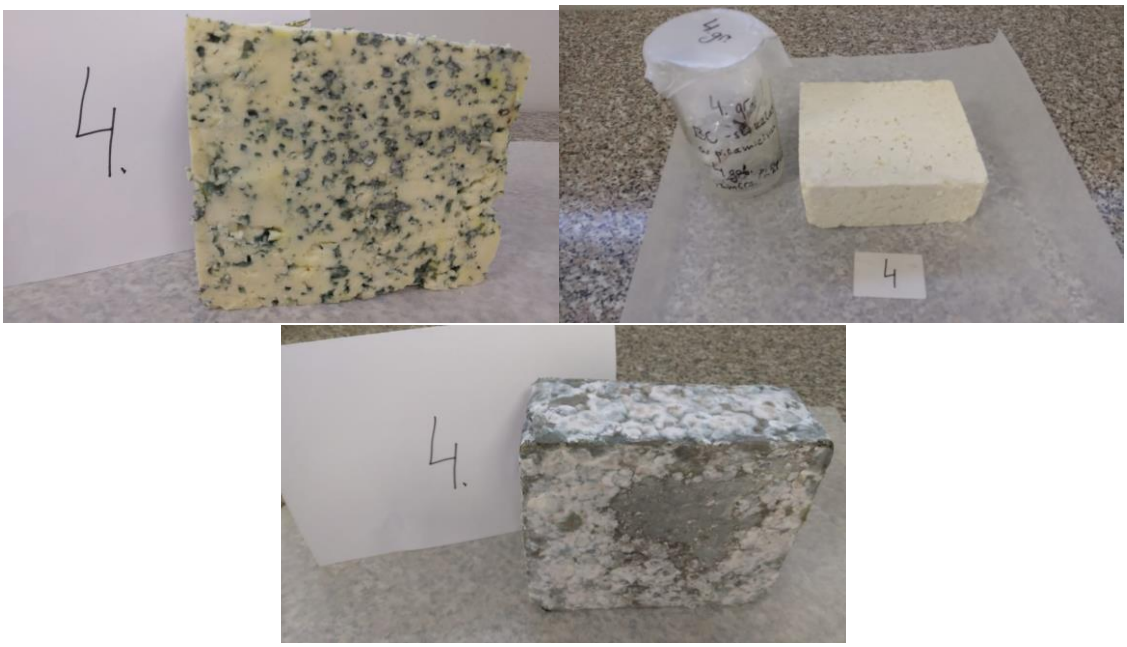
1. attēls – kontrole.



2. attēls – 1. gr. BC plēve uz HS barotnes bez natamicīna.

3. attēls – 2. gr. BC plēve uz HS barotnes ar natamicīnu.

4. attēls – 3. gr. BC plēve uz sūkalu barotnes bez natamicīna.



5. attēls – 4. gr. BC plēve uz sūkalu barotnes ar natamicīnu.

6. attēls – kultivācijas apstākļi

2. tabula

Sieru sensorā novērtēšana

Parauga numurs	Krāsa *balta-dzeltena*	Pelējums *nav-ir/daudz*	Pelējuma krāsas intensitāte *nerakstūrīga-raksturīga*	Konsistence *mīksta-cieta*	Smarža *nerakstūrīga-raksturīga*	Smarža *neizteikta-izteikta*	Garša *nerakstūrīga-raksturīga*	Garša *neizteikta-izteikta*
1	2	1	7	8	5	5	2	2
2	6	6	8	6	8	8	6	5
3	2	2	6	7	5	5	2	2
4	7	9	9	5	9	9	9	9
K	5	5	7	7	7	7	8	7

BAKTERIĀLAS CELULOZES BIOPOLIMĒRS – SINTĒTISKU IEPAKOJUMU VIDEI DRAUDZĪGS ANALOGS

Apraksts: Ar mērķi uzlabotu bakteriālas celulozes materiāla deformātīvas īpašības (lokanību) tika pagatavots biokomozīts, kas ir līdzīgs sintētiskiem iepakojumiem. Savukārt, jaunais materiāls ir pilnīgi biodegradējams, ka arī nav pagatavots no bīstamām vielām.

Sastāvs: BC 40%, polivinil spirts (PVS) 50% un glicerīns 10%,

Pagatavošana:

1. BC sintēzei izmanto vienu no augstāk minētām alternatīvas kultivācijas barotnēm;
2. Pēc fermentācijas BC plēves ir nepieciešams 1 stundu vārīt 0,1 M NaOH šķīdumā;
3. Trīs reizēs noskalot ūdenī vai destilētajā ūdenī 20 min laikā, lai pilnībā izskalotu NaOH. Pārbaudīt pH, līdz tas paliek neitrāls (pH = 7);
4. BC ir nepieciešams sasmalcināt, lai būtu iespējams izstrādāt biokompozītu – 1 st. homogenizācija blenderī;
5. Ūdenī samaisi nepieciešamas komponentes: BC un polivinilspirta PVS;
6. Šķīdumu nepieciešams maisīt 24 stundas;
7. Izmantojot liešanas paņēmienu, var iegūt vēlamas formas iepākojumu.

1. attēls. Biokompozīts ar BC.

ZEMEŅU OGU NOVĒRTĒŠANAS METODIKA

Zemeņu novērtēšana

• Dominējošā augļu krāsa:

Viendabīgums: (vismaz 10 ogas):

3 = krāsa ir neviendabīga

5 = krāsa ir pieņemami neviendabīga

7 = krāsa ir viendabīga

Šajā gadījumā 1. un 9. balles; kā arī 2-4-6-8 nevar izmantot.

• Spīdīgums:

3 = zems

5 = vidējs

7 = augsts

Ja nepieciešams, papildus var izmantot 1 un 9 balles; kā arī 2-4-6-8.

• Iekšējā krāsa:

3 = gaiši sarkana

5 = vidēji sarkans

7 = tumši sarkans

Ja nepieciešams, papildus var izmantot 1 un 9 balles; kā arī 2-4-6-8.

• Iekšējās krāsas viendabīgums:

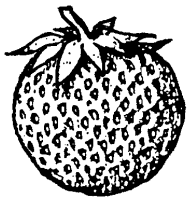
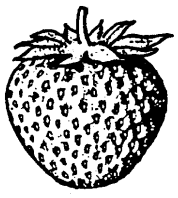
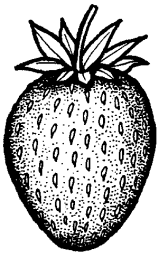
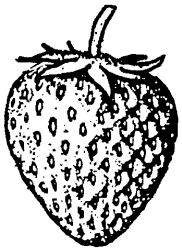
3 = zems

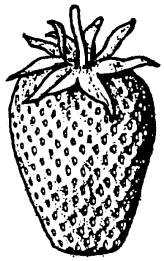
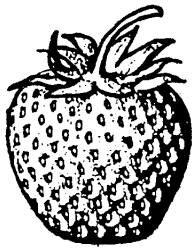
5 = vidēja

7 = augsts

Ja nepieciešams, papildus var izmantot 1 un 9 balles; kā arī 2-4-6-8.

• Dominējošā augļa forma (ražas novākšanas sākumā):

		
1 - saspiesta	2 - lodveida	3 – koniska lodveida
		
4 - olveida	5 – sirds formas	6 – gari koniska

		
7 - kaklveida	8 – gara ķīļveida	9 – īsa ķīļveida

• Augļu viendabīgums ražā (ražas novākšanas vidū):

3 = augļiem ir dažādas formas

5 = viendabīgums ir diezgan labs

7 = salasītie augļi ir viendabīgi

Šajā gadījumā 1. un 9. balles; kā arī 2-4-6-8 nevar izmantot.

• Iekšējā dobuma izmērs:

3 = mazs

5 = vidējs

7 = liels

Ja nepieciešams, papildus var izmantot 1 un 9 balles; kā arī 2-4-6-8.

• Sēklu (riekstiņu) pozīcija:

3 = iegrimusi

5 = līmenī

7 = izvirzīta

Ja nepieciešams, papildus var izmantot tikai 4 un 6 balles.

Ogu uzglabāšanās spēja

Lai novērtētu ogu uzglabāšanās spēju, nosacījumiem jābūt šādiem :

• parauga lielums: 500 g

• uzglabāšana aukstumā: 4–5 ° C 72 stundu laikā;

• istabas temperatūra: 20-25 ° C 24 stundu laikā (norādīt precīzu temperatūru);

• gaisa mitrums: (jānorāda, ja iespējams).

Ogu novērtējums (vērtējums pirms uzglabāšanas):

• Mīkstuma blīvums:

3 = mīksts

5 = vidējs

7 = stingrs

Ja nepieciešams, papildus var izmantot 1 un 9 balles; kā arī 2-4-6-8.

• Mizas izturība:

3 = zema

5 = vidēja

7 = laba

Ja nepieciešams, papildus var izmantot 1 un 9 balles; kā arī 2-4-6-8.

Vērtējums pēc uzglabāšanas:

• Ogu spīdīgums:

3 = zems

5 = vidējs

7 = augsts

Ja nepieciešams, papildus var izmantot 1 un 9 balles; kā arī 2-4-6-8.

• Izturība pret iespiedumiem:

3 = zema

5 = vidēja

7 = augsta

Ja nepieciešams, papildus var izmantot 1 un 9 balles; kā arī 2-4-6-8.

• Kauslapu svaigums:

3 = zems

5 = vidējs

7 = augsts

Ja nepieciešams, papildus var izmantot 1 un 9 balles; kā arī 2-4-6-8.

• Izturība pret pelēko puvi:

3 = zema

5 = vidēja

7 = augsta

Ja nepieciešams, papildus var izmantot 1 un 9 balles; kā arī 2-4-6-8.

AVEŅU PARAUGU SAGATAVOŠANA

Apstrādei izvēlas šķirnes ar lielām, stingrām ogām, kurām ir cieši sastiprināti kauleņi. Ogām jābūt izlīdzinātām pēc lieluma, sausām, ar vienmērīgu krāsojumu un tās nedrīkst būt pārgatavojušas vai ar kaitēkļu, slimību vai mehāniskiem bojājumiem. Ogas vāc 2-3 reizes nedēļā, 150-500 g tarā. Ogu slāņa biezums 2-3 kārtas, lai novērstu ogu saspiešanos. Ogas pēc novākšanas vai nu nekavējoties piegādā apstrādei, vai arī līdz apstrādei uzglabā 6-8°C temperatūrā. Uzglabāšanas ilgums ne vairāk kā 8-12 stundas.

Izmēģinājumā iekļautas 3 rudens aveņu šķirnes ar augstas kvalitātes deserta ogām 'Polka', 'Imara' un 'Enrosadira'. Priekšroka ir šķirnēm, kuras audzētas zem segumiem, piemēram, augstajos tuneļos, jo tas nodrošina labāku ogu kvalitāti.

LEVĀNA, DEKSTRĀNA PĀRKLĀJUMU IZSTRĀDE UN IZVĒRTĒŠANA

Pamatojoties uz protokolu: zemeņu un aveņu ogu apstrādes metodika pielietojot EPS tika atlasīti ogu paraugi. Lai samazinātu mikrobioloģisko piesārņojumu, ogas pirms apstrādes ar biopolimēriem 2 minūtes tika noturētas sāls (0,9%-2% NaCl) šķīdumā 1 attēls, pēc tam notecinātas lai atdalītu lieko šķīdumu.

1.attēls – Aveņu apstrāde sāls šķīdumā

Nākošajā posmā sekoja ogu apstrāde ar biopolimēriem levānu (*Streptococcus salivarius K12*) un dekstrānu (*Leuconostoc mesenteroides DSMZ 20343).* Lai bipolimēri ātrāk tiktu izšķīdināti tie tika iemērkti ūdenī un uzglabāti ledusskapī 12 stundas. Literatūrā dati par ogu apstrādi ar levānu un/vai dekstrānu netika atrasti, tādēļ izvēlētās koncentrācijas pielāgotas no līdzvērtīgo bipolimēru datiem, kas minētas sadaļā fruktāni un citi biopolimēri. Pēc biopolimēru izšķīdināšanas vienam no paraugiem bija pievienots plastifikators (glicerīns). Izvelētās šķīduma koncentrācijas: 1% levāna šķīdums+1% dekstrāna šķīdums; 3% levāna šķīdums +2% glicerīna šķīdums.

Augļu ogu apstrādei ar biopolimēriem tika izvelēta ogu iemirkšanas metode 2. attēls. Iemērkšana ir piemērotāka neregulārām, nelīdzenām virsmām. Šī metode ir ļoti efektīva, jo biopolimērs apklāj visu apstrādes laukumu.

2.attēls – Ogu paraugu apstrāde biopolimēru šķīdumā

Iegremdētās ogas biopolimērā, ogas tika turētas 2 minūtes labākai biopolimēra pārklājuma izveidei. Pēc biopolimēru pārklājuma izveides ogas no šķīduma izņemtas ar pinceti 3. attēls, lai nebojātu izveidoto pārklājumu.

3.attēls – Ogu paraugu izņemšana no biopolimēru šķīduma

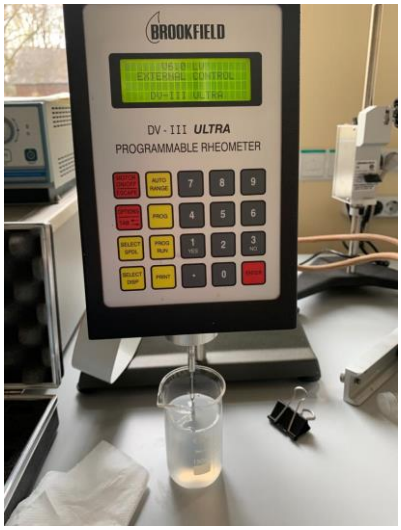
Pēc apstrādes ogu paraugi tika žāvēti žāvējamā skapī 25 °C ar gaisa plūsmu~ 2 m/s. Atbilstoši ogu daudzumam paraugi uzglabāti PET kastītēs ar vāciņiem 4. attēls.

4.attēls – Ogu paraugu uzglabāšana PET kastītēs

Viena parauga svars ir vidēji 0.4 kg. Pirmajā pētījuma gadā pārbaudītas divas biopolimēra šķīduma koncentrācijas (1% levāna šķīdums+1% dekstrāna šķīdums; 3% levāna šķīdums+2% glicerīna šķīdums) un divi uzglabāšanas veidi zemenēm (uzglabāšanas telpas temperatūra +23±1 º C, RH 50±2%, t=24 st.; uzglabāšanas dzesētavā temperatūra +4 ±1 º C, RH 75±2%, t= līdz būtiskai kvalitātes pasliktināšanai), bet avenēm tika pētīts viens uzglabāšanas veids. Pēc iegūtajiem datiem tika izvēlēts labākais uzglabāšanas veids un biopolimēru šķīduma koncentrācija. Tādēļ turpmākajos gados ogu paraugi uzglabāti tikai dzesētavā (temperatūra +4 ±1 º C, RH 75±2%, t=līdz būtiskai kvalitātes pasliktināšanai),ogu apstrādei izmantota viena darba šķīduma koncentrācija (3% levāna šķīdums+2% glicerīna šķīdums).

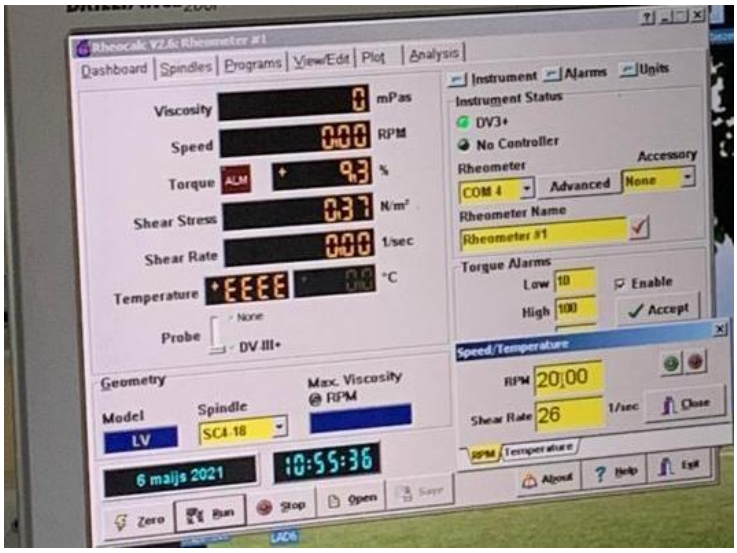
JAUNIZVEIDOTĀ PLĒVJU RAKSTUROJOŠO (ŠĶĪDUMA VISKOZITĀTE, PAGARINĀJUMS LĪDZ PĀRRAUŠANAS BRĪDIM, STIEPES IZTURĪBA) ĪPAŠĪBU NOVĒRTĒJUMS

Ēdamo plēvju izveide ir atkarīga no šķiduma viskozitātes. Ja plēvju veidojošajam šķidrumam viskozitāte ir 25–35 mPas. to izveidei ir jāpiemēro smērēšanas metode. Savukārt ja plēvju veidojošajam šķidrumam viskozitāte ir 1.2–15 mPas tiek izmantota liešanas metode. Plēvju veidojošajam šķidrumam viskozitāte noteikta ar rotācijas tipa viskozimetru *DV III Ultra Programmable rheometer* (Brookfield Engineering Laboratories Inc., ASV) 1. attēls.



1. attēls. Rotācijas tipa viskozimetrs

Paraugu rādījumi tika nolasīti un apstrādāti izmantojot programmu *Rheocalc V2.6,* 2 attēls.

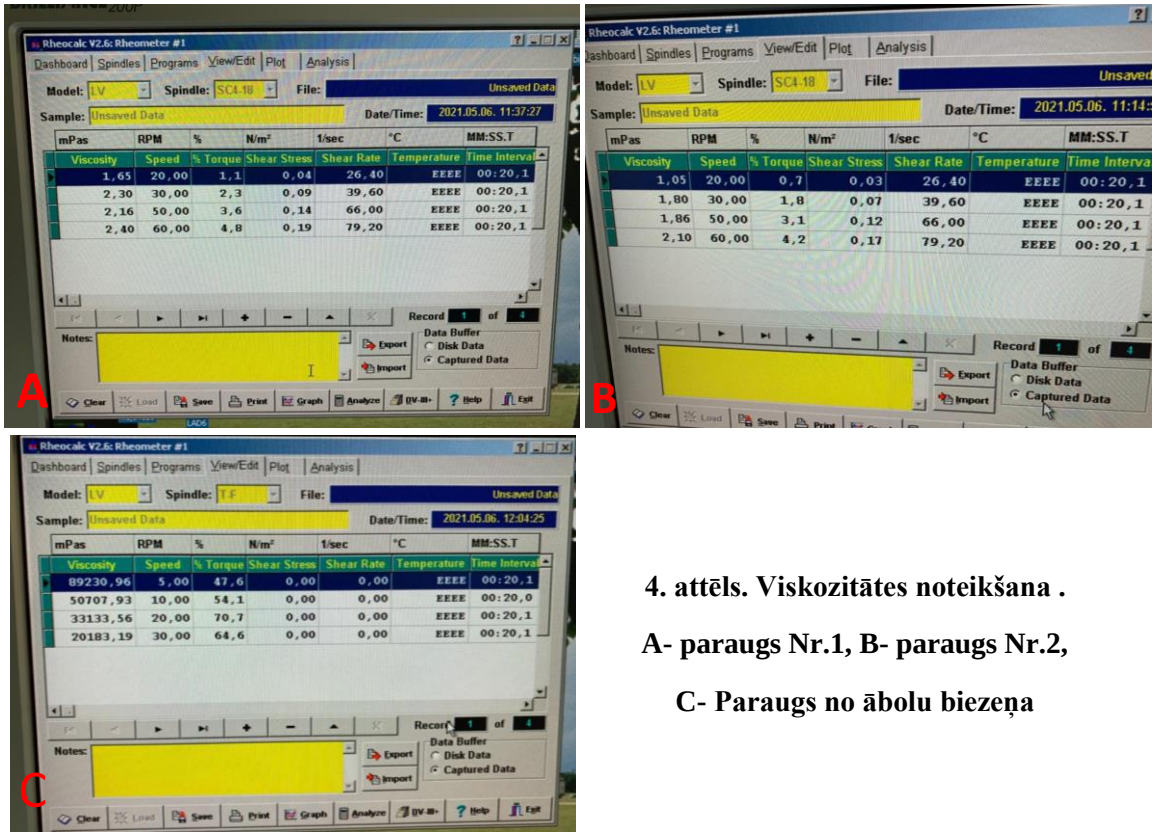


2. attēls. Datu apstrādes un nolasīšanas programmatūra

Rotācijas viskozimetra piederumi un parametri: koncentriskā cilindra vārpsta modelis SC4 – 18; testēšanas temperatūra 20±1 ºC; vārpstas rotācijas ātrums 30 apgr. min^{-1}; testējamā parauga tilpums 50 mL 3 attēls., viskozitātes mērvienība (mPas), katram produkta veidam veikti 4 mērījumi, katru reizi ņemot jaunu paraugu.

3. attēls. Rotācijas tipa viskozimetrs darba procesa režīmā

Pētījumā testētām ēdamajām plēvēm (trīs veidu paraugiem) šķidrumam noteikta viskozitāte 4. attēls.



4. attēls. Viskozitātes noteikšana .

A- paraugs Nr.1, B- paraugs Nr.2,

C- Paraugs no ābolu biezeņa

Pēc pētījumā iegūtiem rezultātiem var konstatēt, ka paraugs Nr1.un 2. ir šķidri un ēdamo plēvju izveidei jāpielieto liešanas metode (jo iegūtie dati ir robežā 1.2–15 mPas) tabula 1. iepriekš minētie paraugi būtiski neatšķiras. Savukārt paraugs, kam pamata receptūrā ir ābolu biezenis ir viskozs (iegūtie skaitļi pat pārsniedza robežu 25–35 mPas) līdz ar to ēdamo plēvju izveidei jāpielieto smērēšanas metode.

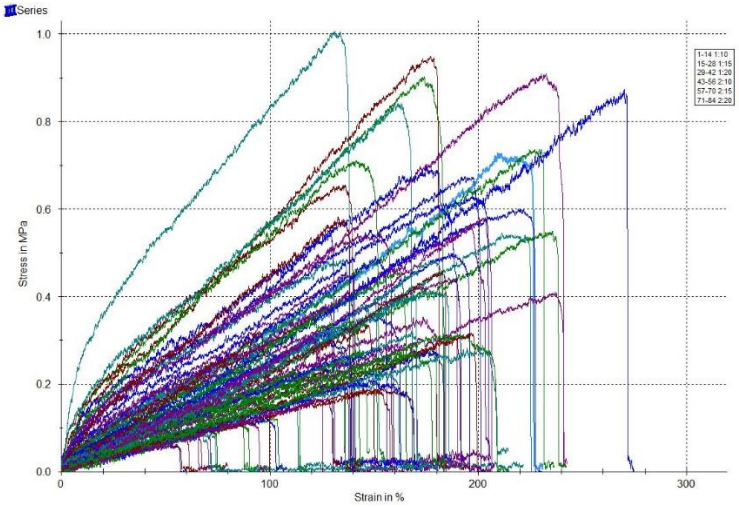
1. tabula

Ēdamo plēvju veidojošo šķidrumu viskozitātes izvērtēšanas rezultāti.

Paraugs	**mPas**	**Standartnovirze**
NR 1.	2.05	0.30
NR 2.	1.85	0.27
Pamata receptūra ābolu biezenis	35624.63	12724.62

Stiepes izturība un pagarinājums līdz pārraušanas brīdim

Tests veikts izmantojot universālo testēšanas mašīnu Zwick/Roell Z020 ar Z-veida dinamometru Zwick 20kN un pneimatiskām klemem (paraugu turētajiem) ar aizvēršanas spēku līdz 2,5 kN (0,8 Bar eksperimenta laika). Ģeometrija mērītā izmantojot bīdmēru MIB (0-160mm, 0,01 mm), izmantojot mikrometru Mitutoyo (0-25mm, 0,001 mm), garums mērīts izmantojot lineāli (0-50 cm, 1mm).Tests veikts atbilstoši LVS EN ISO 527-1; LVS EN ISO 527-3. Paraugi saņemti sametinātā plēvē/maisā, līdz ar to pirms testa paraugi izturēti temperatūrā 23+/-2 ^{o}C bez mitruma kontroles, 24 stundas. Pirms testēšanas paraugi bija sagriezti strēmeles 20 mm platuma, garumu 120-150 mm (100 mm bāzes attālums). Katram paraugam tika veikti trīs biezuma mērījumi. Analizēti paraugi ātri plīsa pie klemes, pat samazinot saspiešanas spēku, līdz ar to tika pieņemts lēmums izmantot plēves turētājus. Paraugs tika ievietots iekārtā un iestiprināts starp parauga turētajiem. Tests veikts ar ātrumu 50 mm/min (standarta ātrums ko izmanto polimēriem), plēvēm ar labu pagarinājumu izmanto ātrumu 100-200 mm/min) līdz paraugs tiks sagrauts. Sākuma posma tika pārbaudītas ēdamo plēvju receptūras kas minētas vairākas atsauces[3,4].Testēto paraugu iegūtie dati atspoguļoti 5. attēla.

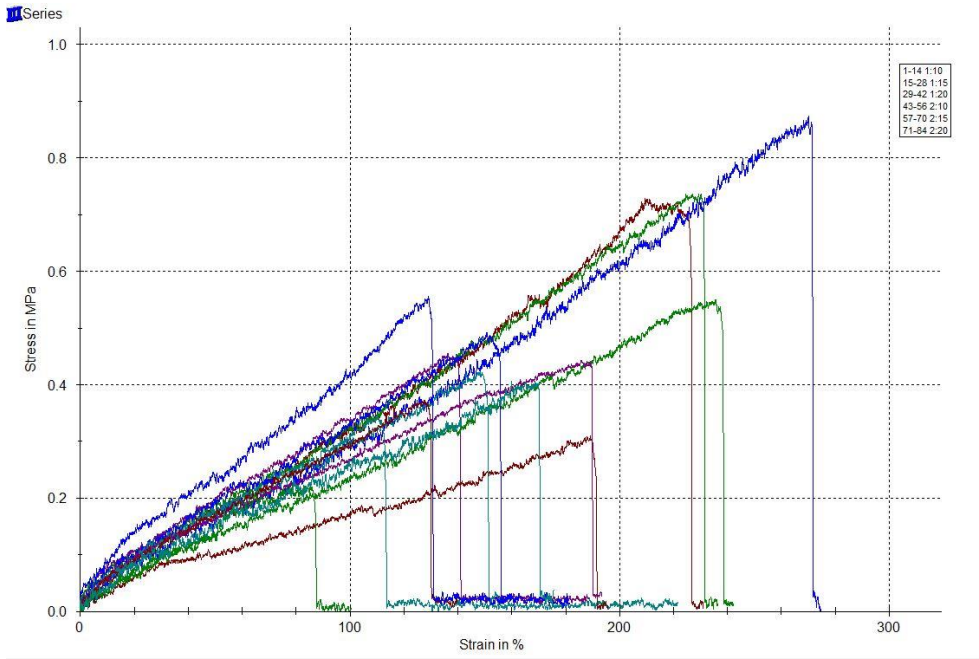


5. attēls. Stiepes izturības līknes analizētiem paraugiem

Kopuma, kā var redzēt pēc iegūtiem datiem, analizētiem paraugiem konstatēta augsta datu izkliede zema stiprība un zems vidējās pagarinājums. Paraugiem no biopolimēra un cassavas cietes[1] konstatēta labāka datu atkārtojamība, bet stiepes izturība bija zema 0.3MPa (polietilēns 30 -35 MPa) 6. attēls.

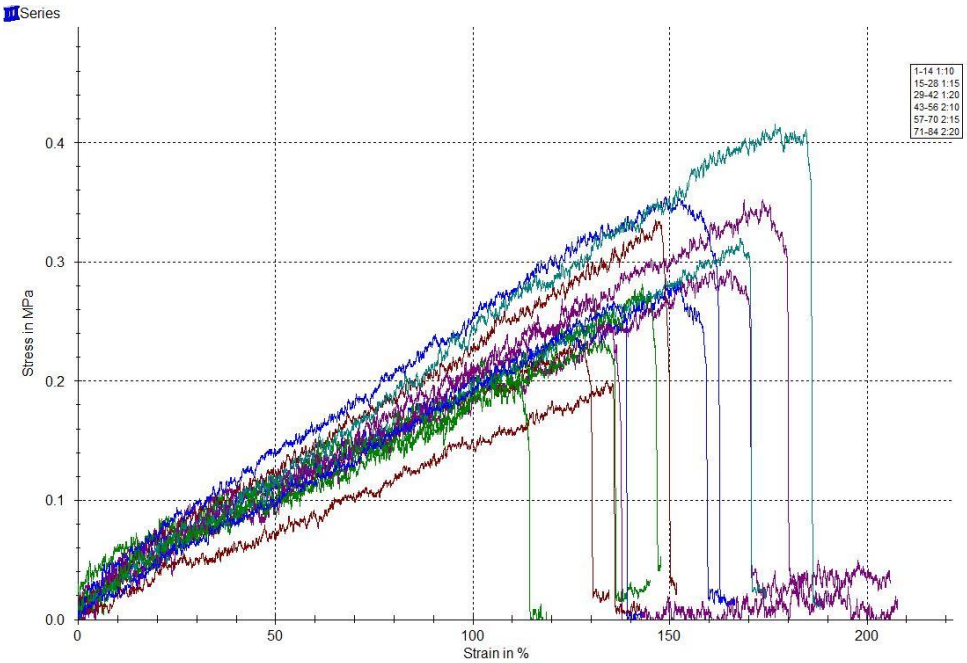
[3] https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.08.003

[4] https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.061



6. attēls. Stiepes izturības līknes paraugiem no biopolimēra un cassavas cietes

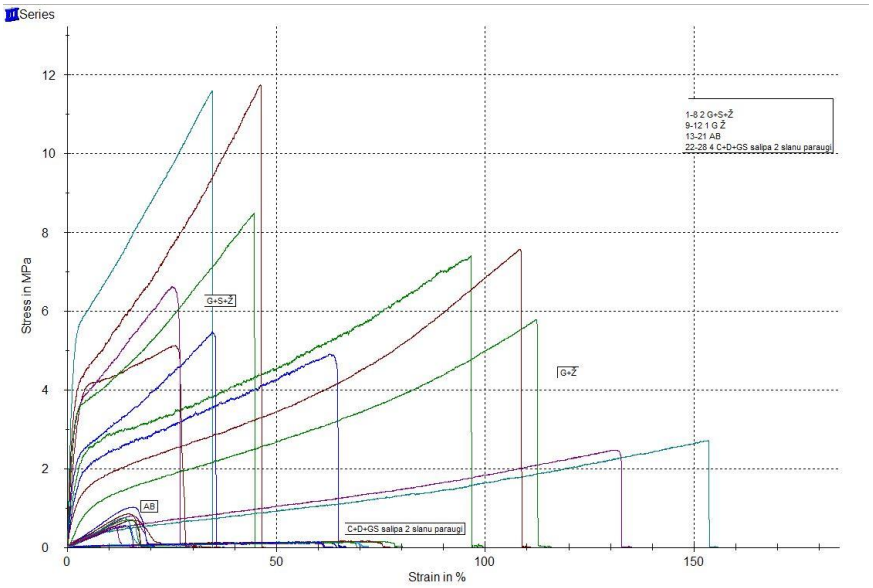
Savukārt paraugiem kam pamata receptūra bija biopolimērs un sorbitols[2] konstatēta zema stiepes izturība un pagarinājums līdz pārraušanas brīdim 3. attēls.



7. attēls. Stiepes izturības līknes paraugiem no biopolimēra un sorbitola

Iegūto negatīvo rezultātu dēļ tika meklētas un pētītas citas ēdamās plēves receptūras[5 6]. Tika atlasīta ēdamo plēvju receptūra, kam pamata bija ābolu biezenis un biopolimērs[3]. Pēc iegūtiem datiem ēdamai plēvei ar ābola biezeņa sastāvdaļu konstatēta salīdzinoši zema ~1 MPa (polietilēns 30 -35 MPa) stiepes izturība, bet tomēr tā bija augstāka salīdzinoši ar iepriekš minētiem paraugiem (5. – 7.

attēls). Savukārt, pagarinājums līdz pārraušanas brīdim bija diezgan labs 20% (polipropelēnam sakot no 50%). Paraugam, kuru sastāvdaļa bija biopolimērs, glicerīns sorbitols un želatīns (protokolā paraugs Nr.2), konstatēta maza datu izkliede, stiepes izturība ~11 MPa un pagarinājums līdz pārraušanas 30 45%, kas ir raksturots, ka diezgan labi radītāji. Savukārt paraugam kam pamata receptūra bija biopolimērs, glicerīns un želatīns (protokolā paraugs Nr.1), bija datu izkliede, salīdzinoši augsta stiepes izturība ~7 MPa un augsts pagarinājums līdz pārraušanas brīdim 90-120%. Līdz ar to secināts, ka iepriekš minētam paraugam spēka deformācijas attiecība ir interesanta padziļināto pētījuma veikšanai.



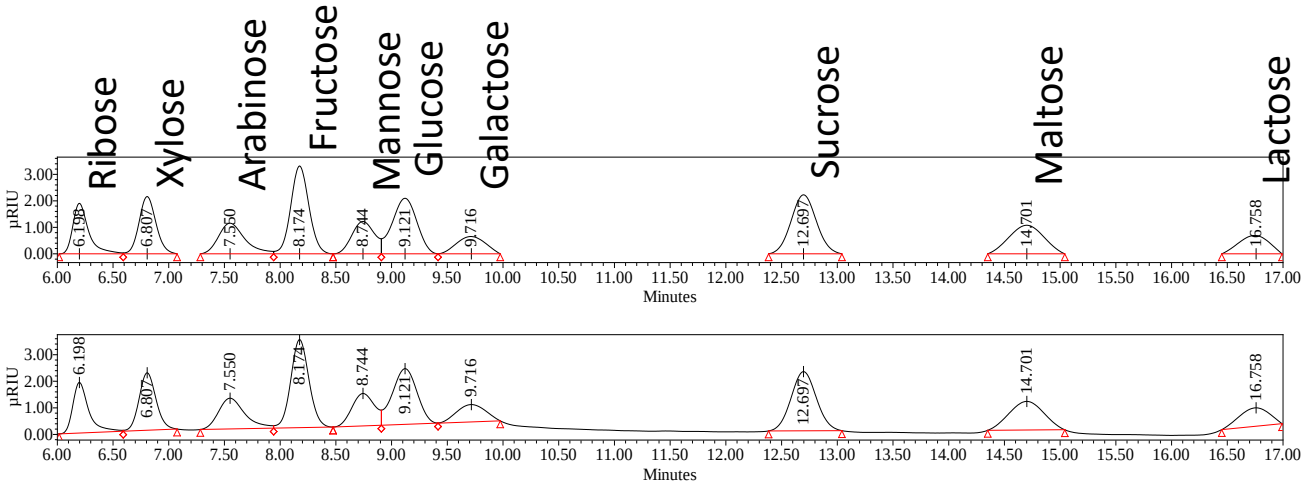
4. attēla. Stiepes izturības līknes paraugiem no biopolimēra un ābola biezeņa, ka arī biopolimēra un želatīna.

Izvērtējot iegūtos datus secināts, ka pētījumi ir jāturpina ar trīs atlasītam receptūrām, kam pamata ir biopolimērs un ābolu biezenis, ka arī biopolimērs un želatīns. Detalizēti pētījumā atlasīto ēdamo plēvju receptūrām var iepazīties protokolā Jaunizveidotā iepakošanas kompozītmateriālu prototipa receptūra, pielietojot EPS.

JAUNIZVEIDOTO BIOPOLIMĒRU KVALITĀTES (ABSOLŪTĀMOLEKULMASA, KONCENTRĀCIJA, SAZAROJUMS, POLIDISPERSITĀTE) NOTEICOŠO PARAMETRU *IZVĒRTĒŠANĀ*.

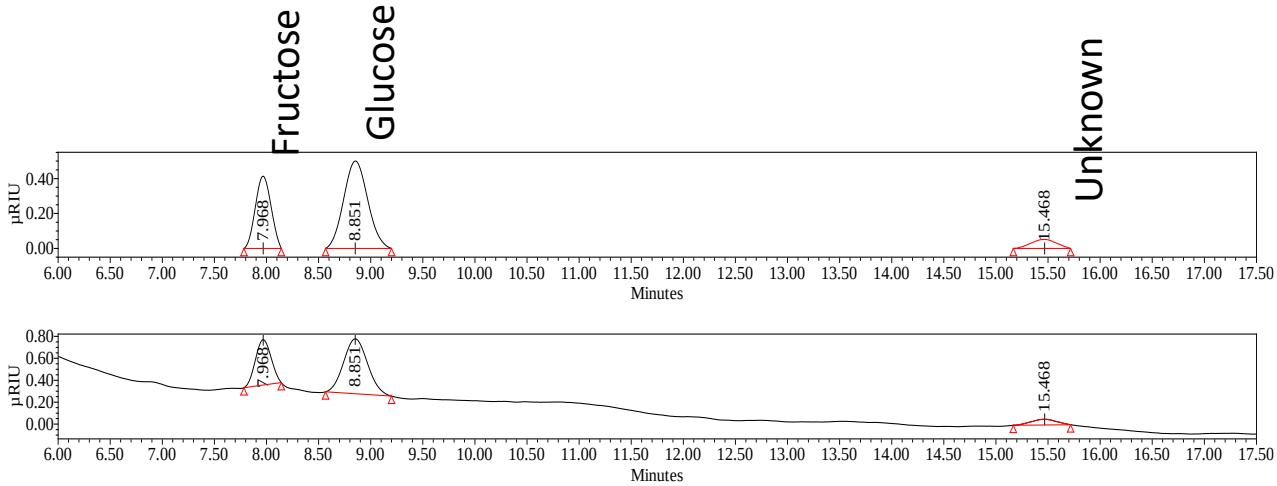
Būtisks radītājs, kas nodrošina ogu uzglabāšanās ilguma pagarināšanos ir biopolimēru kvalitātes raksturojošie parametri. Tādēļ veikta sintēze izmantojot trīs baktēriju sugas *Streptococcussalivarius K12, Leuconostocmesenteroides DSMZ 20343, Zymomonasmobilis ATCC 10988* biopolimēru ieguvei un turpmākai to raksturošanai.

Iegūtajiem biopolimēra paraugiem svarīgi raksturot cukura saturu pēc hidrolīzes. Ja paraugā tiek konstatēti brīvie cukuri, tas liecina par to netību, tādēļ būtiski veikt attīrīšanu, izgulsnējot spirtā. Lai izvērtētu biopolimēru paraugu iegūtos rezultātus tos jāsalīdzina ar cukura standarta līkni 1.attēls.



1.attēls – Cukura noteikšanas standartvielu līkne

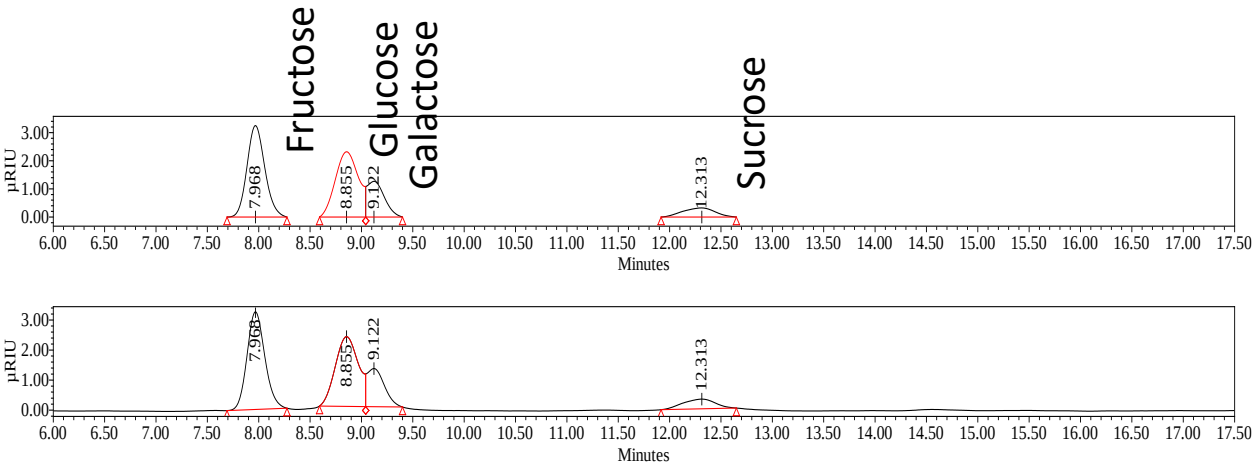
Izvērtējot iegūtos rezultātus 2.attēls secināts, ka biopolimērs, kas iegūts no baktēriju sugas, *Leuconostocmesenteroides* DSMZ 20343 ir kvalitatīvs, brīvie cukuri netika konstatēti.



2.attēls – *Leuconostocmesenteroides* DSMZ 20343 biopolimēra cukura koncentrācijas noteikšana

Levāna dekstrāna attiecība paraugā būtiski neatšķiras (fruktoze – levāna struktūrvienība 7.968; glikoze - dekstrāna struktūrvienība 8.851).

Izvērtējot no *Zymomonasmobilis ATCC 10988* iegūtos biopolimēra rezultātus 3.attēls. konstatēts, ka paraugs bija netīrs, jo tika atrasti tādi cukuri, kā galaktoze un saharoze.



3.attēls – *Zymomonasmobilis ATCC 10988* biopolimēra cukura koncentrācijas noteikšana

Secinājums, iepriekš minēto paraugu pirms pētījuma veikšanas obligāti jāattīra lai atbrīvotos no brīvajiem cukuriem.

JAUNIZVEIDOTĀ IEPAKOŠANAS KOMPOZĪTMATERIĀLU PROTOTIPA RECEPTŪRA

1. Metodes pielietojums

Iepakošanas kompozītmateriālu izveide, pielietojot eksopolisaharīdus (EPS) (1).

2. Analizējamais paraugs

Iepakošanas kompozītmateriālu izpēte. Paraugu mikrostruktūras noteikšana, izmantojot skenējošo elektronisko mikroskopu (SEM) JEOL JSMP 100 (Japan) (2). Formēšanas šķidruma viskozitātes noteikšana, izmantojot iekārtu Brookfield model DV-E, Engineering Laboratories, Inc., Oakland, NJ, (USA) (3). Stiprības-deformācijas rādītāju noteikšana. Stiepes un lieces īpašības (elastības modulis E, tecēšanas robežspriegums σy, tecēšanas deformācija εy, sagraušanas robežspriegums σB, sagraušanas deformācija εB, maksimālo robežspriegumu liecē σM) noteica, izmantojot Zwick Roell firmas universālo materiālu testēšanas iekārtu BDO-FB020TN (4).

3. Materiāli, reaģenti un iekārtas:

a. Nepieciešamie materiāli, iekārtas, kompozītmateriālu izveidei:

- Ūdens vanna-termostats, termoizturīga stikla mērglāze 1000ml, plastmasas lāpstiņa maisīšanai, (ēdamo plēvju formēšanas šķīduma pagatavošanai).
- Svari (ēdamo plēvju sastāvdaļu svēršanai).
- Silikona formas ar maliņām paraugu žāvēšanai.
- Dehidrātors (paraugu žāvēšanai +45+50º C).
- Mitruma svari (iegūto plēvju mitruma noteikšanai).
- Vakuuma iepakotājs, iepakojuma *maisiņi pārtikai* (jaunizveidoto plēvju uzglabāšanai).

3.2. **Nepieciešamie reaģenti:**

- Glicerīns (5-6).
- Sorbitols.
- Pārtikas želatīns.
- Dekstrāns vai levāns.
- Dzeramais ūdens.

4. Metodes apraksts

4.1. Iepakošanas kompozītmateriālu sagatavošanas apraksts:

- Pēc RTU Polimērmateriālu *institūta* sniegtajiem kvalitāti raksturojošiem datiem tika atlasīti divi vērtīgākie paraugi. To receptūra ir atspoguļota tabulā 1.

Tabula 1. Iepakošanas kompozītmateriālu sākotnējās receptūras.

Sastāvdaļas	Paraugs Nr.1	Paraugs Nr.2
	%	%
Glicerīns	**5**	**2.5**
Sorbitols	**-**	**2.5**
Pārtikas želatīns	**6.6**	**5**
Dekstrāns vai levans	**1.4**	**3**
Dzeramais ūdens	**87**	**87**
Kopā	**100**	**100**

- Pēc iegūtajiem datiem starp vērtētiem paraugiem, paraugam Nr.1 ir augstāks pagarinājums līdz pārraušanas brīdim (VAR - 121%). Savukārt paraugam Nr. 2 ir augstāks relatīvo deformāciju radītājs (7.07 MPa).
- Līdz ar to pirms iepakošanas kompozītmateriālu receptūras izvēles ir stingri jāsaprot, kāds ir mērķis jaunizveidotajam iepakojumam, vai ir svarīgi pievērst uzmanību materiāla elastībai vai tā pagarinājumam.
- EPS dekstrāns tika iegūts fermentācijas ceļā, izmantojot baktēriju sugu *Leuconostoc mesenteroides* (7, 8). Bet EPS levāns tika iegūts fermentācijas ceļā, izmantojot baktēriju sugu *Streptococcus salivarius* K12 (9).
- Pamatojoties uz jaunizveidoto plēvju kvalitātes raksturojošajiem parametriem, ir secināts, ka būtiskas atšķirības nav novērotas, vai tiek izmantots EPS levāns vai dekstrāns. Līdz ar to var izmantot šinī brīdī pieejamāko (EPS).

4.2. Sagatavošanas procesa apraksts:

- Uzbriedina želatīnu ūdenī (35°C). Periodiski maisot, izkausē želatīnu ūdens peldē (45-50°C). Pēc pilnīgas tā izkušanas pievieno pārējās sastāvdaļas. Periodiski maisot, turpina kausēt visas sastāvdaļas ūdens peldē (45-50°C), līdz pilnīgai to izkušanai.
- Ar 70 % spirtu dezinficē un attauko silikona formu.
- Iepakošanas kompozītmateriālu šķīdums jāizlej silikona formā ar aprēķinu 0.47g formēšanas šķīduma /cm^2. Pētījumā tika izmantota silikona forma ar izmēriem 42x35 cm. (1. attēls).
- Žāvēšanas skapī ieliek silikona formu ar formēšanas šķīdumu un žāvē apmēram 8 stundas (45-50°C). Līdz jaunizveidoto plēvju mitrums nepārsniegs 8-9 %. (2. attēls).
- Jaunizveidoto plēvi iepako iepakojuma maisiņos, izmantojot *vakuumiepakošanas ierīci.*
- Paraugus uzglabā sausā produktu noliktavā, temperatūra +12° - +18 °C, gaisa relatīvais *mitrums* 60 – 70 %.

1. attēls. Iepakošanas kompozītmateriālu šķīdums silikonā formā

2. attēls. Izžāvētā jaunizveidotā biodegradējamā ēdamā plēve.

5. Literatūras saraksts

1. Сергазиева, О. Д. Применение пленок на основе желатина для сохранения качества пищевых продуктов / О. Д. Сергазиева, Н. В. Долганова // Техника и технология пищевых производств. – 2018. – Т. 48, № 1. – С. 156–163. DOI: 10.21603/2074-9414-2018-1-156-163.
2. Garcia M.A, Martino M.N., Zaritzky N.E., (1999.) Edible Starch Films and Coatings Characterization: Scanning Electron Microscopy, Water Vapor, and Gas Permeabilitie, Scanning Vol. 21(5), 348–353.
3. Dulce C. González Sandoval , Brenda Luna Sosa, Guillermo Cristian Guadalupe Martínez-Ávila , Humberto Rodríguez Fuentes, Victor H. Avendaño Abarca and Romeo Rojas (2019) Formulation and Characterization of Edible Films Based on Organic Mucilage from Mexican Opuntia ficus-indica. Coatings 2019, 9, 506; doi:10.3390/coatings9080506.

4.https://www.rtu.lv/writable/public_files/Agneses_Grigalovicas_darba_kopsavilkums.pdf

5. Пат. 2525926 C1 Российская Федерация, МПК C08J5/18, A61K47/36. Водорастворимая биодеградируемая съедобная упаковочная пленка / Алексанян И. Ю., Пленкин А. В., Нугманов А. Х.-Х., Никулина М. А., Титова Л. М. ; заявитель и патентообладатель Никулина Мария Александровна. – заявл. 01.09.2013 ; опубл. 20.08.2014, Бюл. № 23. – 10 с.

6. Пат. 2458077 C1 Российская Федерация, МПК C08J5/18, C08L5/06, C08L5/08, C08L101/16. Биоразлагаемая пленка на основе пектина и хитозана / Перфильева О. О. ; заявитель и патентообладатель Перфильева Ольга Олеговна. – заявл. 14.12.2010 ; опубл. 10.08.2012, Бюл. № 22. – 7 с.
7. Vaibhao K Lule, Rameshwar Singh, Sarang D Pophaly, Poonam, Sudhir K Tomar. (2016) *Production and structural characterisation of dextran from an indigenous strain of Leuconostoc mesenteroides BA08 in Whey. Society of Dairy Technology.* 69, 1-12
8. Davidović S., Miljković M., Tomić M., Gordić M., Nešić A., Dimitrijević S., (2018). Response surface methodology for optimisation of edible coatings based on dextran from Leuconostoc mesenteroides T3. *Carbohydrate Polymers,* Volume 184, (15) pp. 207-213.
9. Barbour A. and Philip K. (2014) Variable Characteristics of Bacteriocin-Producing *Streptococcus salivarius* Strains Isolated from Malaysian Subjects. *PLoS One*. Volume. 18;9(6):e100541.

SENSORĀS NOVĒRTĒŠANAS ANKETA PĒC LĪNIJU METODES

Lūdzu, novērtējiet paraugiem krāsu + ārējo izskatu; saldumu; rūgtumu; garšu un pēcgaršu.
Paraugu vērtēšanai 12 iedaļu līnijskala, uz kuras jāatzīmē konkrētās īpašības intensitāte.

Parauga šifrs (numurs) _____

Krāsa

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

neizteikta izteikta

Smarža

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

neizteikta izteikta

Izskats

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

neizteikts izteikts

Garša

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

neizteikta ļoti izteikta

Cietība

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

mīksts ciets

Paraugs šifrs _____

Krāsa

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

neizteikta izteikta

Smarža

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

neizteikta izteikta

Izskats

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

neizteikts izteikts

Garša

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

neizteikta ļoti izteikta

Cietība

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

mīksts ciets

ZEMEŅU UN AVEŅU OGU APSTRĀDES METODIKA PIELIETOJOT EKSOPOLISAHARĪDUS

Zemeņu un aveņu ogu virsmas apstrādei izmantotie preparāti:

1. Eksopolisaharīds levāns (sintezēts DI)
2. Eksopolisaharīds dekstrāns (Sigma Aldricht CAS:9004-54-0)
3. Glicerīns (Lach-Ner CAS: 56-81-5)
4. Fizioloģiskais šķīdums (0,9% NaCl)

Iekārtas, aprīkojums un iepakojums zemeņu aveņu ogu apstrādei un uzglabāšanai:

1) Konvencionālā tipa žāvēšanas skapis ar siltā gaisa pieplūdi ~ 2 m/s un mitrā gaisa nosūci (Orakas, Marlemi, Somija);
2) Dzesēšanas telpa ar automātiski regulējamu-kontrolējamu temperatūru;
3) Plastmasas kastes ogu mazgāšanai un apstrādei ar sagatavoto šķīdumu;
4) Pincete ogu izņemšanai no šķīduma (izņemšana notiek saņemot aiz kauslapām, lai iespējami nebojātu izveidojušos pārklājumu uz ogu virsmas);
5) Papīra dvielis (tiek uzklāts uz žāvēšanas sietiem, lai mazinātu otrreizējas mikroorganismu kontaminācijas iespējas);
6) Polipropilēna / polietilēna tereftalāta (PP/PET) kastītes ogu uzglabāšanai (Rumeks, NNZ).

Zemeņu aveņu ogu apstrādes procedūra:

1) Ja zemenes ir netīras tās iegremdē ūdenī, nomazgā, notecina un veic apstrādi fizioloģiskajā šķīdumā
2) Iemērc zemeņu ogas fizioloģiskajā šķīdumā (ar mērķi lai mazinātu ogu virsmas nelabvēlīgo mikrofloru) un apžāvē siltā gaisā ar pieplūdi ~ 2 m/s;
   Divi iepriekšējie punkti neattiecas uz aveņu ogu apstrādi tās netika mazgātas, bet tām uzreiz tika veikta apstrāde ar EPS.
3) Ogas iemērc sagatavotajā apstrādes šķīdumā un iztur 2 minūtes;
4) Zemenes ar pinceti (turot aiz kauslapām), izņem no šķīduma, bet avenes ar sietu izņem no darba šķīduma, notecina lieko mitrumu un novieto uz papīra dvieļiem, liek žāvējamā skapī temperatūrā +20±2 ºC ar gaisa cirkulāciju ~ 2 m/s;
5) Sausas ogas pako PP/PET kastītēs, nosver, marķē un nekavējoši novieto uzglabāšanas pētījumam paredzētajos apstākļos.
6) Katru zemeņu/aveņu apstrādes variantu sagatavo trīs atkārtojumos. viena atkārtojuma svars zemenēm ~ 0.5 kg, bet avenēm ~ 0.4 kg.

Apstrādes šķīdumu koncentrācijas:

Paraugi	Levāns, %	Dekstrāns, %	Glicerīns, %
1.	1	1	-
2.	3	-	2

Paraugu uzglabāšanas apstākļi

Zemeņu uzglabāšanas laika pagarināšanas pētījumam izvēlēti divi dažādi varianti:

1) Uzglabāšana telpā, 20 ±1 °C temperatūrā 24 stundas;
2) Uzglabāšana dzesētavā, +4 ±1 °C, temperatūrā 72 stundas.
   Zemenēm analīzes tika veiktas pirms un pēc ogas uzglabāšanas

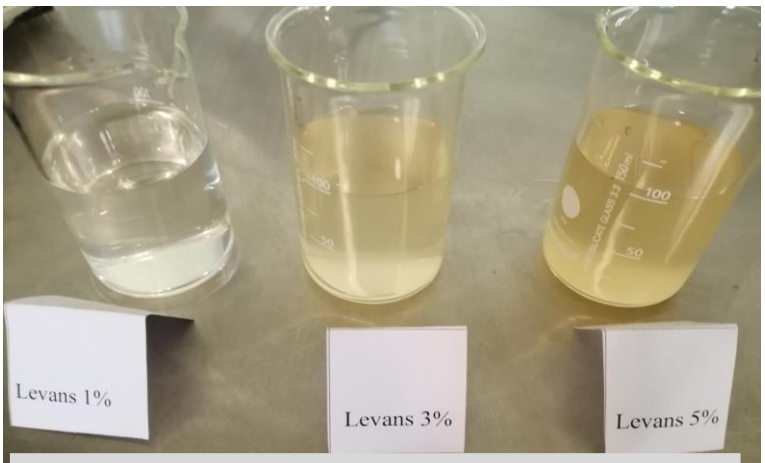
   Aveņu uzglabāšanai izvelētais režīms:

1) Avenes uzglabā dzesētavā, +4 ±1 °C, temperatūrā 72 stundas.

Aveņu ogu analīzes tika veiktas pirms uzglabāšanas un ik pēc 24 stundām.

Zemeņu un aveņu ogu kvalitātes noteikšanai analizē fizikālo, ķīmisko, mikrobioloģisko un sensoro rādītāju izmaiņas:

No p. k.	Rādītāji	Metodes un standarti
1.	Augļu masas samazinājums %,.	Svara metode, elektroniskie svari (± 0.001 g, Vācija)
2.	Ogu cietība N,	Kvikliene et al., 2008
3.	Šķīstošās sausnas saturs, Brix%	LVS EN 12143:2001 Augļu un dārzeņu sulas - Šķīstošās sausnas satura noteikšana - Refraktometriskā metode
4.	Kopējo skābju saturs, %	LVS EN 12147:2001 Augļu un dārzeņu sulas - Titrējamā skābuma noteikšana
5.	Kopējo antociānu saturs mg 100 g^{-1}	
6.	Kopējo fenolu saturs, mg GAE 100 g^{-1} /	Spektrofotometriskā metode/ (Singleton et al., 1999)
7.	Sensorās analīzes – Līnijskala	ISO 4121:2003 Sensory analysis – *Guidelines for the use of quantitative response scales*
8.	Paraugu mikroflora noteikta atbilstoši standartam	LVS ISO 18593:2007"Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija.
9.	Mezofīli aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu (MAFAM) noteikšana atbilstoši standartam	LVS EN ISO 4833-2:2014 „Pārtikas ķēdes mikrobioloģija. Mikroorganismu skaitīšanas horizontālā metode. 2. daļa: Koloniju skaitīšana ar virsmas noklāšanas metodi pie 30 °C temperatūras" un izmantojot „Scharlau" firmas selektīvo barotni „Nutrient agar" (Ref. 064–TA2144).
10.	Raugu un pelējumu noteikšana atbilstoši standartam	LVS ISO 21527-1:2008 „Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Horizontālā metode rauga sēnīšu un pelējumsēnīšu skaitīšanai. 1.daļa: Koloniju skaitīšanas metode produktiem ar ūdens aktivitāti virs 0,95" un izmantojot „Scharlau" firmas selektīvo barotni „Malt Extract Agar „ (Ref. 01–573).
11.	Pienskābes baktērijas noteiktas saskaņā ar standartu	ISO 9332:2003 lietojot firmas *Scharlau* MRS agaru (ref. 01–135).



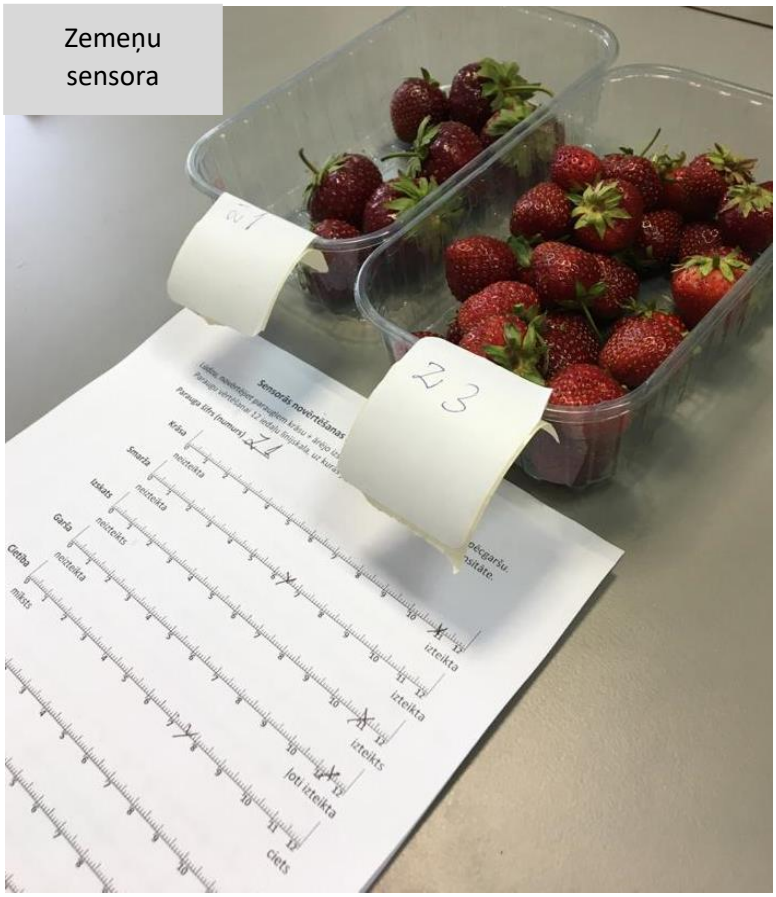
Sākotnēji izvelēto koncentrāciju testēšana.

Ar biopolimēru apstrādātas zemenes.

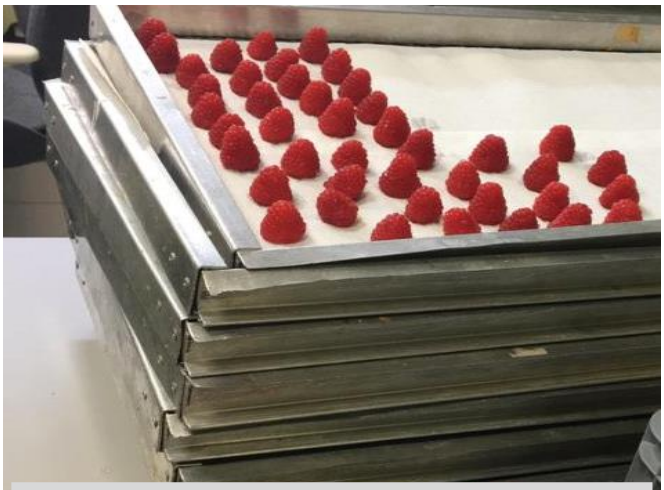
Sākotnēji izvelēto koncentrāciju izpēte.

Uzglabāšana telpas temperatūra (+23±1 º C, RH 50±2%, t=24 st.)

Uzglabāšana
dzesētavā


Zemeņu
sensora
Sensorās novērtēšanas
Krāsa
Smarža
Izskats
Garša
Cietība
neizteikta
izteikta
izteikts
ļoti izteikta
ciets
mīksts

Kopējo skābju satura noteikšana ar titrēšanas metodi



Aveņu apstrāde ar biopolimēriem.

Aveņu sensora vērtēšana
Sensorās novērtēšanas anketa pēc līniju metod
Paraugu šifrs (numurs)
Krāsa
neizteikto
Izskats
izteikts
Garša
izteikta
Smarža
neizteikta
Cietība
mīksta

DL-3.7
SL1.7
SL3.7
SK 7

Avenes pēc 4 dienu uzglabātas dzesētavā +4 ±1 º C RH

4. SADAĻA: PROJEKTA REZULTĀTU APKOPOJUMS UN SECINĀJUMI

Projekta ietvaros tika sasniegti visi mērķi, ka arī tika izdarīti sekojošie secinājumi:

- Projekta ietvaros tika izstrādātas alternatīvas barotnes vērtīgu biopolimēru iegūšanai: sūkalu, ābolu sulas, kā arī krūmcidoniju sīrupa barotnēs. Līdz ar to vienlaicīgi tik sniegts risinājums šo blakusproduktu utilizēšanai, veicinot aprites ekonomikas principu ieviešanu;

- Starp izvērtētajiem BC producējošiem celmiem *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463 celms ir vislabāk piemērots BC iegūšanai uz siera sūkalām;

- BC produktivitāti sūkalu barotnē var būtiski uzlabot, veicot sūkalu pirmsapstrādi, tai skaitā tās pakļaujot enzimātiskajai apstrādei ar β-galaktozidāzi, kā arī pievienojot papildus augšanas faktorus (piem. kukurūzas ekstraktu u.c.);

- Atlasītais celms *Novacetimonas hanseni* MSCL 1646 nodrošina vislabāko BC sintēzi uz ābolu sulas (1:2) atšķaidījumā ar gaļas ekstrakta (15 g/L) piedevu;

- Ir izstrādāts biopolimēru ražošanas iekārtas prototips – rotācijas disku bioreaktors, kas uzlabo BC ražu 3 – 5 reizēs (atkarībā no barotnes) salīdzinājumā ar statisku kultivāciju, ka arī samazina kultivācijas laiku aptuveni divās reizes;

- BC plēves spēj būtiski uzlabot pelējuma sieru (rokfora tipa) nogatavināšanās procesu, veicinot ierauga mikrofloras attīstību un gāzu apmaiņu, vienlaicīgi pasargājot produktu no kontaminācijas un samazinot siera zudumus;

- Izmantojot BC plēves siera nogatavināšanas procesā, uzlabojas siera sensoras īpašības;

- Biopolimēri tika veiksmīgi izmantoti atšķirīgu biodegradējamo kompozītu izveidei: iepakošanas materiālu un aizsargplēvest;

- Izstrādāti biopolimēru kompozītmateriāli spēj būtiski uzlabot augļu uzglabāšanas laiku un veicina siera nogatavināšanās procesu;

- Biopolimēru apstrāde ietekmē ogu fizikālos un ķīmiskos rādītājus uzglabāšanas laikā, bet būtiski neizmaina sensorās īpašības;

- Konstatēts, ka pēc septiņu dienu ogu uzglabāšanas mazāki masas zudumi konstatējami pēc to apstrādes ar biopolimeru pārklājumu. Tātad, biopolimēru pārklājums samazināja ogu mitruma zudumus (ogu izžūšanu);

- Ogu virsmas apstrādei var izmantot 2% BC šķīdumu ar pektīna piedevu, ka arī EPS (dekstrāna un levāna) pārklājumus (2%);

- Ogām vērojama cietības palielināšanās tendence pēc septiņu dienu uzglabāšanas, kas norāda uz biopolimēru apstrādes pozitīvo iedarbību;

- Kopējo skābju saturs mazāk samazinājās apstrādātajiem ogu paraugiem, līdz ar to vērojama apstrādes ietekmes efektivitāte;

- Biopolimēru apstrāde mazināja antocianīnu sastāva izmaiņas, kas var liecināt par palēninātu nogatavināšanās procesu ogās.

- Sensorās vērtēšanas rezultāti liecina par to, ka vērtētajiem nav iebildumi pret ogu virsmas apstrādi ar biopolimēriem, jo pēc garšas šie paraugi ir novērtēti līdzvērtīgi ar neapstrādātajām ogām;

- Ogu apstrāde un/vai uzglabāšana biopolimēru plēvē/pārklājumā samazināja raugu, mikroskopisko sēņu un baktēriju, tostarp pienskābes attīstību;

- Ir konstatēts, ka levāna šķīduma pievienošana ogu virsmas apstrādes gaitā, kā arī tā iekļaušana absorbējošo paliktņu kompozītmateriāla receptūrā būtiski uzlabo ogu nemainīgās kvalitātes saglabāšanos un paildzina to derīguma termiņu.

- Bakteriālās celulozes klātbūtne biopolimēru kompozītmateriālu sastāvā būtiski uzlabo iepakošanas plēvju, ogu virsmas pārklājumu un absorbējošo paliktņu fizikālās un mehāniskās īpašības, tādējādi nodrošinot vislabāko ietekmi uz ogu uzglabāšanas ilgumu nemainīgā kvalitātē.

- Izvērtējot trīs sezonu uzglabāšanas datus (fizikāli – ķīmiskos, sensoros, mikrobioloģiskos) konstatēts, ka ir novērota tendence ar pārklājumu un/vai plēvi uzglabāto ogu derīguma termiņa paildzināšanai. Tādēļ secināts, ka izmantojot apstrādi un /vai uzglabāšanu biopolimēru plēvē/ pārklājumā, ogu (zemeņu, aveņu) derīguma termiņš varētu sasniegt septiņas dienas dzesētavā (+4 ±1 °C, gaisa relatīvais mitrums 75±2 %).

5. SADAĻA – PUBLICITĀTE

Zinātniskās publikācijas

1. S. Kolesovs, K. Neiberts, S. Beluns, S. Gaidukovs, P. Semjonovs (2022), Bacterial cellulose production by *Novacetimonas hansenii* MSCL 1646 on apple juice. Applied Microbiology and Biotechnology. Pieņemts publicēšanai (*SCOPUS*).
2. P. Zikmanis, S. Kolesovs, M. Ruklisha, P. Semjonovs (2021), Production of bacterial cellulose from glycerol: the current state and perspectives. Bioresources and Bioprocessing, 8:116. https://doi.org/10.1186/s40643-021-00468-1; (*SCOPUS*).
3. P. Zikmanis, K. Juhnevica-Radenkova, V. Radenkovs, D. Seglina, I. Krasnova, S. Kolesovs, Z. Orlovskis, A. Silaks, P. Semjonovs (2021), Mocrobial polymers in edible films and coatings of garden berry and grape: current and prospective use. Food and Bioprocess Technology, 14:1432–1445. https://doi.org/10.1007/s11947-021-02666-3 (*SCOPUS*).
4. P. Zikmanis, K. Brants, S. Kolesovs, P. Semjonovs (2020), Extracellular polysaccharides produced by bacteria of the Leuconostoc genus. World J of Microbiol and Biotech, 36:161. https://doi.org/10.1007/s11274-020-02937-9 (*SCOPUS*).
5. S. Kolesovs, P. Semjonovs (2020), Production of bacterial cellulose from whey – current state and prospects. Applied Microbiology and Biotechnology. 104:7723–7730. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10803-9; (*SCOPUS*).
6. P. Zikmanis, S. Kolesovs, P. Semjonovs (2020), Production of biodegradable microbial polymers from whey (*SCOPUS*). Bioresour. Bioprocess, 7:36. https://doi.org/10.1186/s40643-020-00326-6.

Projekta ietvaros izstrādātie zinātniskie raksti ir norādīti 1. pielikumā.

Starptautiskās zinātniskās konferences

1. S. Kolesovs, P. Semjonovs. Microalgae originated biostimulants as a sustainable alternative for agriculture. 80th International Scientific Conference of the University of Latvia "Innovative and applied research in Biology", 03.02.2022, Rīga, Latvija stenda referāts;
2. I. Borbale, K. Neiberts, M. Ruklisha, P. Semjonovs, S. Koļesovs. Bacterial cellulose production on apple juice. 80th International Scientific Conference of the University of Latvia "Innovative and applied research in Biology", 03.02.2022, Rīga, Latvija, mutisks referāts;
3. K. Neiberts, I. Borbale S. Koļesovs, P. Semjonovs. Bacterial cellulose production on whey. 80th International Scientific Conference of the University of Latvia "Innovative and applied research in Biology", 03.02.2022, Rīga, Latvija, mutisks referāts;
4. S. Kolesovs, K. Neiberts, P. Semjonovs. Bacterial cellulose production on whey – an overview of prospects. 79th International Scientific Conference of the University of Latvia "Innovative and applied research in Biology", 05.02.2021, Rīga, Latvija, mutisks referāts. Tēzes, 20-22. https://doi.org/10.22364/iarb.2021.04;
5. Karina Juhņeviča-Radenkova, Vitalijs Radenkovs, Dalija Segliņa, Inta Krasnova, Pāvels Semjonovs, Sergejs Koļesovs, Pēteris Zikmanis, Maija Rukliša. *78th International Scientific Conference of the University of Latvia "Innovative and applied research in Biology".* 'Edible coatings for berries: An innovative, perspective and environmentally friendly approach to berry storage'. 30th January 2020. Riga Latvia.
6. Juhņeviča-Radenkova K., Radenkovs V., Segliņa D., Semjonovs P., Koļesovs S., Zikmanis P. Latvijas Agronomu biedrības un Latvijas Lauksaimniecības un meža zinātņu akadēmijas organizētā zinātniski praktiskā konferencē *„Līdzsvarota lauksaimniecība 2021".* "Pētījumi lauksaimniecībā ES zaļā kursa kontekstā" (Pārtikas plēves jeb ēdamais pārklājums, ko mēs par tām zinām? 16.02.2021. Jelgavā, Latvijā.
7. Vitalijs Radenkovs, Karina Juhņeviča-Radenkova, Dalija Segliņa, Inta Krasnova, Ieva Kalniņa, *"Sustainable horticulture from plant to product: Challenges in temperate climate".* Obtaining of bio-degradable polymers from renewable resources for production of protective coatings and packaging materials for fruits. sesijā: Food processing and chemistry. 26.08.2021. Dobele, Latvia.

8. K. Juhņeviča Radenkova, V. Radenkovs, I. Krasnova, D. Segliņa, I. Kalniņa, P. Zikmanis LLU Lauksaimniecības fakultātes, Latvijas Agronomu biedrības un Latvijas Lauksaimniecības un meža zinātņu akadēmijas organizētā zinātniski praktiskā konference *„Līdzsvarota lauksaimniecība 2022"* Bionoārdāmo polimēru materiālu izstrāde ēdamo pārklājumu un plēvju ražošanai, izmantojot videi draudzīgu un ilgtspējīgu biotehnoloģisku pieeju. 24.02.2021. Jelgavā, Latvijā.

Tēzes konferenču rakstu krājumos

1. S. Kolesovs, K. Neiberts, P. Semjonovs. Bacterial cellulose production on whey – an overview of prospects. 79th International Scientific Conference of the University of Latvia "Innovative and applied research in Biology", 05.02.2021, Rīga, Latvija, mutisks referāts. Tēzes, 20-22. https://doi.org/10.22364/iarb.2021.04
2. Juhņeviča-Radenkova Karina, Radenkovs Vitalijs, Segliņa Dalija, Krasnova Inta, Semjonovs Pāvels, Koļesovs Sergejs, Zikmanis Pēteris, Rukliša Maija. Edible coatings for berries: an innovative, perspective and environmentally-friendly approach to berry storage https://dspace.lu.lv/dspace/bitstream/handle/7/53311/Proceedings_LU78_2020_LUBI.pdf?sequence=1&isAllowed=y
3. Juhņeviča-Radenkova K., Radenkovs V., Segliņa D., Semjonovs P., Koļesovs S., Zikmanis P. Pārtikas plēves jeb ēdamais pārklājums, ko mēs par tām zinām? https://llufb.llu.lv/conference/lidzsvar_lauksaim/2021/Tezes_2021_Lidzsvarota-lauksaimnieciba_LLU_LF.pdf
4. Vitalijs Radenkovs, Karina Juhņeviča-Radenkova, Dalija Segliņa, Inta Krasnova, Ieva Kalniņa. Obtaining of bio-degradable polymers from renewable resources for production of protective coatings and packaging materials for fruits. https://www.darzkopibasinstituts.lv/sites/dobele/files/files/lapas/DI_Book_of_Abstract_2021_1.pdf
5. Juhņeviča-Radenkova K., Radenkovs V., Krasnova I., Segliņa D., Kalniņa I., Zikmanis P. Bionoārdāmo polimēru materiālu izstrāde ēdamo pārklājumu un plēvju ražošanai, izmantojot videi draudzīgu un ilgtspējīgu biotehnoloģisku pieeju. https://www.lf.llu.lv/sites/lf/files/2022-02/Lidzsvarota_lauksaimnieciba_Tezes_2022_0.pdf

Populārzinātniskās publikācijas

1. P. Semjonovs, P. Zikmanis, A. Šilaks, K. Neiberts, S. Kolesovs (2021), No sūkalām līdz bioplastmasai. Saimnieks LV, 6:108–112
2. P. Semjonovs, P. Zikmanis, S. Kolesovs (2021) Sūkalu pārstrāde augstas pievienotās vērtības produktos: problēmas un biotehnoloģiskie risinājumi. Saimnieks LV Portals, https://saimnieks.lv/raksts/sukalu-parstrade-augstas-pievienotas-vertibas-produktos-problemas-un-biotehnologiskie-risinajumi# 8/
3. Karina Juhņeviča-Radenkova, Inese Drudze, Pāvels Semjonovs, Ēdamie pārklājumi ogām – perspektīvs un videi draudzīgs uzglabāšanas risinājums, Agro Tops, 2020. gada marts.
4. Karina Juhņeviča-Radenkova, Inese Drudze, "Ēdamie augļu un ogu pārklājumi", Agro Tops" 2021. gada februāris.
5. Karina Juhņeviča-Radenkova, Vitalijs Radenkovs, Ēdamais iepakojums – var daļēji atrisināt atkritumu problēmu "Saimnieks" 2022. jūlijs.

Projekta ietvaros izstrādātie populārzinātniskie raksti ir norādīti 2. pielikumā.

Publicitāte EIP tīklā

- LU
- Informācija par projektu publicēta Lauku tīklā un atrodama šeit: http://www.laukutikls.lv/nozares/lauku-telpa/raksti/biopolimeru-parklajumi-ogu-kvalitates-saglabasanai

Dalība tematiskajos dārzkopības pasākumos (APP Dārzkopības institūts)

- Karina Juhņeviča-Radenkova, Vitalijs Radenkovs, Dalija Segliņa, Inta Krasnova: "Ēdamie pārklājumi ogām inovatīvs, perspektīvs un videi draudzīgs uzglabāšanas risinājums". (2020. marts).

PIELIKUMI

1. PIELIKUMS: PROJEKTA IETVAROS IZSTRĀDĀTIE ZINĀTNISKIE RAKSTI

1. S. Kolesovs, K. Neiberts, S. Beluns, S. Gaidukovs, P. Semjonovs (2022), Bacterial cellulose production by Novacetimonas hansenii MSCL 1646 on apple juice. Applied Microbiology and Biotechnology. Pieņemts publicēšanai (SCOPUS).

Applied Microbiology and Biotechnology
https://doi.org/10.1007/s00253-022-12213-5

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING

Bacterial cellulose production by *Novacetimonas hansenii* MSCL 1646 on apple juice

Sergejs Kolesovs[1] · Kristaps Neiberts[1] · Sergejs Beluns[2] · Sergejs Gaidukovs[2] · Pavels Semjonovs[1]

Received: 13 July 2022 / Revised: 18 September 2022 / Accepted: 22 September 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract
Biomaterials and biopolymers, such as bacterial cellulose (BC), are becoming increasingly important as sustainable materials with a wide range of potential applications. However, BC industrial production is associated with several difficulties such as low BC production yields and high production costs; therefore, cheap alternative growth media, e.g. apple juice are being studied intensively. The aim of this study is to evaluate BC synthesis under static conditions on apple juice medium (AJM). The optimal concentration of apple juice in unsupplemented AJM for *Novacetimonas hansenii* MSCL 1646 was shown by its dilution 1:6 with water, which resulted in 0.89 ± 0.01 g/L of dry BC weight after 10 cultivation days. Low BC synthesis can be associated with insufficient N concentration in apple juice; therefore, different organic and inorganic N sources were evaluated in combination with AJM, and beef extract (5 g/L) was found to be the most suitable. Further, AJM optimisation experiment showed the optimal apple juice and beef extract concentrations as 1:2 and 15 g/L respectively, which resulted in 17.27 ± 0.07 g/L of dry BC weight, which is significantly higher than in standard Hestrin-Schramm (HS) medium (4.07 ± 0.02 g/L). Analysis of mechanical and physical properties showed that use of AJM results in changes in BC properties compared with the standard HS medium. Results of the study indicate that apple juice is an effective and cheap C source that in combination with appropriate N source leads to high BC synthesis and makes it suitable for industrial BC production.

Key points
- *Low quality apples can be used as raw material for BC production;*
- *Beef extract improves BC synthesis in apple juice medium;*
- *Use of apple juice and beef extract affect mechanical properties of BC.*

Keywords Bacterial cellulose · Biopolymers · Fruit · Apple juice · *Novacetimonas* · Acetic acid bacteria

Introduction

Biomaterials and biopolymers are gaining increased importance as potential eco-friendly materials with wide range of potential applications (Yadav et al. 2015). Bacterial cellulose (BC)—an exopolysaccharide synthesised mostly by acetic acid bacteria (AAB) species—is one of these biopolymers (Gullo et al. 2018; Rajwade et al. 2015). BC exhibits unique physical and mechanical properties such as high purity, high degree of polymerisation (14,000–20,000), high water holding capacity (> 95%), good mechanical strength (200–300 MPa), elasticity (15–35 GPa), high crystallinity (60–90%) and high porosity (Huang et al. 2014; Klemm et al. 2005; Reddy and Yang 2015; Tahara et al. 1997). These properties are significantly higher than for plant-origin cellulose, which requires additional expensive steps of cellulose purification from lignin and hemicellulose (Huang et al. 2014; Klemm et al. 2005). Moreover, BC biotechnological production reduces the need to destroy forests and ecosystems for plant-origin cellulose production or to overexploit agricultural land (Muhamad et al. 2017).

BC has many potential applications starting from food industry and packaging materials to biomedicine and electronics (Azeredo et al. 2019; Blanco Parte et al. 2020;

✉ Pavels Semjonovs
pavels.semjonovs@lu.lv

[1] Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology, University of Latvia, Ojara Vaciesa Street 4, LV-1004 Riga, Latvia

[2] Institute of Polymer Materials, Faculty of Materials Science and Applied Chemistry, Riga Technical University, Paula Valdena Street 3/7, LV-1048 Riga, Latvia

Published online: 07 October 2022

Gorgieva and Trček 2019; Zikmanis et al. 2021a). However, BC production and commercialisation are associated with several difficulties, one of which is high BC production costs (da Gama and Dourado 2018). Bacterial growth media can reach up to 30% of total BC production costs (Rivas et al. 2004). Research show that use of alternative growth media can be considered to decrease overall production costs and increase BC productivity significantly, compared with standard cultivation medium (Jozala et al. 2015; Kolesovs and Semjonovs 2020; Zikmanis et al. 2021b). However, BC production on alternative media is highly strain specific (Jozala et al. 2015; Salari et al. 2019). Moreover, it can result in significant changes of BC physical and mechanical properties (Potivara and Phisalaphong 2019; Revin et al. 2018).

Apple juice can be considered one of the alternative bacterial growth substrates for BC production. Right now, food loss and waste is one of the biggest global problems (Güzel and Akpınar 2020; Santos et al. 2020). Annually, one-third of all foods produced (approximately 1.3 billion tons/year) are lost during harvest, post-processing, transportation, retail, and distribution. Moreover, approximately 40% of all fruits are wasted every year (Plazzotta et al. 2020; Santos et al. 2020). Apple (*Malus domestica*) is one of the most economically important nutrient-rich fruits grown in all temperate zones (Patocka et al. 2020). Nevertheless, approximately 30–40% of the total apple harvest is not sold or used for other application (Bandyopadhyay et al. 2018). Apples can be used to produce apple juice which is rich in sugars such as glucose 9.3–32.2 g/L, fructose 66.1–96.0 g/L, sucrose 8.5–55.1 g/L, with total sugars reaching 110.9–164.4 g/L, respectively (Karadeniz and Ekşi 2002). Moreover, apples provide a wide range of macro and micronutrients along with polyphenols, polysaccharides (pectin), organic acids and vitamins (Patocka et al. 2020). Off-market apples can potentially be used as a cheap substrate for BC synthesis.

In literature, several studies have been dedicated to BC production using different fruit juices. It has been shown that different AAB strains can successfully use various juices as the main C source for BC production, although BC productivity may significantly vary among fruit juices (Adebayo-Tayo et al. 2017; Kurosumi et al. 2009). Only a few studies were dedicated to investigation of BC production using apple juice (Bandyopadhyay et al. 2018; Kurosumi et al. 2009; Urbina et al. 2017; Zhang et al. 2020). It was noted that BC synthesis on raw apple juice medium (AJM) is relatively low not exceeding 0.36 ± 0.01 g/L (Urbina et al. 2017). Despite this, AJM it can be used as a cheap C source, if the productivity of the process is increased. The main disadvantage of apple juice is lack of N in the medium (Kurosumi et al. 2009). However, a combination of apple juice and a cheap N source, e.g. corn steep liquor (CSL) or diammonium phosphate (Costa et al. 2017; Sperotto et al. 2021), as shown, can result in high BC synthesis and a significant reduction in total production costs. The aim of the study was to evaluate raw and modified apple juice as an alternative medium for BC production.

Materials and methods

Preparation of medium

Standard Hestrin-Schramm (HS) medium was used for the preparation of inoculum and for comparison with AJM under study. HS medium composition was: glucose, 20.0 g/L, yeast extract, 5.0 g/L, bacteriological peptone, 5.0 g/L, disodium phosphate, 2.7 g/L, citric acid, 1.15 g/L, distilled water, 1000 mL (Hestrin and Schramm 1954). Before sterilisation, pH in the medium was adjusted to 7.0 ± 0.1 with 1 M NaOH and 1 M HCl. All media were autoclaved at 121 ℃ for 15 min.

For AJM preparation, off-market apples (*M. domestica*) from a local household (Bauska district, Latvia) were used. Apple juice was obtained by use of a mechanical squeezer. Juice was separated into 0.5-L portions and stored frozen at − 20 ℃. The resultant apple juice was used for all the trials. Initial sugar contents in apple juice were determined using the sucrose/fructose/glucose (K-SUFRG 04/18) enzymatic kit (Megazyme, Wicklow, Ireland) following the manufacturer's instructions. The concentrations of sugars in apple juice were as follows: glucose 20.10 ± 2.14 g/L, fructose 72.88 ± 2.28 g/L, sucrose 65.73 ± 3.73 g/L (ratio 2:7.3:6.5). Before sterilisation at 121 ℃ for 15 min, the pH of apple juice preparation was adjusted to 7.0 ± 0.1 with 1 M NaOH and 1 M HCl solutions.

To obtain different AJM concentrations, the apple juice was diluted with distilled water. For apple juice media modifications, different N sources such as yeast extract, peptone, whey protein concentrate (WPC), CSL, diammonium phosphate, casein hydrolysate, and beef extract were used at 5 g/L concentration (Son et al. 2003; Hungund and Gupta 2010; Costa et al. 2017; Sperotto et al. 2021). For combined apple juice and beef extract media optimisation, different concentrations of apple juice (with no water addition, 1:2, 1:4, 1:6) and beef extract (5 g/L, 10 g/L, 15 g/L) were used.

Bacterial strains

BC synthesis on raw apple juice and modified AJM was tested using three AAB strains: *Novacetimonas hansenii* MSCL 1646, *Komagataeibacter rhaeticus* MSCL 1463, and *N. hansenii* DSM 5602. The first two strains were isolated at the Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology, University of Latvia (Semjonovs et al. 2017) and deposited in the Microbial Strain Collection of Latvia (MSCL). *N. hansenii* DSM 5602

culture was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ).

BC synthesis experiments

Prior to inoculation, all bacterial strains were stored frozen in standard HS medium at − 18 ℃ with addition of 20% glycerol. Preparation of inoculum was carried out by adding bacteria for inoculation to 500-mL volume Erlenmeyer flasks filled with 100 mL standard HS medium and cultivation under shaking conditions (150 rpm) at 30 ℃ for 24 h. After the preparation of inoculum, it was added at 5% concentration to main fermentation media (to total of 50 mL in 250-mL wide-neck Erlenmeyer flasks): standard HS, apple juice without supplementation and modified AJM. Air surface/media volume ratio was ~ 55 cm^2/50 mL, which corresponds to optimal ratio for static BC synthesis in 250-mL flasks (Ruka et al. 2012). Fermentations were carried out under static conditions in thermostats at 30 ℃ for 10 days.

Purification of BC pellicles and dry weight calculation

After the end of cultivation, BC pellicles produced at the air–liquid surface were removed from the fermentation medium, then rinsed in 100 mL of distilled water and placed for 20 min into an orbital spinner to remove excess media residues. The procedure was repeated three times. Afterwards, BC pellicles were heated to 90 ℃ in 100 mL of 0.1 M NaOH solution for 20 min. After heating, BC pellicles were purified by rinsing in distilled water until a pH of 7.0 was reached. Finally, the purified BC was placed in weighting bottles and dried overnight at 110 ℃ to estimate the dry weight gravimetrically. The BC production was then calculated as the dry weight of BC per litre of medium (g/L).

Determination of sugars and organic acid concentrations

Concentrations of the individual sugars—sucrose, D-fructose and D-glucose in the cultivation media—were determined using a commercially available enzymatic assay kit (K-SUFRG 04/18; Megazyme, Wicklow, Ireland). The presence of acetic and gluconic acids in the cultivation media was also determined by specific enzymatic kits (K-ACET 04/18 and K-GATE 04/20; Megazyme, Wicklow, Ireland), following the manufacturer's instructions.

Determination of BC biotechnological parameters

Samples of 0.5 mL were collected at the beginning and at the end of cultivation cycles. Sugar consumption (ΔS) by the bacteria during cultivation was calculated as the difference between the initial (S_0) and final (S_1) sugar concentration in the medium. Using data of the changes in the amount of the products, e.g. BC dry weight and organic acids (P_0—product amount at the beginning; P_1—amount at the end of cultivation) and the ΔS at the respective time points, the yield of BC production ($Y_{BC/\Delta S}$, %) and yield of organic acids ($Y_{P/\Delta S}$, %) were calculated as follows:

$$Y_{BC/\Delta S} = \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1} \times 100\%.$$

The productivity (Q_{BC}, g/L/day) of BC was calculated in a similar way, where t corresponds to cultivation time (10 days):

$$Q_{BC} = \frac{P_1 - P_0}{t}$$

Mechanical properties of BC

Tensile tests were performed on BC pellicles using a universal testing machine Tinius Olsen model 25ST (Horsham, PA, USA) equipped with a load cell of 5 kN at 1 mm/min crosshead speed. BC pellicles were cut into a rectangular strip of 10 mm wide and about 40 mm long. The gage length between grips was 20 mm. Five parallel measurements were performed for each film sample at 20 ℃.

Wide angle X-ray diffraction analysis

The structural investigations of the freeze-dried BC specimens were performed by the wide-angle X-ray diffraction analysis (WAXD) (Ruan et al. 2016). The WAXD measurements were carried out on a Panalytical X'Pert PRO (Malvern Panalytical, Malvern, UK) diffractometer at 20 ℃. The monochromatic irradiation of CuKα with a wavelength of λ = 0.154 nm in the range of diffraction angles 2θ from 2 to 25 deg was used. The voltage was 40 kV, and the scanning rate was 0.125 deg/s. Crystallinity index (CI) evaluation was carried out using OriginPro software (OriginLab, Northampton, USA). It was calculated as CI from the diffraction peaks received using Segal method. This method is based on the empirical equation of Segal et al. (Leung et al. 2013; Segal et al. 1959):

$$CI(\%) = \left(1 - \frac{I_{am}}{I_{002}}\right) \times 100$$

where I_{002} denotes the maximum intensity of the lattice's diffraction band, which is in the interval 2θ around 22°, while I_{am} denotes the minimum intensity for diffraction band 2θ around 18°, corresponding to an amorphous phase.

Scanning electron microscopy

The BC structure was examined with scanning electron microscopy (SEM) Tescan, Mira//LMU Schottky (Tescan Orsay Holding, Kohoutovice, Czech Republic) at a voltage of 5 kV. The freeze-dried sample was covered with a 5-nm gold–palladium (Emitech, Montigny-le-Bretonneux, France, K550X) using vacuum sputter to reduce charge interruptions. The micrographs were taken up to× 10,000 magnification (Khan et al. 2020).

Data statistical analysis

Experimental data was analysed using SPSS (BM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0; IBM Corp, Armonk, USA) at significance level of $p=0.05$ and presented as the mean ± standard deviation. BC dry weights were analysed with one-way and two-way analysis of variance (ANOVA) test. Changes in sugar and organic acid concentrations were analysed by means of a paired-samples t test ($p=0.05$). In figures, error bars represent data variability with confidence intervals at 95%.

Results

Production of bacterial cellulose

It is well known that total sugar concentration in the medium can significantly affect the production of BC (Embuscado et al. 1994). Therefore, different media dilutions were prepared, and BC production by *N. hansenii* MSCL 1646 was evaluated to determine the optimal apple juice concentration. As shown in Fig. 1, an apple juice concentration of 1:6 (apple juice:distilled water) showed the highest BC synthesis (0.89 ± 0.01 g/L BC dry weight). Sugar concentration analysis in AJM with concentration 1:6 showed that glucose, fructose, sucrose concentrations were 4.50 ± 0.21, 16.92 ± 0.83 and 3.48 ± 0.24 g/L respectively. Dilutions lower than 1:6 resulted in significantly lower BC synthesis. Thus, undiluted AJM and AJM 1:1 showed the lowest BC production (0.45 ± 0.02 and 0.48 ± 0.04 g/L). There was no statistically significant difference between these two groups ($p=1$). Furthermore, media dilutions of 1:7 and above significantly decrease BC synthesis. Therefore, for further experiments an apple juice concentration of 1:6 was chosen.

Due to BC production being highly strain specific, three AAB strains (*N. hansenii* MSCL 1646, *K. rhaeticus* MSCL 1463 and *N. hansenii* DSM 5602) were tested for BC synthesis in media with two different apple juice concentrations—without water addition and AJM (1:6). As shown in Fig. 2 *N. hansenii* MSCL 1646 expressed highest BC production on both growth media 0.47 ± 0.02 g/L and 0.78 ± 0.04 g/L, respectively. Other strains showed significantly lower BC synthesis—*K. rhaeticus* MSCL 1463 resulted in 0.27 ± 0.03 g/L in AJM without added water and 0.67 ± 0.03 g/L in AJM (1:6), and *N. hansenii* DSM 5602 resulted in 0.15 ± 0.02 and 0.26 ± 0.23 g/L, respectively, which indicates that the given strains are less suitable for BC production using apple juice. Based on the results, *N. hansenii* MSCL 1646 was used for further experiments.

As mentioned previously, a lack of N source in the fermentation media may result in decreased BC production (Kurosumi et al. 2009). In this study, yeast extract, casein

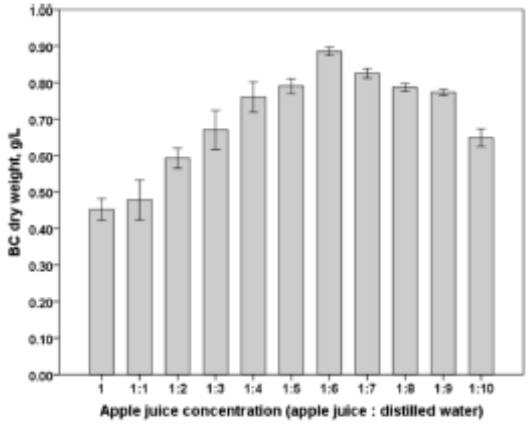


Fig. 1 Influence of apple juice concentration (apple juice:distilled water) on BC synthesis (dry weight) after 10 days of fermentation by *N. hansenii* MSCL 1646

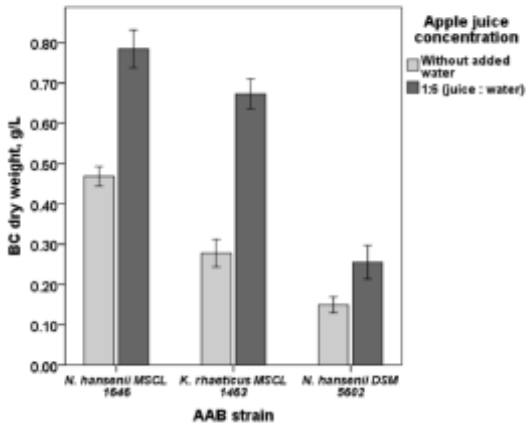


Fig. 2 Influence of AAB strain (*N. hansenii* MSCL 1646, *K. rhaeticus* MSCL 1463 and *N. hansenii* DSM 5602) on BC synthesis (dry weight) in AJM without added water and AJM (1:6) after 10 days of cultivation

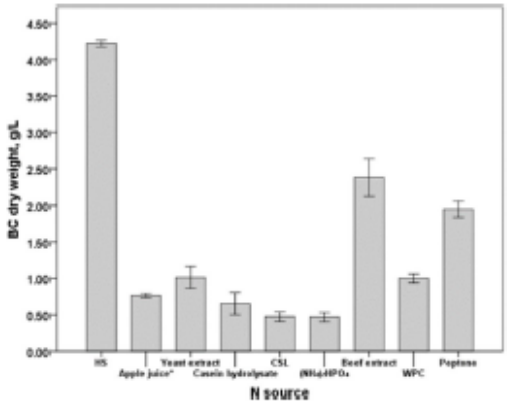


Fig. 3 Influence of different N sources (yeast extract, casein hydrolysate, CSL, diammonium phosphate, beef extract, WPC, peptone) at 5 g/L concentration on BC synthesis (dry weight) in AJM (1:6) compared with the standard HS medium and unsupplemented AJM* after 10 days of cultivation of *N. hansenii* MSCL 1646

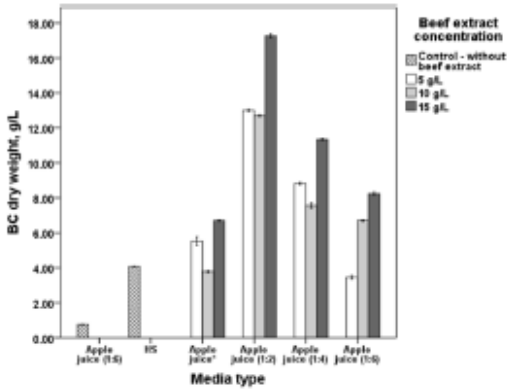


Fig. 4 Influence of apple juice concentration (apple juice:distilled water—with no added water*, 1:2, 1:4 and 1:6) and beef extract (5 g/L, 10 g/L, 15 g/L) in combined apple juice/beef extract medium on BC synthesis (dry weight), compared with AJM (1:6) and HS medium after 10 days of cultivation (*N. hansenii* MSCL 1646)

hydrolysate, CSL, diammonium phosphate, beef extract, WPC and peptone were evaluated as an N source for AJM (1:6) for BC production with *N. hansenii* MSCL 1646. As shown in Fig. 3, different N sources showed different effects on BC production. Beef extract resulted in the highest BC production (2.38 ± 0.21 g/L) among tested N sources. However, BC production was still significantly ($p < 0.001$) lower compared to the standard HS medium (4.22 ± 0.04 g/L). Additionally, addition of peptone resulted in a significant improvement in BC synthesis (1.95 ± 0.09 g/L). However, this was significantly lower than on HS ($p < 0.001$) and apple juice (1:6) with beef extract ($p < 0.001$). Addition of WPC and yeast extract to the fermentation media also resulted in a significant increase in BC synthesis (1.00 ± 0.05 and 1.01 ± 0.12 g/L respectively) compared with unsupplemented AJM (1:6). There was no significant increase in BC synthesis ($p = 1$) in AJM with casein hydrolysate when compared to unsupplemented AJM (1:6). On the other hand, CSL and diammonium phosphate resulted in significant ($p < 0.001$) decrease in BC synthesis when compared to AJM (control group). Based on the results, AJM supplemented with beef extract was used further for media optimisation to achieve higher BC production.

Different concentrations of apple juice (with no water addition, 1:2, 1:4, 1:6) and beef extract (5 g/L, 10 g/L, 15 g/L) were tested to establish optimal concentrations of medium components. As shown in Fig. 4, highest BC synthesis was observed in apple juice (1:2) with 15 g/L beef extract (17.27 ± 0.07 g/L). In this media, BC dry weight was significantly higher ($p < 0.001$) compared to the standard HS media (4.07 ± 0.02 g/L). Higher apple juice dilutions (1:6 and 1:4) did not provide enough C to ensure high BC synthesis during the fermentation process, while concentration of sugars in undiluted AJM exceeded the optimal concentration of C and inhibited BC production. It was shown that increase in beef extract concentration up to 15 g/L significantly increased BC synthesis compared with groups with 5 or 10 g/L beef extract (Fig. 4).

In this study, three media (standard HS, unsupplemented AJM (1:6) and AJM (1:2) with 15 g/L beef extract) were selected for detailed sugar and organic acid analysis. Sugars (glucose, fructose, sucrose) and organic acids (gluconic and acetic acid) concentrations were evaluated (Table 1) at the beginning of the cultivation cycle (S_0) and at the end (S_1) of the experiment (10th day).

As shown in Table 1, glucose was fully consumed by the end of the experiment in all three growth media. Moreover, it was shown that during growth *N. hansenii* MSCL 1646 utilises all three C sources—glucose, fructose and sucrose. However, in both AJM groups fructose and sucrose were not fully depleted. In case of unsupplemented AJM, a lack of N may lead to inhibition of bacterial growth and BC production leaving fructose and sucrose unmetabolized. In AJM (1:2) with 15 g/L beef extract sugar was not consumed completely, probably due to the chosen time limitations of the given experiment.

Moreover, it was also noted that despite regulation of pH before sterilisation, it caused partial hydrolysis of sucrose in undiluted AJM resulting in an average decrease in the concentration of sucrose from 65.73 ± 3.73 to 28.37 ± 0.38 g/L and an increase in glucose and fructose concentrations from 20.10 ± 2.14 to 32.57 ± 4.46, and from 72.88 ± 2.28 to 101.89 ± 8.23 g/L respectively.

Table 1 Changes of sugar (glucose, fructose, sucrose), pH and organic acids (acetic acid, gluconic acid) concentrations

Medium	C source	S_0 (g/L)	S_1 (g/L)	ΔS (g/L)	Final pH	Organic acids	S_0 (mg/L)	S_1 (mg/L)	ΔS (mg/L)
Standard HS	Glucose	20.98 ± 0.22	0.04 ± 0.01	20.93 ± 0.22	5.02 ± 0.25	Acetic acid	19.42 ± 4.45	36.12 ± 5.27	16.70 ± 5.10
						Gluconic acid	31.81 ± 0.77	53.70 ± 0.21	21.81 ± 0.55
Apple juice (1:6) without supplementation	Glucose	4.69 ± 0.22	0.06 ± 0.04	4.63 ± 0.24	4.92 ± 0.14	Acetic acid	7.33 ± 4.02	16.79 ± 4.07	9.46 ± 4.04
	Fructose	17.30 ± 1.19	5.35 ± 0.19	11.95 ± 1.00		Gluconic acid	42.87 ± 5.93	62.48 ± 0.49	19.61 ± 5.45
	Sucrose	3.65 ± 0.29	0.45 ± 0.10	3.20 ± 0.34					
Apple juice (1:2) with 15 g/L beef extract	Glucose	9.29 ± 1.89	0.10 ± 0.04	9.19 ± 1.86	5.61 ± 0.18	Acetic acid	37.92 ± 9.50	46.34 ± 3.63	8.42 ± 6.24
	Fructose	35.87 ± 1.11	7.19 ± 0.04	28.68 ± 1.13		Gluconic acid	44.90 ± 1.82	39.77 ± 1.49	5.22 ± 1.33
	Sucrose	13.42 ± 0.38	4.08 ± 0.04	9.35 ± 0.36					

This can be attributed to the instability of sucrose and other compound sugars in response to heat treatment. Therefore, the overall sugar ratio changed from 2:7.3:6.5 (glucose:fructose:sucrose) before sterilisation to 3.3:10:2 after the procedure.

Synthesis of organic acids was observed during the fermentation process. As shown in Table 1, the pH for all media decreased from initial 7.0 ± 0.1, due to production of organic acids. The highest acid production was observed in the standard HS medium, whereas the lowest was in optimised AJM (1:2) with 15 g/L beef extract. Overall production of acetic and gluconic acid by *N. hansenii* MSCL 1646 was relatively low, and in the case of AJM (1:2) with 15 g/L beef extract—statistically insignificant ($p > 0.05$).

In addition, biotechnological parameters were determined for standard HS, unsupplemented AJM (1:6) and AJM (1:2) with 15 g/L beef extract (Table 2). AJM (1:2) with 15 g/L beef extract provided relatively high $Y_{BC/\Delta S}$ (%) (36.52%), which is significantly higher than in other groups—HS and AJM (1:6) with no supplementation—19.92 ± 1.02% and 3.93 ± 1.34% respectively. Moreover, organic acid yield was significantly lower in AJM (1:2) with 15 g/L beef extract (0.05 ± 0.01%) compared with the standard HS (0.18 ± 0.06%) and AJM (1:6) (0.14 ± 0.02%). The productivity of AJM (1:2) with beef extract was also significantly higher 1.73 g/L/day compared with HS (0.41 ± 0.01 g/L/day) and AJM (1:6) (0.09 ± 0.01 g/L/day).

Changes in BC physical and mechanical properties

Analyses of BC mechanical changes were performed in order to determine how cultivation on different alternative substrates affects BC mechanical properties. The obtained freeze-dried BC samples' SEM images at different magnifications are shown on Fig. 5. The structure of the BC samples differs strongly from the cultivation media used.

Use of different media did not result in significant changes in fibre diameters. For standard HS, unsupplemented AJM (1:6) and AJM (1:2) with 15 g/L beef extract, the individual fibre diameters that can be seen in SEM micrographs are 3.9 ± 1.5 μm, 2.9 ± 1.2 μm and 3.0 ± 1.3 μm respectively. Individual fibres differ little; rather, the overall morphological structure was affected by the cultivation medium used and fibre densification when BC pellicles were produced. It is worth noting that the addition of beef extract has resulted in the formation of very porous BC pellicles.

The WAXD analysis results of freeze-dried BC samples are shown in Fig. 6. The quality of the diffraction pattern, as shown by peak intensity and shape, was found to be highly dependent on the media used in the BC cultivation process. The crystallinity of the BC was used to evaluate the crystal and amorphous structure of the BC.

The physical and mechanical characteristics of different BC samples are summarised in Table 3. It is evident that the BC sample obtained via the HS medium shows the highest crystallinity of about 94.3%. Alternative

Table 2 Biotechnological parameters of BC synthesis on unsupplemented and modified AJM

Medium	BC dry weight (g/L)	BC yield, $Y_{BC/\Delta S}$ (%)	Organic acid yield, $Y_{P/\Delta S}$ (%)	Productivity, Q_{BC} (g/L/d)
Standard HS	4.07 ± 0.02	19.92 ± 1.02	0.18 ± 0.06	0.41 ± 0.01
Apple juice (1:6) without supplementation	0.89 ± 0.01	3.93 ± 1.34	0.14 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Apple juice (1:2) with 15 g/L beef extract	17.27 ± 0.07	36.52 ± 0.97	0.05 ± 0.01	1.73 ± 0.01

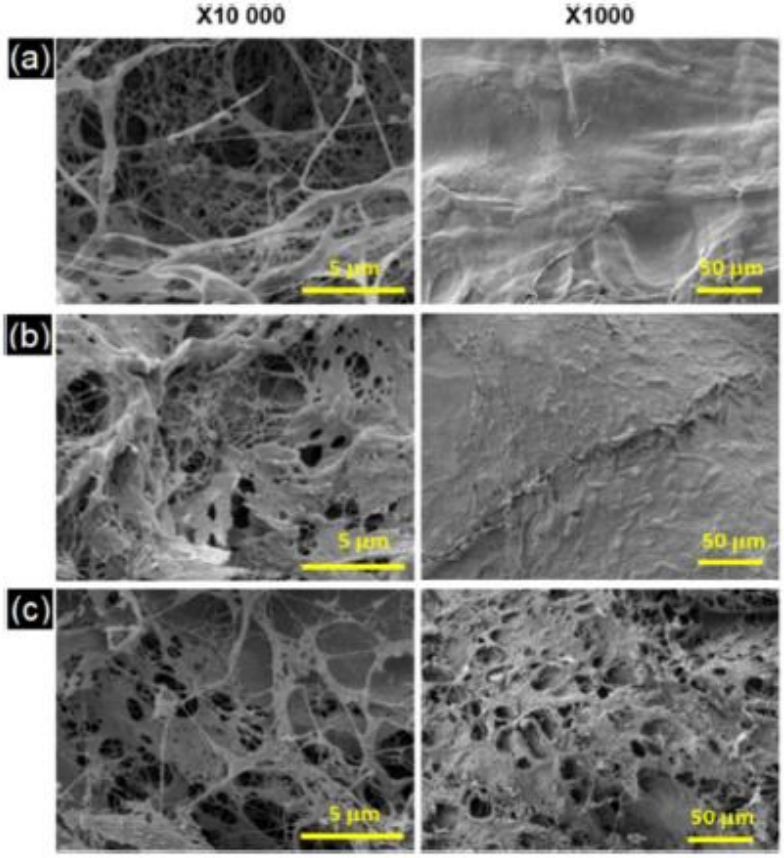


Fig. 5 SEM images of BC samples after 10 days of cultivation (*N. hansenii* MSCL 1646) under × 10,000 and × 1000 magnification: **a**) standard HS medium; **b**) AJM (1:6) without supplementation; **c**) AJM with 15 g/L beef extract

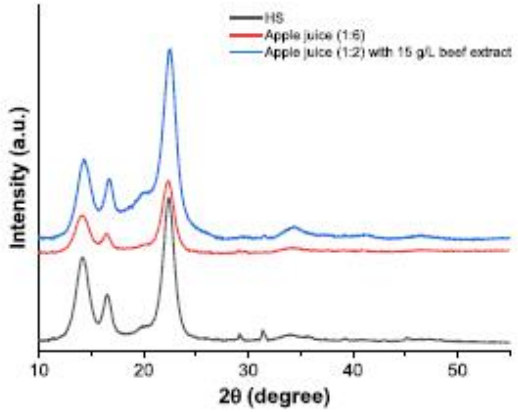


Fig. 6 WAXD of BC samples (standard HS, AJM (1:6) without supplementation and AJM (1:2) with 15 g/L beef extract) after 10 days of cultivation (*N. hansenii* MSCL 1646)

media—unsupplemented AJM (1:6) and AJM (1:2) with 15 g/L beef extract—produced BC with the 92.3% and 85.1% CI values respectively. The received CI values are essential, because they affect the tensile properties of the materials.

The sample HS showed the highest elastic modulus compared to other cultivation media. Use of unsupplemented AJM (1:6) and AJM (1:2) with 15 g/L beef extract resulted in an almost twofold decrease in the elastic modulus values. This observation relates to the lower CI for BC obtained using AJM (1:6) and AJM (1:2) cultivation environments. In contrast, the tensile strength depends on the homogeneous BC fibrillar network structure developed during the synthesis. The highest BC strength value was obtained for the unsupplemented AJM (1:6) sample, while the standard HS sample showed a twofold decrease in strength and the BC sample produced in AJM (1:2) with 15 g/L beef extract—a fourfold drop in strength. This result can also be associated with higher porosity of the BC sample obtained in AJM

Table 3 BC physical and mechanical properties upon cultivation on different media

Sample	CI, %	Water holding capacity, %	Swelling, %	Density, g/cm^3	Specific elastic modulus, MPa*cm^3/g	Specific strength, MPa*cm^3/g	Strain at break, %
Standard HS	94.3	99.51	2938	0.96±0.05	251.7±33.4	47.0±8.8	31.8±2.6
Apple juice (1:6)	92.3	99.40	2162	1.33±0.92	158.6±26.4	88.4±28.7	38.5±11.4
Apple juice (1:2) with 15 g/L beef extract	85.1	98.00	1328	1.06±0.11	124.9±19.1	21.7±5.1	67.2±21.5

(1:2) with beef extract as observed in SEM (Fig. 5). Strain at break was the lowest for the BC sample in standard medium and approximately doubled for the BC sample produced on AJM (1:2) with 15 g/L beef extract, which is associated with a significant increase in the amorphous phase content in cellulose obtained on the alternative media. Moreover, because of the larger pore formation, the sample obtained in AJM (1:2) with 15 g/L beef extract had the lowest swelling capability. Other samples have smaller pores and, as a result, can hold more water in the film structure.

Discussion

As was ascertained during the experiments, that the optimal apple juice dilution was 1:6 which resulted in 0.89±0.01 g/L of dry BC weight production. This apple juice concentration corresponds to 4.50±0.21 g/L of glucose, 16.92±0.83 g/L of fructose, 3.48±0.24 g/L of sucrose in the medium. It has been reported that high sugar concentrations inhibit BC synthesis as a result of which the excess glucose is usually converted to organic acids, shifting the metabolism from BC synthesis, and further decreasing the pH below optimal levels, thus inhibiting the bacterial growth (Vandamme et al. 1998). Moreover, 1:7 and higher dilutions of AJM also decrease BC production due to the insufficiency of available sugars and various macro and micronutrients in the fermentation media.

Experiments showed that *N. hansenii* MSCL 1646 expressed greater ability to synthesise BC in unmodified AJM compared with *K. rhaeticus* MSCL 1463 and *N. hansenii* DSM 5602 strains. Therefore, *N. hansenii* MSCL 1646 strain was selected for further experiments. This is associated with AAB strain high specificity to certain C substrates (Kolesovs and Semjonovs 2020; Zikmanis et al. 2021b).

As mentioned above, only a few studies have been dedicated to BC production using apple juice. BC synthesis using apple juice or apple-originated substrates is summarised in Table 4.

As shown in Table 4, low BC yields on unmodified AJM are not associated with apple juice itself, but rather with an insufficient amount of N in the juice. *N. hansenii* MSCL 1646 was able to show the highest BC productivity (0.09±0.01 g/L/day) on unmodified AJM compared with strains from other studies (Kurosumi et al. 2009; Bandyopadhyay et al. 2018), which indicates that *N. hansenii* MSCL 1646 is better suited for BC synthesis in AJM. However, it has been stated in all the studies referred to that apple juice does not provide the required nutrients due to low N concentration in the medium. To ensure high BC synthesis, an appropriate N source is required in the medium to ensure AAB growth and effective BC production.

As a solution, varied N supplements were tested in the experiments, which resulted in a significant increase in BC production (Fig. 3). In the current study, AJM modification with a wide range of N sources including both organic and inorganic ones was evaluated for BC synthesis (Fig. 3) Results showed that addition of 5 g/L beef extract ensured highest BC production (2.38±0.21 g/L) compared to other chosen N sources at similar concentrations.

AJM supplementation with 15 g/L beef extract resulted in a significant increase in BC productivity (1.73±0.01 g/L/day) when compared to other media compositions (Table 4). This shows that beef extract was an efficient organic supplement for AJM when compared to supplements evaluated in other studies—organic (yeast extract, peptone, acetic acid, citric acid, sugar cane) and inorganic (dipotassium phosphate, ammonium sulphate). Therefore, it is evident that apple juice in combination with effective N source can serve as an effective BC production medium.

Literature analysis shows that beef extract is considered to be an effective supplement for enhancing BC production (Hungund and Gupta 2010). Research shows that organic supplements such as beef extract are more suitable than inorganic compounds (Embuscado et al. 1994; Sperotto et al. 2021) for AAB growth and BC production. Beef extract provides not only easily assimilated N, but also an optimal amount of certain macro and micro elements, thus enhancing the BC synthesis. Micronutrients from beef extract are essential for enzymes and cofactors of AAB that are required for BC synthesis (Sperotto et al. 2021). It is important to note that beef extract can potentially be replaced with more sustainable and cheaper N sources originated from agriculture and industry by-products, for example, whey derivates (Kolesovs and Semjonovs 2020) which is beyond the framework of this study.

Table 4 BC synthesis on apple-originated substrates

Medium	Strain	BC dry weight (g/L)	Estimated productivity (g/L/d)	Source
Apple juice (1:6) without supplementation	*N. hansenii* MSCL 1646	0.89 ± 0.01	0.09 ± 0.01 (10 d)	Current study
Apple juice (1:2) with 15 g/L beef extract	*N. hansenii* MSCL 1646	17.27 ± 0.07	1.73 ± 0.01 (10 d)	Current study
Unsupplemented apple juice	*Acetobacter xylinum* NBRC 13,693	0.20 ± 0.10	0.01 (14 d)	(Kurosumi et al. 2009)
Modified AJM (peptone 20 g/L, yeast extract 5 g/L and citric acid 1.2 g/L were added to the medium)	*Acetobacter xylinum* NBRC 13,693	3.90 ± 0.20	0.28 (14 d)	(Kurosumi et al. 2009)
HS media with 20 g/L apple juice as C source	*K. rhaeticus* MSCL 1463	4.77 ± 0.24	0.95 (5 d)	(Semjonovs et al. 2017)
Raw apple juice	*Gluconobacter xylinum* CCM 3611 T	0.20	0.01 (15 d)	(Bandyopadhyay et al. 2018)
Modified AJM (ammonium sulphate 8 g/L, dipotassium phosphate 2 g/L, sucrose 20 g/L, acetic acid 5 mL/L)	*Gluconobacter xylinum* CCM 3611 T	0.40	0.03 (15 d)	(Bandyopadhyay et al. 2018)
Apple pomace without supplementation	*Gluconacetobacter medellinensis* ID 13488	0.36 ± 0.01	0.03 (14 d)	(Urbina et al. 2017)
Apple pomace with sugar cane	*Gluconacetobacter medellinensis* ID 13488	2.50 ± 0.30	0.18 (14 d)	(Urbina et al. 2017)
Enzymatically pre-treated apple pomace medium	*Gluconacetobacter xylinus* (strain unspecified)	7.19 ± 0.20	0.72 (10 d)	(Zhang et al. 2020)

Optimised AJM with beef extract showed significantly higher $Y_{BC/\Delta S}$ (36.52 ± 0.97%) compared to other experimental media (Table 2). Thus, in the optimised media, C is more effectively converted to BC when compared with BC production in HS and unsupplemented AJM (1:6). This can also be attributed to significantly lower yield of organic acids in AJM beef extract media which prevents inhibition of bacteria growth and BC production due to accumulation of acidic metabolites in the media. It can be assumed that *N. hansenii* MSCL 1646 metabolism in optimised AJM media with beef extract is shifted more from organic acid production towards BC synthesis due to optimised C and N concentrations and other nutrients.

Apple juice (1:2) obtained with 15 g/L beef extract medium has produced one of the highest BC production (dry weight) results among different BC production media reported in the literature usually reaching 15–20 g/L dry BC weight at the end of cultivation cycle (Andriani et al. 2020; Kolesovs and Semjonovs 2020; Sperotto et al. 2021). Moreover, static cultivation was used during this trials, which is the least effective of BC production types (Blanco Parte et al. 2020). Use of agitated cultivation would potentially improve aeration and nutrient distribution in the media as a result increasing BC productivity. However, it is necessary to note that aeration may also result in formation of BC-negative mutants decreasing or disrupting BC production process, and therefore it is required to be controlled (Wang et al. 2016). To sum up, apple juice (1:2) with 15 g/L beef extract (or potentially other N source) is a promising alternative media for BC production.

Use of alternative growth medium can result in a significant change in the physical and mechanical properties of BC pellicles (Jozala et al. 2015; Urbina et al. 2017). This change can significantly influence the final application of BC where different properties of the material are necessary to create certain products. Although use of alternative media resulted in a decrease in CI, our results show that main crystalline regions of all tested media can be observed in the 14° and 22° positions (Fig. 5), and CI varies from 85.1 to 94.3, which is in accordance with data presented in other studies (Jozala et al. 2015; Mikkelsen et al. 2009). Other physical and mechanical properties were significantly affected (Table 3). For example, use of unsupplemented AJM (1:6) resulted in increased specific strength compared to standard media. This property, in combination with lower swelling than HS samples, may be useful for using such BC samples in an innovative packaging material. On the other hand, addition of beef extract to the AJM resulted in a significant decrease in specific elasticity modulus and specific strength which is not conducive to use in a packaging materials. However, taking into account high BC productivity on the given media, it can be used in the food industry as an emulsifier, or as an immobiliser for enzymes or probiotics (Azeredo et al.

2019). Given its highly porous structure (Fig. 5), it can be used in biomedicine as a scaffold in tissue engineering that allows cell penetration and growth or in a filtration devices (Gorgieva and Trček 2019). Overall, research shows that *N. hansenii* MSCL 1646 is capable of producing high quality BC using both the standard HS medium and AJM.

Little data is available in literature regarding how apple juice affects BC physical and mechanical properties. In one study, it has been reported that the BC obtained on apple pomace and sugar cane mixture exhibited even higher CI, elasticity and maximum tensile strength compared to the standard HS medium (Urbina et al. 2017). However, in another study it was noted that BC physical and mechanical properties were not affected significantly by changes in compositions of the AJM (Zhang et al. 2020), probably due to the differences in experimental design or cultivation conditions and strain-specific properties of BC producing cultures. Further work is required to determine changes more specifically and to propose a specific industrial application of obtained BC pellicles.

Further studies dedicated to BC production using apple juice and other agricultural waste substrates or by products would benefit from inclusion of wider variety of tested BC producing strains in the trials. Although *N. hansenii* MSCL 1646 showed its better ability to utilise C from apple juice, obviously other strains of AAB stayed beyond the scope of this study may show significant BC productivity. Furthermore, use of different cultivation methods, for example fed batch or agitated cultivation for BC production on AJM, can be evaluated. Decrease in cultivation time may also be considered in further experiments, because it was shown that *N. hansenii* MSCL 1646 is able to deplete available C fully or partially in the fermentation media (Table 1). Notwithstanding that beef extract provides highest BC synthesis among different assessed N sources (Fig. 3) in a supplemented AJM, other organic N-sources, for example, such whey derivates as WPC, can be tested at different concentrations in order to ensure more sustainable BC production on AJM. Additionally, further research can be conducted on changes of BC physical and mechanical properties taking into account intended application of the BC or relevant material.

Thus, apple juice can be considered as a promising alternative growth substrate for BC production. It was shown that *N. hansenii* MSCL 1646 is the most suitable BC producer strain on the unsupplemented AJM 0.89 ± 0.01 compared to other evaluated strains *K. rhaeticus* MSCL 1463 and *N. hansenii* DSM 5602, which produced 0.67 ± 0.03 g/L and 0.26 ± 0.03 g/L of BC respectively. Low BC yields on unmodified AJM are not associated with apple juice itself, but rather with an insufficient amount of N in the juice; therefore, different N sources were evaluated in a combination of apple juice and beef extract (5 g/L) that was found to be the most suitable N additive. Further, apple juice and beef extract media optimisation showed that the optimal apple juice and beef extract concentrations were 1:2 and 15 g/L respectively, which resulted in 17.27 ± 0.07 g/L of dry BC, which is significantly higher than in the standard HS medium (4.07 ± 0.02 g/L). Use of apple juice resulted in significant changes in physical and mechanical properties of BC samples, which must be taken into account when considering a specific industrial application of BC. Further research is required to improve BC productivity bearing in mind its prospected application.

Author contribution General writing of the manuscript, literature search, experimental design and fermentations and data analysis, editing—SK. BC fermentations and metabolite measurements—KN. Determination and analysis of BC mechanical properties—SB, SG. Research conceptualisation, critical revision and supervision—PS. All authors contributed to the study conception and design, read and approved the final manuscript.

Funding This study was supported by the Ministry of Agriculture and the Rural Support Service of the Republic of Latvia (Grant No. 19–00-A01612-000004). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Data availability All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Declarations

Ethics approval Not applicable, since the work does not involve any study with human participants or animals.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

Adebayo-Tayo B, Akintunde M, Sanusi J (2017) Effect of different fruit juice media on bacterial cellulose production by *Acinetobacter* sp. BAN1 and *Acetobacter pasteurianus* PW1. J Adv Biol Biotechnol 14:1–9. https://doi.org/10.9734/jabb/2017/34171

Andriani D, Apriyana AY, Karina M (2020) The optimization of bacterial cellulose production and its applications: a review. Cellulose 27:6747–6766. https://doi.org/10.1007/s10570-020-03273-9

Azeredo HMC, Barud H, Farinas CS, Vasconcellos VM, Claro AM (2019) Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. Front Sustain Food Syst 3. https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007

Bandyopadhyay S, Saha N, Saha P (2018) Characterization of bacterial cellulose produced using media containing waste apple juice. Appl Biochem Microbiol 54:649–657. https://doi.org/10.1134/S0003683818060042

Blanco Parte FG, Santoso SP, Chou CC, Verma V, Wang HT, Ismadji S, Cheng KC (2020) Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. Crit Rev Biotechnol 0:1-18. https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713721

Costa AFS, Almeida FCG, Vinhas GM, Sarubbo LA (2017) Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using

corn steep liquor as nutrient sources. Front Microbiol 8:1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02027
da Gama FMP, Dourado F (2018) Bacterial nanocellulose: what future? BioImpacts 8:1–3. https://doi.org/10.15171/bi.2018.01
Embuscado ME, Marks JS, BeMiller JN (1994) Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Top Catal 8:407–418. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80084-2
Gorgieva S, Trček J (2019) Bacterial cellulose: production, modification and perspectives in biomedical applications. Nanomaterials 9:1–20. https://doi.org/10.3390/nano9101352
Gullo M, China S La, Falcone P, Giudici P (2018) Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 6885–6898
Güzel M, Akpınar Ö (2020) Preparation and characterization of bacterial cellulose produced from fruit and vegetable peels by *Komagataeibacter hansenii* GA2016. Int J Biol Macromol 162:1597–1604. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.049
Hestrin S, Schramm M (1954) Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. Biochem J 58:345–352. https://doi.org/10.1042/bj0580345
Huang Y, Zhu C, Yang J, Nie Y, Chen C, Sun D (2014) Recent advances in bacterial cellulose. Cellulose 21:1–30. https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z
Hungund BS, Gupta SG (2010) Improved production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2. J Microb Biochem Technol 2:127–133. https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000037
Jozala AF, Pértile RAN, dos Santos CA, de Carvalho S-E, Seckler MM, Gama FM, Pessoa A (2015) Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. Appl Microbiol Biotechnol 99:1181–1190. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3
Karadeniz F, Ekşi A (2002) Sugar composition of apple juices. Eur Food Res Technol 215:145–148. https://doi.org/10.1007/s00217-002-0505-2
Khan H, Kadam A, Dutt D (2020) Studies on bacterial cellulose produced by a novel strain of *Lactobacillus genus*. Carbohydr Polym 229:115513. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115513
Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A (2005) Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. Angew Chemie - Int Ed 44:3358–3393. https://doi.org/10.1002/anie.200460587
Kolesovs S, Semjonovs P (2020) Production of bacterial cellulose from whey—current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol 104:7723–7730. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10803-9
Kurosumi A, Sasaki C, Yamashita Y, Nakamura Y (2009) Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. Carbohydr Polym 76:333–335. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.009
Leung ACW, Lam E, Chong J, Hrapovic S, Luong JHT (2013) Reinforced plastics and aerogels by nanocrystalline cellulose. J Nanoparticle Res 15. https://doi.org/10.1007/s11051-013-1636-z
Mikkelsen D, Flanagan BM, Dykes GA, Gidley MJ (2009) Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. J Appl Microbiol 107:576–583. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x
Muhamad II, Pa'e N, Zahan KA (2017) Sustainable and economical production of biocellulose from agricultural wastes in reducing global warming and preservation of the forestry. World Sustain Ser 141-154. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45081-0_9
Patocka J, Bhardwaj K, Klimova B, Nepovimova E, Wu Q, Landi M, Kuca K, Valis M, Wu W (2020) *Malus domestica*: a review on nutritional features, chemical composition, traditional and medicinal value. Plants 9:1–19. https://doi.org/10.3390/plants9111408
Piazzotta S, Cottes M, Simeoni P, Manzocco L (2020) Evaluating the environmental and economic impact of fruit and vegetable waste valorisation: the lettuce waste study-case. J Clean Prod 262:121435. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121435
Potivara K, Phisalaphong M (2019) Development and characterization of bacterial cellulose reinforced with natural rubber. Materials (basel) 12:2323. https://doi.org/10.3390/ma12142323
Rajwade JM, Paknikar KM, Kumbhar JV (2015) Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. Appl Microbiol Biotechnol 99:2491–2511. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6426-3
Reddy N, Yang Y (2015) Innovative biofibers from renewable resources. Springer, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45136-6
Revin V, Liyaskina E, Nazarkina M, Bogatyreva A, Shchankin M (2018) Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. Brazilian J Microbiol 49:151–159. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.012
Rivas B, Moldes AB, Domínguez JM, Parajó JC (2004) Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. Int J Food Microbiol 97:93–98. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.006
Ruan C, Zhu Y, Zhou X, Abidi N, Hu Y, Catchmark JM (2016) Effect of cellulose crystallinity on bacterial cellulose assembly. Cellulose 23(6):3417–3427. https://doi.org/10.1007/s10570-016-1065-0
Ruka DR, Simon GP, Dean KM (2012) Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. Carbohydr Polym 89:613–622. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.059
Salari M, Sowti Khiabani M, Rezaei Mokarram R, Ghanbarzadeh B, Samadi Kafil H (2019) Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. Int J Biol Macromol 122:280–288. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.136
Santos SFD, Cardoso RCV, Borges IMP, Almeida ACE, Andrade ES, Ferreira IO, Ramos LC (2020) Post-harvest losses of fruits and vegetables in supply centers in Salvador, Brazil: analysis of determinants, volumes and reduction strategies. Waste Manag 101:161–170. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.10.007
Segal L, Creely JJ, Martin AE, Conrad CM (1959) An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. Text Res J 29:786–794. https://doi.org/10.1177/004051755902901003
Semjonovs P, Ruklisha M, Paegle L, Saka M, Treimane R, Skute M, Rozenberga L, Vikele L, Sabovics M, Cleenwerck I (2017) Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. Appl Microbiol Biotechnol 101:1003–1012. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7761-8
Son HJ, Kim HG, Kim KK, Kim HS, Kim YG, Lee SJ (2003) Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. Bioresour Technol 86:215–219. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00176-1
Sperotto G, Stasiak LG, Godoi JPMG, Gabiatti NC, De Souza SS (2021) A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined and minimal media modulations. Cellulose 28:2649–2673. https://doi.org/10.1007/s10570-021-03754-5
Tahara N, Tabuchi M, Watanabe K, Yano H, Morinaga Y, Yoshinaga F (1997) Degree of polymerization of cellulose from *Acetobacter xylinum* BPR2001 decreased by cellulase produced by the strain. Biosci Biotechnol Biochem 61:1862–1865. https://doi.org/10.1271/bbb.61.1862
Urbina L, Hernández-Arriaga AM, Eceiza A, Gabilondo N, Corcuera MA, Prieto MA, Retegi A (2017) By-products of the cider production: an alternative source of nutrients to produce bacterial

cellulose. Cellulose 24:2071–2082. https://doi.org/10.1007/s10570-017-1263-4

Vandamme EJ, De Baets S, Vanbaelen A, Joris K, De Wulf P (1998) Improved production of bacterial cellulose and its application potential. Polym Degrad Stab 59:93–99. https://doi.org/10.1016/s0141-3910(97)00185-7

Wang ZG, Xiang D, Wang XB, Li CF (2016) Preparation of an inoculum of *Gluconacetobacter xylinus* without mutants in shaken culture. J Appl Microbiol 121:713–720. https://doi.org/10.1111/jam.13193

Yadav P, Yadav H, Shah VG, Shah G, Dhaka G (2015) Biomedical biopolymers, their origin and evolution in biomedical sciences: a systematic review. J Clin Diagnostic Res 9:21–25. https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13907.6565

Zhang W, Wang JJ, Gao Y, Le ZL (2020) Bacterial cellulose synthesized with apple pomace enhanced by ionic liquid pretreatment. Prep Biochem Biotechnol 50:330–340. https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1692222

Zikmanis P, Juhņeviča-Radenkova K, Radenkovs V, Segliņa D, Krasnova I, Kolesovs S, Orlovskis Z, Šilaks A, Semjonovs P (2021a) Microbial polymers in edible films and coatings of garden berry and grape: current and prospective use. Food Bioprocess Technol 14:1432–1445. https://doi.org/10.1007/s11947-021-02666-3

Zikmanis P, Kolesovs S, Ruklisha M, Semjonovs P (2021b) Production of bacterial cellulose from glycerol: the current state and perspectives. Bioresour Bioprocess 8:1–14. https://doi.org/10.1186/s40643-021-00468-1

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

2. P. Zikmanis, S. Kolesovs, M. Ruklisha, P. Semjonovs (2021), Production of bacterial cellulose from glycerol: the current state and perspectives. Bioresources and Bioprocessing, 8:116. https://doi.org/10.1186/s40643-021-00468-1; (*SCOPUS*).

Zikmanis *et al.*
Bioresources and Bioprocessing (2021) 8:116
https://doi.org/10.1186/s40643-021-00468-1

Bioresources and Bioprocessing

REVIEW Open Access

Production of bacterial cellulose from glycerol: the current state and perspectives

Peteris Zikmanis, Sergejs Kolesovs, Maija Ruklisha and Pavels Semjonovs*

Abstract

Current research in industrial microbiology and biotechnology focuses on the production of biodegradable microbial polymers as an environmentally friendly alternative to the still dominant fossil hydrocarbon-based plastics. Bacterial cellulose (BC) is important among microbial polymers due to its valuable properties and broad applications in variety of fields from medical to industrial technologies. However, the increase in BC production and its wider deployment is still limited by high costs of traditionally used raw materials. It is therefore necessary to focus on less expensive inputs, such as agricultural and industrial by-products or waste including the more extended use of glycerol. It is the environmentally harmful by-product of biofuel production and reducing it will also reduce the risk of environmental pollution. The experimental data obtained so far confirm that glycerol can be used as the renewable carbon source to produce BC through more efficient and environmentally friendly bioprocesses. This review summarizes current knowledge on the use of glycerol for the production of commercially prospective BC, including information on producer cultures, fermentation modes and methods used, nutrient medium composition, cultivation conditions, and bioprocess productivity. Data on the use of some related sugar alcohols, such as mannitol, arabitol, xylitol, for the microbial synthesis of cellulose are also considered, as well as the main methods and applications of glycerol pre-treatment briefly described.

Keywords: Bacterial cellulose, Acetic acid bacteria, *Komagataeibacter* spp., Glycerol, Sugar alcohols

Introduction

With the current development of microbial biotechnology, more attention is focused on the expanded use of renewable resources, which is in line with the general concept of a circular economy and means that the waste products of one industry should serve as the raw material for another (Ravindran and Jaiswal 2016; Schilling and Weiss 2021). Such an approach is of particular importance in regard to inexpensive carbon sources for commercially relevant strains of microbes-producers, since the costs of nutrient media largely determine the overall economic efficiency of bioprocesses (Gahlawat and Srivastava 2017; Sperotto et al.2021). For this purpose, numerous by-products, residues and waste of agricultural, food or biofuel industries are proposed and actually applied (Arancon et al. 2013; Sadh et al. 2018; Tsang et al. 2019; Sperotto et al. 2021), which, in addition to the real economic benefits, also create a very positive impact on the environment. Among them, glycerol, the simplest 3-C polyol, as a sufficiently widely available and relatively cheap compound, is already of significant value and is quite promising in this regard. This is largely due to the fact that the production of biodiesel as well as other products (soap, fatty acid, fatty ester industries) whose technologies involve the triglyceride trans-esterification reaction produces significant amounts of glycerol as a by-product (Kumar et al. 2019). It is also important that many microbial cultures are able to utilize it efficiently for the growth and biosynthesis of high added value compounds (Kenar 2007; da Silva et al. 2009; Wendisch et al. 2011; Trindade et al. 2015). These reasons, as well as the ability of a number of producing strains for

*Correspondence: pavels.semjonovs@lu.lv
Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology, University of Latvia, 4, Ojara Vaciesa Str., Riga LV-1004, Latvia

Springer Open

© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

the use of crude glycerol help to reduce the cost of both the nutrient composition and the end product of microbial synthesis. These products, the biosynthesis of which is based on glycerol as the sole carbon source, represent a fairly wide and versatile set of commercially important compounds such as 1,3-propanediol, ethanol, D-lactic, citric, succinic, propionic acids, glycolipid-type biosurfactants, carotenoids, amino acids and others (Wendisch et al. 2011; Posada et al. 2012; Yang et al. 2012). Thus, among the glycerol-based products of biosynthesis, there are mainly monomers with a relatively simple structure, but the possibilities of obtaining more complex compounds with a high technological potential are reported much less frequently. In particular, it should be noted that the use of renewable sources is especially important for the biosynthesis of microbial polymers, including extracellular polysaccharides, since reducing overall costs is the main precondition for expanding their production and commercial use (Gahlawat and Srivastava 2017; Sperotto et al. 2021). Microbial polymers are an established environmentally friendly alternative to still dominant fossil-based plastics, possess an extensive biotechnological potential and are already widely used in a variety of fields ranging from medicine to technology (Rehm 2010; Narancic and O'Connor 2019; Shanmugam and Abirami 2019; Zikmanis et al. 2020a, b). However, the scope of research, as well as the number of microbial polymers synthesized on glycerol, is more limited than for monomeric compounds, and in addition they are rather unevenly distributed. Thus, the most comprehensive in this regard are studies on the microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA), and in particular polyhydroxybutyrate (PHB) which are the commercially important biodegradable polymers with a wide range of applications. The key issues of conducting and technological implementation for the relevant bioprocesses have been summarized and assessed in a number of reviews, including those in recent years (Licciardello 2017; Adeleye et al. 2020; El-Malek et al. 2020; Sen and Baidurah 2021; Sirohi et al. 2021). Unlike the formation of microbial exopolysaccharides, using glycerol as the sole carbon source still remains less documented. So there are only sporadic reports on the biosynthesis of gellan (Raghunandan et al. 2018) xanthan (Trindade et al. 2015) and some partially identified heteropolysaccharides (Freitas et al. 2011). Bacterial cellulose (BC) is the only commercially important exopolysaccharide (Gorgieva and Trček 2019), whose microbial synthesis on glycerol has been performed for a relatively long time (Masaoka et al. 1993), and therefore a certain amount of data have been accumulated. However, in specialized reviews on bacterial cellulose, such the employment of glycerol is only noted (Cacicedo et al. 2016; Jang et al. 2017; Reiniati et al. 2017; Ul-Islam et al. 2020) or not mentioned at all (Gullo et al. 2018; Salihu et al. 2019; Zhong 2020), and the available data remain not summarized as well as not evaluated in comparison. However, there is a certain desire for this, albeit to a limited extent (Adnan 2015; Hussain et al. 2019; Mangayil et al. 2021). This review summarizes the current knowledge on the use of glycerol to obtain bacterial cellulose, including information about producer cultures, composition of culture media, cultivation conditions and productivity of bioprocesses. The synthesis of BC from some other sugar alcohols (mannitol, arabitol, xylitol) is briefly overviewed. The basic data on the relevant pathways of biosynthesis and their regulation, properties and applications of BC also are considered.

Basic features and applications of bacterial cellulose

BC makes up a significant part among other bacterial exopolysaccharides and represents a polymer of D-glucose, that is, a homopolysaccharide formed mainly by β-(1,4) glycosidic bonds from precursors (UDP-D-glucose) (Gorgieva and Trček 2019) through the membrane-incorporated glycosyltransferase (cellulose synthase BcsA; EC 2.4.1.29) (Azuma et al. 2009; Lu et al. 2020). Due to their unique three-dimensional network structure, BC has a combination of exclusive properties such as high crystallinity and degree of polymerization, large surface area, high elasticity, tensile strength and water retention (Wang et al. 2018; Raghavendran et al. 2020; Cazon and Vazquez 2021). BC represents a high-quality and biocompatible material, since it does not contain lignin, hemicellulose, pectin and other biogenic substances, is not cytotoxic and genotoxic. This is particularly important for BC biomedical applications (Ul-Islam et al. 2015; de Oliveira Barud et al. 2016; Moniri et al. 2017; Andriani et al. 2020) in high value-added products (functionalized wound dressings, tissue, heart valves and blood vessels replacement materials, vascular grafts, dental implants, pharmaceutical transfer agents, biosensor elements, etc.). It also appeared to be very promising for use in cosmetics and personal care products (Pacheco et al. 2018; Morais et al. 2019; Bianchet et al. 2020). BC has a multifaceted technological potential (Andriani et al. 2020) and is already used in various industries and production areas, such as textile and paper (Chawla et al. 2009; Pathak and Prasad 2014), mining and refinery (Chawla et al. 2009; Jozala et al. 2016), electronics, energy and communication (Chawla et al. 2009; Baptista et al. 2013; Cacicedo et al. 2016; Li et al. 2019) and waste treatment (Brandes et al. 2018), and especially in food production. BC is used (Shi et al. 2014; Azeredo et al. 2019; Ul-Islam et al. 2020) as an additional thickening, suspending or stabilizing agent to affect the food properties

in the desired way or used directly for food (traditional dessert, vegetarian meat, food/beverage additives, etc.) as an ingredient in fiber-enriched low-calorie and low-cholesterol diets. It is also very important that the effectiveness of such a variety of applications can be enhanced by targeted modification of the bacterial cellulose properties. This, in turn, can be achieved through a number of different approaches and techniques. Thus, the high hydroxyl content facilitates the formation of multiple BC derivatives using appropriate chemical (esterification, etherification, amination, oxidation, crosslinking, etc.) reactions (Cook 2013; Reiniati et al. 2017; Gorgieva and Trček 2019) or physical (ultrasonic, rotary magnetic field, UV or γ-irradiation) treatments (Huang et al. 2014; Campano et al. 2016; Blanco Parte et al. 2020). Extensive possibilities also arise when the features of BC are modified and improved by using composite materials of two or more ingredients, which leads to their synergistic interaction and enhancement of the resulting properties (Rosa and Lenz 2013). The need for composites is determined by the fact that certain properties of BC are limited for certain application and must be fine-tuned to match the necessary requirements, particularly for biomedical use (Fu et al. 2013; Feldman 2015). Composites consisting of BC and other compounds including microbial EPS can be obtained by different processing techniques over a wide range of homogenization conditions up to high pressures and elevated temperatures. However, milder conditions are preferable to avoid any possible destruction (Siro and Plackett 2010; Rosa and Lenz 2013). A relative simple and quite efficient method is an augmentation of BC by immersion in solutions of various, preferably water-soluble, compounds including microbial EPS. The solutions after mixing with the suspension of cellulosic particles and evaporation or freeze-drying yield composites with a wide range of modified properties (Yasuda et al. 2005; Millon and Wan 2006; Kim et al. 2011). In this case, molecules of soluble compound not only cover the BC fibrils surface, but also penetrate into the fiber network and bind to BC with hydrogen bonds (Fu et al. 2013). As a result, ex situ post-modifications of the BC to obtain corresponding composites (Klemm et al. 2006) are carried out. Other very promising approach involves the alteration of BC morphology during its biogenesis. Through this approach bacterial cellulose is modified in situ, i.e., during its biosynthesis, due to the competitive adsorption of a compatible host polymer from the growth medium. Therefore, subsequent to BC polymerization, the compounds added to the medium associate and co-crystallize with BC, creating the intimately blended composite materials which can offer a wide range of morphological, compositional and functional properties for specific applications (Brown and Laborie 2007; Rosa and Lenz 2013). Importantly the addition of water-soluble polysaccharides to the cultivation medium itself can appear as the BC synthesis stimulating factor (Chao et al. 2001; Ishida et al. 2003). Alike for other microbial polysaccharides, the structure and properties of BC depend on the cultivation conditions and particular characteristics of the producer culture. Although the ability to synthesize BC is relatively widespread (the species of *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina* and others), the most important and industrially employed producer cultures are AAB from the genus *Komagataeibacter* (formerly known as *Gluconacetobacter spp.* and *Acetobacter spp.*), mainly the *K. xylinus* and *K. rheticus* strains (Ummartyotin and Sain 2016; Reiniati et al. 2017; Semjonovs et al. 2017a; Gorgieva and Trček 2019; Raghavendran et al. 2020). In addition, producers from different genera and species form BC with elements (pellicles, fibrils, ribbons) of different shapes and sizes (Ummartyotin and Sain 2016). The BC biosynthesis is a rather complex process, which depends on the full composition of the cultivation medium (carbon, nitrogen, micronutrient sources and concentrations), as well as on the culture (temperature, pH, agitation, aeration, growth phase) and operational (bioreactor type and mode of operation) (Mohite et al. 2017; Ul-Islam et al. 2017; Wang et al. 2018; Barcelos et al. 2019; Raghavendran et al. 2020; Tiwari et al. 2020). In general, the bioprocess is also complicated by the strong evidence that the yield and physico-chemical characteristics of produced BC not only depend on the aforementioned factors, but also the magnitude and direction of their complex effects are highly strain-dependent. This, in turn, creates the need to find and define the most appropriate cultivation conditions for each individual producer strain (Olivas and Barbos-Canovas 2005; Nwodo et al. 2012; Devi and Alamu 2013; Semjonovs et al. 2017b), even if the same microbial species synthesizes the same EPS. However, a number of generalized features and conditions promoting

Sugar alcohols as nutrients for acetic acid bacteria

AAB are characterized by their ability to oxidize not only carbohydrates and alcohols, including glycerol, but also sugar alcohols (polyhydric alcohols or polyols) into organic acids, aldehydes or ketones to gain energy in a process termed "oxidative fermentation", with some of the genera forming BC (Taban and Saichana 2017; La China et al. 2018; Lynch et al. 2019). The most important of these are the 6-carbon (6-C) mannitol and the 5-C stereoisomers arabitol, xylitol and ribitol. In this respect, mannitol has long been used relatively more frequently and successfully (Minor et al. 1954), when the formation of C14-labeled BC from D-mannitol-1-C14 by *A. xylinum sp.* was confirmed. The productivity of BC formation

from mannitol varies over a fairly wide range and depends on the specific characteristics of the producing culture, in many cases exceeding the levels achieved on mostly used carbon sources (glucose or fructose). Thus, when cultivated under static conditions with 1.5% mannitol as the sole carbon source, *A. xylinum* KU-1 achieved relatively high BC concentration and specific productivity of 4.6 g/L and 0.027 g/L/h, respectively. Under the same conditions, these indices were significantly lower (1.2 g/L and 0.007 g/L/h) for 1.5% glucose (Oikawa et al. 1995a). In addition, no gluconic acid accumulates in the mannitol medium, thus maintaining a pH value about 6.0 favorable for BC synthesis, while unwanted acidification (pH 3.4) is observed on the glucose (Oikawa et al. 1995a). Moreover in another study with *A. xylinum sp.* it was shown that the use of mannitol (50 g/L) in a longer-time cultivation under static conditions makes it possible to achieve a relatively high BC yield (about 4.75 g/L), but with lower specific productivity (0.014 g/L/h), which still exceeds the values for glucose as the carbon source, but are commensurate with or slightly below the indices for sucrose medium also depending on the nitrogen sources used (Ramana et al. 2000). In addition, when growing *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 10821 on 2% mannitol the BC yield and productivity were 20–25% above that in the glucose medium but remained rather low (1.13 ± 014 g/L; 0.0021 g/L/h) under selected (20 °C; pH 5.5) static culture conditions (Hutchens et al. 2007). Similar data on the use of mannitol for BC synthesis with a higher productivity as compared to glucose, fructose or sucrose were also obtained with other producer cultures such as *G. xylinus* ATCC10245 (El-Saied et al. 2008), *G. xylinus* K3 (Nguen et al. 2008), wild-type isolates *G. xylinus sp.* S and *G. xylinus sp.* A2 (Jalili Tabaii and Emtiazi 2016), *Gluconacetobacter sp.* isolate PAP1 (Suwanposri et al. 2013), as well as *G. xylinus* ATCC 53524 (Mikkelsen et al. 2009), but in this case only for short (48 h) cultivation and later (96 h) slightly lagging behind the productivity of sucrose. A somewhat higher BC yield and specific productivity (3.9 g/L; 0.163 g/L/h) in the 24-h cultivation in shaking flasks (140 rpm) on mannitol as compared to glucose (3.2 g/L; 0.133 g/L/h) were also confirmed for the producer strain *A. aceti* MTCC2623 (Dayal et al. 2013). However, differing effects of mannitol on BC yield and productivity have also been reported (Son et al. 2001; Jung et al. 2010). Thus, when *Acetobacter sp.* A9 was used as a producer (Son et al. 2001), the yield of BC on 2% mannitol (0.64 g/L) proved to be substantially below that for glucose (2.70 g/L), fructose (2.53 g/L) and sucrose (0.83 g/L), as well as specific productivity (0.013 g/L/h, 0.056 g/L/h, 0.053 g/L/h and 0.017 g/L/h, respectively). Similar characteristics were also observed for *Acetobacter sp.* V6 (Jung et al. 2010) when only 0.45 g/L BC was obtained in the 7-day cultivation on mannitol, significantly lagging behind glucose (1.13 g/L), although well above the yield for sucrose (0.14 g/L). Substantially higher yields of BC from glucose, fructose, and sucrose compared to mannitol were observed using the producer strain *G. xylinus* PTTC 1734 (Jalili Tabaii and Emtiazi 2016), as well as from fructose in the case of *Komagataeibacter sp.*W1 (Wang et al. 2018) or from glucose using *G. sacchari sp.* isolated from Kombucha tea (Trovatti et al. 2011). Some recent studies on the use of mannitol in the production of BC have shown fairly good yield and productivity characteristics using the producers *K. xylinus* SB3.1 (Alemam et al. 2021) and *K. xylinus* K2G30 (UMCC 2756) (Gullo et al. 2019). Their levels, especially in the case of K2G30 (8.77 g/L; 0.041 g/L/h), indicate some potential for the industrial scale-up of BC production using vegetable waste feedstocks rich in mannitol and other sugar alcohols (Gullo et al. 2019). In addition, during cultivation these carbon sources prevent the formation of gluconic acid, which decrease the pH far below the optimum value for BC production (Oikawa et al. 1995a; Gullo et al. 2019). Compared to mannitol, other sugar alcohols, such as arabitol and xylitol were used much less frequently as carbon sources for BC synthesis, and the yields and productivity obtained were rather low or moderate (Son et al. 2001; Singhsa et al. 2018; Gullo et al. 2019).

The fact that generally the yield and productivity of BC on arabitol and xylitol remain below that on mannitol is due to the differences in respective metabolic pathways. Thus, a soluble and highly substrate-specific D-mannitol dehydrogenase (Oikawa et al. 1997) realizes a direct enzymatic conversion of mannitol to fructose, which is subsequently phosphorylated to fructose-6-P to be involved in the further metabolic pathway to BC (Fig. 1). Contrary to D-mannitol, the production of BC from arabitol or xylitol is a more complex pathway, involving additional steps, such as the intermediate formation and phosphorylation of xylulose, followed by conversion to glyceraldehyde-3-P to enter the main stream (Fig. 1) of biosynthesis (Bettiga et al. 2008; Laslo et al. 2012; Glenn et al. 2014), whose result is less advantageous energetically for the cell (Gullo et al. 2019). Although using the producer *A. xylinum* KU-1, a very high BC yield and productivity (12.4 g/L; 0.129 g/L/h) were achieved on arabitol, which is higher than that for mannitol, and even six times more (2.0 g/L; 0.021 g/L/h) than for glucose (Oikawa et al. 1995a, b; Oikawa et al. 1997), also suggesting the possibility of activation for this pathway under certain conditions and, consequently, the full use of 5-C sugar alcohols from vegetable raw materials (Laslo et al. 2012; Gullo et al. 2019).

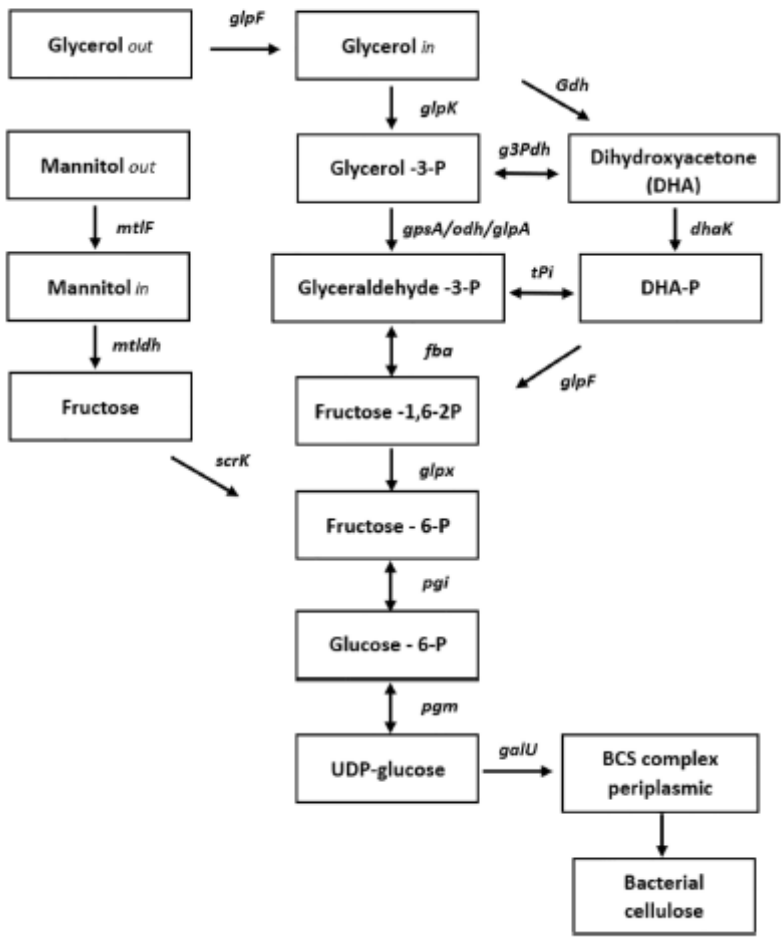


Fig. 1 Metabolic pathways of bacterial cellulose synthesis from glycerol and mannitol by acetic acid bacteria. Gene names and gene products. Adapted from Azuma et al. 2009 and Lu et al. 2020. Gene names and gene products: pgi: glucose-6-phosphate isomerase; glpX: fructose-1,6-bisphosphatase II; fba: fructose-bisphosphate aldolase, class II; pgm: phosphoglucomutase; galU: UTP-glucose-1-phosphate uridylyl transferase; glpK: glycerol kinase; gpsA/odh/glpA: glycerol-3-phosphate dehydrogenase; glpF: glycerol facilitator; dhaK: dihydroacetone kinase; gdh: glycerol dehydrogenase; g3pdh: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; mtlF: mannitol facilitator; mtldh: mannitol dehydrogenase

Glycerol as an appropriate feedstock for the synthesis of bacterial cellulose

However, despite such manifestations of individual polyols, it is glycerol that has a clear advantage for the use as a raw material in the production of bacterial cellulose. Thus, in view of the large volume of glycerol that accompanies the ever-increasing production of diesel fuel from renewable fats and oils (da Silva et al. 2009; Wendisch et al. 2011; Trindade et al. 2015), almost all restrictions on the availability and prices of carbon sources for BC biosynthesis have been removed (Vazquez et al. 2013). In addition, glycerol easily enters the metabolic network of producing cells (da Silva et al. 2009), by facilitated diffusion (Fig. 1), while other also renewable and cost-efficient feedstocks, such as molasses or cheese whey, require for this an enzymatic or chemical hydrolysis of relevant disaccharides (sucrose and lactose, respectively). This need is due to the fact that, for example, the activity of β-galactosidase in AAB is often too small for efficient hydrolysis of lactose to obtain glucose for BC synthesis (Lappa et al. 2019; Zikmanis et al. 2020a, b). In turn, sucrose cannot be transported across the cell membrane

and is hydrolyzed in the periplasm to glucose and fructose by α-glucosidase, which has very varied and often insufficient activities for different producer strains (Velasco-Bedrán and López-Isunza 2007; Mikkelsen et al. 2009; Jalili Tabaii and Emtiazi 2016; Raghavendran et al. 2020). Therefore, these substrates should be subjected to preliminary hydrolytic treatment using appropriate enzymes or less expensive chemical hydrolysis with mineral acids (Marangoni et al. 2002; Bae and Shoda 2004; Torres et al. 2010; Kucera et al. 2018). The efficiency of using glycerol is also determined by the fact that the necessary enzymatic stages of its catabolism are well-represented in the metabolic network of BC producers (Azuma et al. 2009; Lu et al. 2020). For this, alternative ways are possible (Fig. 1), such as inclusion in the biosynthesis chain at the level of glyceraldehyde-3-P after phosphorylation of glycerol with glycerol kinase (glpK) and subsequent transformation by glycerol-3-P dehydrogenase (gpsA/odh/glpA) or through the intermediate formation of dihydroacetone (DHA) by glycerol dehydrogenase (Gdh) phosphorylation to DHA-P with dihydroacetone kinase (dhaK) and isomerization by triose-P-isomerase (tPi), DHA-P can also enter at the fructose-1.6-2P level (Fig. 1) after transformation by fructose-biphosphate aldolase (fba). Further enzymatic transformations, as for all other substrates, pass through the formation of glucose-6-phosphate, which is converted to glucose-1-phosphate and subsequently metabolized to uridine diphosphoglucose (UDP-glucose), a direct precursor of BC. UDP biosynthesis is controlled by phosphoglucomutase (pgm) and UTPG-1-P uridylyl transferase (galU) also referred as UDPG pyrophosphorylase (Thoden and Holden 2007; Lynch et al. 2019). After the formation of UDP-glucose, the polymerization of glucose into BC is mediated by cellulose synthase (CS), a complex of proteins spanning the periplasmic space between the bacterial cytoplasmic and outer membranes. The CS complex promotes UDP-glucose polymerization, polymer translocation across bacterial membranes, and extracellular assembly of glucan chains (Tonouchi 2016; Lynch et al. 2019). The activities and structure of CS in detail have been discussed in several reviews (Adnan 2015; McNamara et al. 2015; Jang et al. 2017; Gullo et al. 2018; Raghavendran et al. 2020). It is important to note that the CS complex is encoded by a four-gene (bcsA, bcsB, bcsC, and bcsD) operon which determines the formation and activity of the corresponding elements, including the catalytic (AcsA) and regulatory (BcsB) subunits. In turn, their activity and, therefore, the entire complex is under allosteric regulatory control by means of the cyclic diguanosine monophosphate (c-di-GMP), the binding of which to the BcsB regulatory subunit activates the AcsA catalytic subunit via its C-terminal transmembrane helix (Lu et al. 2020; Buldum et al. 2018; Römling and Galperin 2015). The degree of activation depends on the level of cellular c-di-GMP, which is determined by several external and internal factors such as oxygen availability, intracellular potassium concentration, diguanylate cyclase and phosphodiesterase activities (Gullo et al. 2018; Raghavendran et al. 2020) Assessing the above problems as a whole, it becomes quite clear why the studies on the use of glycerol for the production of BC, although not very numerous, significantly exceed the current volume of relevant studies using molasses (Adnan 2015; Campano et al. 2016; Zhong 2020) or cheese whey (Kolesovs and Semjonovs 2020; Zikmanis et al. 2020a, b). The main results on the use of glycerol for BC synthesis are summarized in Table 1.

Producer cultures, whose ability to synthesize bacterial cellulose from glycerol have been documented, represent exclusively acetic acid bacteria (Table 1) of the genus *Komagataeibacter* (formerly *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*) with only one exception for conditionally pathogenic *Enterobacter amnigenus* (Hungund and Gupta 2010b). Although these studies were mainly performed with organisms of the same species (*K. xylinus* or *K. rhaeticus*), in all cases different strains of producers were used, both from representative collections (ATCC, DSMZ, NRRL, etc.) of microorganisms and from relatively less characterized isolates of different origins. This characterizes both the widespread ability of AAB to biosynthesize BC from glycerol and makes it difficult to compare the data to select the most promising producer based on its productivity. It can be seen (Table 1) that relevant indicators such as the yield and specific productivity vary over a very wide range, from the relatively insignificant (Carreira et al. 2011; Lins et al. 2019) to quite high levels, confirming the biotechnological potential of such producers (Vazquez et al. 2013; Volova et al. 2018; Soemphol et al. 2018; Vigentini et al. 2019). These data are in line with the oft-confirmed finding that microbial synthesis of extracellular polysaccharides is highly strain-dependent (Olivas and Barbos-Canovas 2005; Nwodo et al. 2012; Devi and Alamu 2013; Semjonovs et al. 2017b), including the formation of BC from glycerol, and thus suggest that further in-depth comparative studies of relevant genotypic and phenotypic traits of potential producers are urgently needed. This is especially evident in the fact that bacterial sub-clones with persistent phenotypic properties and markedly different productivity of BC synthesis can be isolated even from a supposedly homogeneous producer strain, such as *K. rhaeticus* LMG 22126 (Vigentini et al. 2019). Besides, the composition of the cultivation medium and the chosen operational conditions also are very important to promote the BC biosynthesis. Producer cultures were predominantly cultivated in a standard (Mikkelsen et al. 2009; Tsouko et al. 2015; Thorat and

Table 1 Production of bacterial cellulose by acetic acid bacteria from pure or crude glycerol as the sole carbon source

Bacterial strain	Growth medium	Cultivation mode	Medium composition	Production metrics[a]	References
Komagataeibacter sucrofermentans DSM15973	HS	Static	20 g/L pGLYC or 20 g/L cGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep, 1.1 g/L citric acid	pGLYC 1.9 g/L (0.008 g/L/h) cGLYC 6.4 g/L (0.027 g/L/h)	Lee et.al. (2021)
K. hansenii ATCC 53582	HS	Static	2% pGLYC, 0.5% YE, 0.5% Pep	4.93 g/L (0.068 g/L/h)	Li et al. (2021)
K. rhaeticus ENS9a	MA/9	Static	20 g/L pGLYC 20 g/L cGLYC	2.6 g/L (0.01 g/L/h) 2.9 g/L (0.01 g/L/h)	Mangayil et al. (2021)
A.senegalensis MA1	HS	Static	63 g/L pGLYC, 7.5 g/L YE; 7.76 g/L PEG 6000	469.83 g/L (0.652 g/L/h)[b]	Aswini et al. (2020)
G. xylinus sp.	HS	Static	20 g/L cGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep 40 g/L cGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep	1.5 g/L(0.01 g/L/h) 2.9 g/L (0.02 g/L/h)	Dikshit and Kim (2020)
Komagataeibacter sp.nov CGMCC 17,276	AE	Static	20 g/L pGLYC, 9 g/L YE, 5 g/L Pep, 30 g/L CSL, 0.3% AA, 1.5% Eth; 40 g/L cGLYC 5 g/L YE, 5 g/L Pep 30 g/L CSL, 0.7% AA, 0.3% Eth	4.5 g/L (0.05 g/L/h) 6 g/L (0.06 g/L/h)	Lu et al. (2020)
K. hansenii JR-02	HS modified	Static	20 g/L pGLYC, 2.5 g/L YE, 2.5 g/L Pep	2.4 g/L (0.01 g/L/h)	Li et al. (2019)
G. xylinus ATCC 23769	HS	Static	30 g/L cGLYC, 16 g/L YE, 4 g/L Na_2HPO_4, 3.5 g/L succinic acid	0.24 g/L (1.4 mg/L/h)	Lins et al. (2019)
A. xylinum sp.	HS	Static	40 g/L cGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep	1.5 g/L (4 mg/L/h)	Wu et al. (2019)
G. xylinus KCCM 41431	HS	Static	20 g/L cGLYC, 9 g/L YE, 9 g/L Pep 20 g/L pGLYC, 9 g/L YE, 9 g/L Pep	7.4 g/L (0.041 g/L/h) 7.7 g/L (0.044 g/L/h)	Yang et al. (2019)
Komagataeibacter saccharivorans sp.	HS	Static	20 g/L cGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep	12.6 g/L (0.08 g/L/h)	Gayathri and Srinikethan (2018)
G. xylinus BNKC19	HS	Static	10 g/L cGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep	12.3 g/L (0.07 g/L/h)	Soemphol et al. (2018)
K. rhaeticus PG2	HS	Static	20 g/L pGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep 30 g/L pGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep	6.9 g/L (0.02 g/L/h) 8.7 g/L (0.02 g/L/h	Thorat and Dastager (2018)
K. xylinus B-12068	HS modified	Static	20 g/L pGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep, 3% Eth	23.2 g/L (0.14 g/L/h)	Volova et al. (2018)
Komagataeibacter sp. W1	HS	Static	20 g/L pGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep	1.2 g/L (4 mg/L/h)	Wang et al. (2018)
Gluconoacetobacter xylinus DSM46604	Defined, YE containing	Shake flasks agitated Bioreactor 3L, agitated/aerated	20 g /L pGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 3 g/L K_2HPO_4, 0.05 g/L $MgSO_4$	1.43 g/L (0.012 g/L/h) 2.87 g/L (0.024 g/L/h)	Adnan et al. (2015) Adnan (2015)
Gluconoacetobacter sp. A2	HS	Static	20 g/L pGLYC,5 g/L YE, 5 g/L Pep	1.95 g/L (0.027 g/L/h)	Jalili Tabaii and Emtiazi (2016)
K. sucrofermentans DSM 15,973	HS	Static	20 g/L cGLYC,5 g/L YE, 5 g/L Pep	3.2 g/L (0.01 g/L/h)	Tsouko et al. (2015)
Acetobacter xylinum AJ_3	Defined,YE,peptone containing	Static	35 g/L pGLYC,10 g/L YE, 7.5 g/L Pep,10 g/L Na_2HPO_4, 10 g/L AA	8.52 g/L (0.044 g/L/h)	Al-Shamary and Al-Darwash (2013)
A. xylinum DSMZ-2004	Semidefined, YE, apple extract containing	Static	2% pGLYC, 2.5% glucose (apples),0.05% YE, 0.3% $(NH_4)_2SO_4$, 0.5% citric acid	8.6 g/L (0.026 g/L/h	Casarica et al. (2013)

Table 1 (continued)

Bacterial strain	Growth medium	Cultivation mode	Medium composition	Production metrics[a]	References
G. intermedius NEDO-01	HS	Shake flasks rotating Bioreactor 5L, agitated/aerated	20 g/L cGLYC,5 g/L YE, 5 g/L Pep, 25 g/L CMC	1.3 g/L (0.01 g/L/h) 3.4 g/L (0.034 g/L/h)	Kose et al. (2013)
G. sucrofermentans CECT 7291	HS	Static	20 g/L pGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep, 2.7 g/L Na_2HPO_4, 1.15 g /L citric acid	2.0 g/L (0.0064 g/L/h)	Santos et al. (2013)
G. xylinus CGMCC 2955	Defined	Shake flasks agitated	25 g/L pGlyc, 3 g/L Na2HPO4, 1 g/L KH2PO4, 5 g/L (NH4)2SO4, 0.02 g/L MgCl2, 0.02 g/LCaCl2, 0.0015 g/L paraamin-obenzoic acid	6.05 g/L (0.050 g/L/h)	Zhong et al. (2013)
G. sacchari sp.	HS	Static	20 g/L cGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep	0.1 g/L (0.1 mg/L/h)	Carreira et al. (2011)
G. persimmonis GH-2	HS	Bioreactor 5L, agitated/aerated	20 g/L pGLYC,5 g/L YE, 5 g/L Pep	2.47 g/L (0.013 g/L/h)	Hungund and Gupta (2010a)
Enterobacter amnigenus GH-1	HS	Static	20 g/L pGLYC,5 g/L YE, 5 g/L Pep	1.2 g/L (0.004 g/L/h)	Hungund and Gupta (2010b)
Acetobacter sp. V6	HS modified	Shake flasks agitated	2% pGLYC, 1.6% YE, 0.4% Na_2HPO4, 0.35% succinic acid	4.98 g/L (0.030 g/L/h)	Jung et al. (2010)
G. xylinus ATCC 53,524	HS	Static	20 g/L pGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep, 2.7 g/L Na_2HPO_4, 1.15 g /L citric acid	3.75 g/L (0.039 g/L/h)	Mikkelsen et al. (2009)
Gluconacetobacter sp. RKY5	HS optimized	Static Shake flasks agitated	15 g/L pGLYC, 8 g/L YE, 3 g/L K_2HPO_4, 3 g/L AA	4.59 g/L (0.032 g/L/h) 5.63 g/L (0.039 g/L/h)	Kim et al. (2006)
G. xylinus ATCC 10,245	HS	Static	10 g/L pGLYC,5 g/L YE, 5 g/L Pep, 2.7 g/L Na_2HPO_4, 1.15 g/L citric acid		Keshk and Shameshima (2005)
A. xylinum DA	YPD	Static	20 g/L pGLYC, 5 g/L YE, 5 g/L Pep, 2.7 g/L Na_2HPO_4 , 1.15 g /L citric acid, 20 g/L AA	3.83 g/L (0.016 g/L/h)	Toda et al. (1997)
A.xylinum IFO 13,693	HS modified	Shake flasks agitated	0.5% pGLYC,0.5% YE, 2% Pep,0.1% $MgSO_4$,0.2% Eth	4.84 g/L (0.067 g/L/h)	Masaoka et al. (1993)

CMC carboxymethyl cellulose, *HS* Hestrin–Schramm medium, *YPD* yeast extract–peptone–glucose medium, *AE* acetate ethanol medium, *MA/9* unoptimized minimal medium, *pGLYC* pure glycerol, *cGLYC* crude glycerol, *YE* yeast extract, *Pep* peptone, *Eth* ethanol, *AA* acetic acid, *CSL* corn steep liquor

[a] BC concentration at the end of cultivation (specific productivity: increase in concentration on average per hour)

[b] Both expressed in wet weight

Dastager 2018; Soemphol et al. 2018) or modified (Jung et al. 2010; Volova et al. 2018; Li et al. 2019) Hestrin–Schramm (HS) medium commonly used for acetic acid bacteria, replacing conventional carbon sources (mono- or di-saccharides) with glycerol. In some cases, other nutrient media of defined (Al-Shamary and Al-Darwash 2013; Lu et al. 2020; Vigentini et al. 2019; Mangayil et al. 2021), semi-defined (Casarica et al. 2013) or complex (Vazquez et al. 2013) compositions were also employed. In a number of studies, a positive effect of increased glycerol concentrations on cellulose yield and specific productivity of the bioprocess as a whole was noted. Besides, the addition of various additives such as organic acids (Toda et al. 1997; Kim et al. 2006; Jung et al. 2010; Lins et al. 2019), ethanol (Masaoka et al. 1993; Volova et al. 2018; Lu et al. 2020), water-soluble polymers (Kose et al. 2013) to the culture medium can also significantly promote the formation of BC. By this time, purified glycerol is predominantly included in the composition of nutrient media, although a fairly high productivity for

BC is also achieved when this source is used in a crude, i.e., not purified, form (Vazquez al. 2013; Gayathri and Srinikethan 2018; Yang et al. 2019; Lu et al. 2020). Quite comparable levels of BC yields are also shown for some producers when using both types of glycerol, which can be facilitated by the more appropriate composition of nitrogen sources (Lu et al. 2020). It should be noted that nutrient formulations currently use almost exclusively traditional nitrogen sources, such as yeast extract (YE) and/or peptone (Pep), although good potential has also been shown (Vazquez et al. 2013) for corn steep liquor (CSL). Replacing traditional nitrogen sources not only with the less expensive CSL, but also with other nitrogen-rich extracts, concentrates and hydrolysates of natural origin is crucial for any further scaling of BC biosynthesis processes, as this would significantly reduce their overall costs. Such attempts using fish powder, soybean meal, malt extract, casein or fish hydrolysates in combination with glycerol have been performed with some success (Hungund and Gupta 2010b; Adnan 2015; Aswini et al. 2020). However, further in-depth studies of their optimal levels are required to maximize BC formation for different producers, at least commensurate with the productivity achieved by traditional sources. The situation is quite similar to the use of crude glycerol for the production of BC. It is well known that not purified glycerol contains a number of by-products (methanol, soap, inorganic salts, free fatty acid, unreacted acyl glycerols, etc.) whose composition and amounts are affected by possible differences in the biodiesel technologies used (Samul et al. 2013; Mangayil et al. 2021). Although crude glycerol (Wendisch et al. 2011; Posada et al. 2012), like purified glycerol (Kenar 2007; da Silva et al. 2009), is successfully used to obtain many value-added products, including BC, by microbial conversion, such impurities can also adversely affect the activity of producer cells and the overall biosynthetic pathway. Such effects can be eliminated by some pre-treatment of crude glycerol, for which various partial or more complete purification methods have been developed (Posada et al. 2012; Yang et al. 2012). However, this can significantly increase the overall cost and should therefore be avoided. Thus, in order to ensure a high yield of BC, which is undoubtedly achievable on a crude glycerol (Vazquez al. 2013; Gayathri and Srinikethan 2018; Yang et al. 2019; Lu et al. 2020), it is necessary to balance the physiological requirements of different producers for the substrate qualities with its composition at different origins through appropriate focused research for the accumulation and comparative analysis of more data (Samul et al. 2013). This would provide still absent, more general recommendations for the use of crude glycerol, thereby contributing to the cost efficiency of BC production. Compared with the mode of static cultivation (Table 1), BC production under aeration/agitation conditions has been studied much less frequently (Kim et al. 2006; Jung et al. 2010; Kose et al. 2013; Adnan et al. 2015), especially when using bioreactors (Hungund and Gupta 2010b; Adnan 2015). The yield and productivity achieved by BC are also quite moderate (Kim et al. 2006) not exceeding 5.63 g/L (0.039 g/L/h), thus lower compared to the several static cultivation data (Table 1). However, further research is needed in this direction, as it is well known that higher oxygen supply and volumetric agitation could promote increasing yields and specific productivity for producer strains, thus amplifying the bioprocess towards the large-scale industrial production

Conclusions

Glycerol as an undesirable and polluting by-product, i.e., waste generated in significant quantities in combination with biodiesel production requires greater re-use, including the production of valuable products through microbiological conversion.

This polyol, even in a crude unrefined form, can be used as a renewable carbon source for the production of BC, which could stimulate the development of cost-efficient and environmentally friendly technologies to achieve an expanded use of this biopolymer within a broad and versatile range of practical applications. Since the data obtained so far remain somewhat one-sided and largely limited, the relevant research needs further development.

As with other carbon sources, the microbial synthesis of BC from glycerol is highly strain-dependent, that is, the yield, specific productivity and structural features of a biopolymer are determined by specific properties, both genotypic and phenotypic, of the producer. In turn, this creates the need for thorough studies and assessment of these properties, even for seemingly homogeneous strains for their appropriate full-fledged selection.

A much wider use of appropriate optimization techniques is required to identify and determine the optimal levels of the relevant factors for maximum BC formation by selected producers.

The inclusion of various nitrogen-rich extracts and hydrolysates of natural origin, which is still a rather rare, is particularly important in the development and optimization of cultivation media compositions, as this would significantly reduce the overall cost of BC synthesis.

There is a need to significantly expand the research on BC production from glycerol under aerated/agitated conditions, which are still noticeably less used than static cultivation, although they could promote increasing yields and specific productivity. However, the effect of such conditions should be additionally assessed in terms of their potential impact on the structural properties of

BC and, consequently, on the suitability of the polymer for specific applications.

Acknowledgements
Not applicable.

Authors' contributions
General writing of the manuscript, investigation, data collection and analysis—PZ; data search, editing and design—SK and MR; conceptualization, critical revision and supervision—PS. All authors contributed to the study conception and design, read and approved the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding
This study was supported by the Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia (Grant Number 19–00- A01612-000004).

Availability of data and materials
The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the first author on reasonable request and/or are freely accessible via the internet.

Declarations

Ethics approval and consent to participate
Not applicable.

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Received: 22 August 2021 Accepted: 20 November 2021
Published online: 29 November 2021

References

Adeleye AT, Odoh CK, Enudi OC, Banjoko OO, Osigbeminiyi OO, Toluwalope OE, Louis H (2020) Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. Process Biochem 96:174–193. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.032
Adnan AB (2015) Production of Bacterial Cellulose Using Low-cost Media. Ph D Thesis. The University of Waikato
Adnan A, Nair GR, Lay MC, Swan JE, Umar R (2015) Glycerol as a cheaper carbon source in bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* DSM46604 in batch fermentation system. Malays J Anal Sci 19:1131–1136
Alemam AM, Shaheenb TI, El Din HS, Said E, Desoukya S, El-Gamala MS (2021) Production enhancement of bacterial cellulose nanofiber using local *Komagataeibacter xylinus* SB3.1 under static conditions. Egypt J Chem 64(4):2213–2221. https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.52972.3096
Al-Shamary EE, Al-Darwash AK (2013) Influence of fermentation condition and alkali treatment on the porosity and thickness of bacterial cellulose membranes. Online J Sci Technol 3:194–203
Andriani D, Apriyana AY, Karina M (2020) The optimization of bacterial cellulose production and its applications: a review. Cellulose 27:6747–6766. https://doi.org/10.1007/s10570-020-03273-9
Arancon RD, Liu CSK, Chan KM, Kwan TH, Luque R (2013) Advances on waste valorization: new horizons for a more sustainable society. Energy Sci Eng 1(2):53–71. https://doi.org/10.1002/ese3.9
Aswini K, Gopal NO, Uthandi S (2020) Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter senegalensis* MA1. BMC Biotechnol 20(1):46. https://doi.org/10.1186/s12896-020-00639-6
Azeredo HMC, Barud H, Farinas CS, Vasconcellos VM, Claro AM (2019) Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. Front Sustain Food Syst. https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007
Azuma Y, Hosoyama A, Matsutani M, Furuya N, Horikawa H, Harada T, Hirakawa H, Kuhara S, Matsushita K, Fujita N, Shirai M (2009) Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. Nucleic Acids Res 37(17):768–5783. https://doi.org/10.1093/nar/gkp612
Bae S, Shoda M (2004) Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. Biotechnol Prog 20:1366–1371. https://doi.org/10.1021/bp0498490
Baptista AC, Ferreira IMM, Borges JPMR (2013) Cellulose-medical, pharmaceutical and electronic applications. In: Van De Ven T (ed) Cellulose-based bioelectronic devices. InTech, London, p 67
Barcelos MCS, Vespermann KAC, Pelissari FM, Molina G (2019) Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. Crit Rev Food Sci Nutr 60:1475–1495. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1575791
Bettiga M, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF (2008) Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. Biotechnol Biofuels. https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-16
Bianchet RT, Vieira Cubas AL, Machado MM, Siegel MEH (2020) Applicability of bacterial cellulose in cosmetics-bibliometric review. Biotechnol Rep. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00502
Blanco Parte FG, Santoso SP, Chou CC, Verma V, Wang HT, Ismadji S, Cheng KC (2020) Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. Crit Rev Biotechnol 40:1–18. https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713721
Brown EE, Laborie MPG (2007) Bioengineering bacterial cellulose/polyethylene oxide) nanocomposites. Biomacromol 8(10):3074–3081
Buldum G, Bismarck A, Mantalaris A (2018) Recombinant biosynthesis of bacterial cellulose in genetically modified *Escherichia coli*. Bioprocess Biosyst Eng 41:265–279. https://doi.org/10.1007/s00449-017-1864-1
Cacicedo ML, Castro MC, Servetas I et al (2016) Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. Bioresour Technol 213:172–180. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.071
Campano C, Ana Balea A, Blanco A, Negro C (2016) Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. Cellulose 23(1):57–91. https://doi.org/10.1007/s10570-015-0802-0
Carreira P, Mendes JAS, Trovatti E, Serafim LS, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP (2011) Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. Bioresour Technol 102:7354–7360. https://doi.org/10.1016/j.biortech./2011.04.081
Casarica A, Campeanu G, Moscovici M, Ghiorghita A, Manea V (2013) Improvement of bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* dsmz-2004 on poor quality horticultural substrates using the taguchi method for media optimization. Part 1. Cell Chem Technol 47:61–68
Cazon P, Vázquez M (2021) Bacterial cellulose as a biodegradable food packaging material: a review. Food Hydrocoll 113(11):106530. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106530
Chao Y, Sugano Y, Shoda M (2001) Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor. Appl Microbiol Biotechnol 55(6):673–679. https://doi.org/10.1007/s002530000503
Chawla PR, Bajaj IB, Survase SA, Singhal RS (2009) Microbial cellulose: fermentative production and applications. Food Technol Biotechnol 47(2):107–124
Cook J. (2013) Amine functionalization of bacterial cellulose for targeted delivery applications. Thesis. The University of Western Ontario
da Silva GP, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Biotechnol Adv 27(1):30–39. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006
Dayal MS, Catchmark JM (2016) Mechanical and structural property analysis of bacterial cellulose composites. Carbohydr Polym 144:447–453. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.055
de Oliveira Barud HG, da Silva RR, da Silva BH, Tercjak A, Gutierrez J, Lustri WR, de Oliveira Jr OB, Ribeiro SJL (2016) A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. Carbohydr Polym 153:406–420. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.059
Devi GK, Alamu A (2013) Production of biopolymer levan by *Bacillus subtilis* using non-ionic surfactants. Asian J Pharm Technol 3:149–154
Dikshit PK, Kim BS (2020) Bacterial cellulose production from biodiesel-derived crude glycerol, magnetic functionalization, and its application as carrier

for lipase immobilization. Int J Biol Macromol. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.047
El-Malek FA, Khairy H, Farag A, Omar S (2020) The sustainability of microbial bioplastics, production and applications. Int J Biol Macromol 157(15):319–328. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.076
El-Saied H, El-Diwany AI, Basta AH, Atwa NA, El-Ghwas DE (2008) Production and characterization of economical bacterial cellulose. BioResources 3(4):1196–1217
Feldman D (2015) Cellulose nanocomposites. J Macromol Sci Part A 52(4):648–658. https://doi.org/10.1080/10601325.2015.1007279
Freitas F, Alves VD, Reis MAM (2011) Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends Biotechnol 29(8):388–398. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008
Fu L, Zhang J, Yang G (2013) Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. Carbohydr Polym 92(2):1432–1442. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.071
Gahlawat G, Srivastava AK (2017) Model-based nutrient feeding strategies for the increased production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus*. Appl Biochem Biotechnol 83(2):530–542. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2482-8
Gayathri G, Srinikethan G (2018) Crude glycerol as a cost effective carbon source for the production of cellulose by *K. saccharivorans*. Biocatal Agric Biotechnol 16:326–330. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.024
Glenn K, Ingram-Smith C, Smith KS (2014) Biochemical and kinetic characterization of xylulose 5-phosphate/fructose 6-phosphate phosphoketolase 2 (Xfp2) from *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell 13(5):657–663. https://doi.org/10.1128/EC.00055-14
Gorgieva S, Trček J (2019) Bacterial cellulose: production, modification and perspectives in biomedical applications. Nanomaterials 9:1–20. https://doi.org/10.3390/nano9101352
Gullo M, La China S, Falcone PM, Giudici P (2018) Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 102(16):6885–6898. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9164-5
Gullo M, La China S, Petroni G, Di Gregorio S, Giudici P (2019) Exploring K2G30 genome: a high bacterial cellulose producing strain in glucose and mannitol based media. Front Microbiol 10:58. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00058
Huang Y, Zhu C, Yang J, Nie Y, Chen C, Sun D (2014) Recent advances in bacterial cellulose. Cellulose 21:1–30. https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z
Hungund BS, Gupta SG (2010a) Improved production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2. J Microbial Biochem Technol 2:127–133. https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000037
Hungund B, Gupta SG (2010b) Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple. World J Microbiol Biotechnol 26(10):1823–1828. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0363-1
Hussain Z, Sajjad W, Khan T, Wahid F (2019) Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. Cellulose 26:2895–2911. https://doi.org/10.1007/s10570-019-02307-1
Hutchens SA, León RV, O'Neill HM, Evans BR (2007) Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production. Lett Appl Microbiol 44(2):175–180. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02055.x
Ishida T, Mitaral M, Sugano Y, Shoda M (2003) Role of water-soluble polysaccharides in bacterial cellulose production. Biotechnol Bioeng 83(4):474–478. https://doi.org/10.1002/bit.10690
Jalili Tabaii M, Emtiazi G (2016) Comparison of bacterial cellulose production among different strains and fermented media. Appl Food Biotechnol 3(1):35–41. https://doi.org/10.22037/afb.v3i1.10582
Jang WD, Hwang JH, Kim HU, Ryu JY, Lee SY (2017) Bacterial cellulose as an example product for sustainable production and consumption. Microb Biotechnol 10:1181–1185. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12744
Jozala AF, Pértile RAN, dos Santos CA, de Carvalho S-EV, Seckler MM, Gama FM, Pessoa A (2015) Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. Appl Microbiol Biotechnol 99:1181–1190. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3
Jozala AF, de Lencastre-Novaes LC, Lopes AM, de Carvalho S-E, Mazzola PG, Pessoa A Jr, Grotto D, Gerenutti M, Chaud MV (2016) Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. Appl Microbiol Biotechnol 100(5):2063–2072. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7243-4
Jung HI, Jeong JH, Lee OM, Park GT, Kim KK, Park HC, Lee SM, Kim YG, Son HJ (2010) Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from Acetobacter sp. V6 cultured in shake flasks. Bioresour Technol 101(10):3602–3608. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.111
Kenar JA (2007) Glycerol as a platform chemical: sweet opportunities on the horizon? Lipid Technol 19(11):249–253. https://doi.org/10.1002/lite.200700079
Keshk S, Sameshima K (2005) Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. Afr J Biotechnol 4(6):478–482. https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3087
Kim J, Cai Z, Lee HS et al (2011) Preparation and characterization of a bacterial cellulose/chitosan composite for potential biomedical application. J Polym Res 18:739–744. https://doi.org/10.1007/s10965-010-9470-9
Kim SY, Kim JN, Wee YJ, Park DH, Ryu HW (2006) Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 isolated from persimmon vinegar. Appl Biochem Biotechnol 131(1–3):715–815. https://doi.org/10.1385/ABAB:131:1:705
Klemm D, Schumann D, Kramer F, Heßler N, Hornung M, Schmauder HP, Marsch S (2006) Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. In: Klemm D (ed) Polysaccharides II. Springer, Berlin
Kolesovs S, Semjonovs P (2020) Production of bacterial cellulose from whey—current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol 104(18):7723–7730. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10803-9
Kose R, Sunagawa N, Yoshida M, Tajima K (2013) One-step production of nanofibrillated bacterial cellulose (NFBC) from waste glycerol using *Gluconacetobacter intermedius* NEDO-01. Cellulose 20:2971–2979. https://doi.org/10.1007/s10570-013-0050-0
Kucera D, Pernicová I, Kovalcik A, Koller M, Mullerova L, Sedlacek P (2018) Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. Bioresour Technol 256:552–556. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.06
Kumar AS, Mody K, Jha B (2007) Bacterial exopolysaccharides—a perception. J Basic Microbiol 47(2):103–117. https://doi.org/10.1002/jobm.200610203
Kumar LR, Yellapu SK, Tyagi RD, Zhang X (2019) A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. Bioresour Technol 293:122–155. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122155
La China S, Zanichelli G, De Vero L, Gullo M (2018) Oxidative fermentations and exopolysaccharides production by acetic acid bacteria: a mini review. Biotechnol Lett 40:1289–1302. https://doi.org/10.1007/s10529-018-25917
Lappa IK, Papadaki A, Kachrimanidou V, Terpou A, Koulougliotis D, Eriotou E, Kopsahelis N (2019) Cheese whey processing: integrated biorefinery concepts and emerging food applications. Foods 8(8):347. https://doi.org/10.3390/foods8080347
Laslo T, von Zaluskowski P, Gabris C, Lodd E, Rückert C, Dangel P, Kalinowski J, Auchter M, Seibold G, Eikmanns BJ (2012) Arabitol metabolism of *Corynebacterium glutamicum* and its regulation by AtlR. J Bacteriol 194(5):941–955. https://doi.org/10.1128/JB.06064-11
Lee S, Abraham A, Lim ACS, Choi O, Seo JG, Sang BI (2021) Characterisation of bacterial nanocellulose and nanostructured carbon produced from crude glycerol by *Komagataeibacter sucrofermentans*. Bioresour Technol 342:125918. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125918
Li J, Chen G, Zhang R et al (2019) Production of high crystallinity type-I cellulose from *Komagataeibacter hansenii* JR-02 isolated from Kombucha tea. Biotechnol Appl Biochem 66:108–118. https://doi.org/10.1002/bab.1703
Li Z, Chen SQ, Cao X, Li L, Zhu J, Yu H (2021) Effect of pH buffer and carbon metabolism on the yield and mechanical properties of bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582. J Microbiol Biotechnol 31(3):429–438. https://doi.org/10.4014/jmb.2010.10054
Licciardello F (2017) Packaging, blessing in disguise. Review on its diverse contribution to food sustainability. Trends Food Sci Technol 65:32–39. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.05.003
Lin AY, Nickerson TA (1977) Acid hydrolysis of lactose in whey versus aqueous solutions. J Dairy Sci 60(1):34–39

Lins LSG, Silva WE, Bellan MF, Calazans GMT (2019) Use of biodiesel waste for efficient production of cellulosic membranes A "green" proposal for filter preparation. Cellulose Chem Technol 53(5–6):417–425. https://doi.org/10.35812/CelluloseChemTechnol.2019.553.42

Liu Y, Gu Q, Ofosu FK, Yu X (2015) Isolation and characterization of curdlan produced by *Agrobacterium* HX1126 using α-lactose as substrate. Int J Biol Macromol 81:498–503. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.04

Lu T, Gao H, Liao B, Wu J, Zhang W, Huang J, Liu M, Huang J, Chang Z, Jin M, Yi Z, Jiang D (2020) Characterization and optimization of production of bacterial cellulose from strain CGMCC 17276 based on whole-genome analysis. Carbohydr Polym 232:115788. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115788

Lule VK, Singh R, Pophaly SD, Poonam SK, Tomar SK (2016) Production and structural characterisation of dextran from an indigenous strain of *Leuconostoc mesenteroides* BA08 in whey. Int J Dairy Tech 69(4):520–531. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12271

Lynch KM, Zannini E, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK (2019) Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages. Compr Rev Food Sci F 18(3):587–625. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12440

Mangayil R, Rissanen AJ, Pammo A, Guizelini D, Losoi P, Sarlin E, Tuukkanen S, Santala V (2021) Characterization of a novel bacterial cellulose producer for the production of eco-friendly piezoelectric-responsive films from a minimal medium containing waste carbon. Cellulose 28:671–689. https://doi.org/10.1007/s10570-020-03551-6

Marangoni C, Furigo A, De Aragão GMF (2002) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. Proc Biochem 38:137–141. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.056

Masaoka S, Ohe T, Sakota N (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. J Ferment Bioeng 75(1):18–22

McNamara JT, Morgan JL, Zimmer J (2015) A molecular description of cellulose biosynthesis. Annu Rev Biochem 84:895–921. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033930

Mikkelsen D, Flanagan BM, Dykes GA, Gidley MJ (2009) Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. J Appl Microbiol 107:576–583. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x

Millon LE, Wan WK (2006) The polyvinyl alcohol-bacterial cellulose system as a new nanocomposite for biomedical applications. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 79(2):245–253. https://doi.org/10.1002/jbm.b.30535

Minor FW, Greathouse GA, Shirk GA, Schwartz AM, Harris M (1954) Biosynthesis of C14-specifically labeled cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. From D-mannitol-1-C14 with and without ethanol. J Am Chem Soc 76(20):5052–5054

Mohite BV, Koli SH, Narkhede CP, Patil SN (2017) Prospective of microbial exopolysaccharide for heavy metal exclusion. Appl Biochem Biotechnol 183:582–600. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2591-4

Moniri M, Boroumand Moghaddam A, Azizi S, Abdul Rahim R, Bin Ariff A, Zuhainis Saad W, Navaderi M, Mohamad R (2017) Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering. Nanomaterials (basel) 7(9):257. https://doi.org/10.3390/nano7090257

Morais E, Silva N, Sintra T, Santos SA, Neves B, Almeida I, Costa P, Correia-Sá I, Ventura SP, Silvestre A, Freire M, Freire C (2019) Anti-inflammatory and antioxidant nanostructured cellulose membranes loaded with phenolic-based ionic liquids for cutaneous application. Carbohydr Polym 206:187–197. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.051

Narancic T, O'Connor KE (2019) Plastic waste as a global challenge: are biodegradable plastics the answer to the plastic waste problem? Microbiology 165(2):129–137. https://doi.org/10.1099/mic.0.000749

Nguyen VT, Flanagan B, Gidley MJ, Dykes GA (2008) Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. Curr Microbiol 57:449–453. https://doi.org/10.1007/s00284-008-9228-3

Nwodo U, Green E, Okoh A (2012) Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. Int J Mol Sci 13(11):14002–14015. https://doi.org/10.3390/ijms131114002

Oikawa T, Ohtori T, Ameyama M (1995a) Production of cellulose from D-Mannitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. Biosci Biotechnol Biochem 59:331–332. https://doi.org/10.1271/bbb.59.331

Oikawa T, Morino T, Ameyama M (1995b) Production of cellulose from D-arabitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. Biosci Biotechnol Biochem 59:1564–1565. https://doi.org/10.1271/bbb.59.1564

Oikawa T, Nakai J, Tsukagawa Y, Soda K (1997) A novel type of D-mannitol dehydrogenase from *Acetobacter xylinum*: occurrence, purification, and basic properties. Biosci Biotechnol Biochem 61:1778–1782. https://doi.org/10.1271/bbb.61.1778

Olivas GI, Barbosa-Cánovas GV (2005) Edible coatings for fresh-cut fruits. Crit Rev Food Sci Nutr 45(7–8):657–670. https://doi.org/10.1080/10408690490911837

Onifade AA, Olaoye O, Fadahunsi IF, Owoseni A, Garuba EO, Atoyebi T (2013) Effects of cultural conditions on dextran production by *Leuconostoc* spp. Int Food Res J 20:1645–1651

Pacheco G, de Mello CV, Chiari-Andreo BG, Isaac VLB, Ribeiro SJL, Pecoraro E et al (2018) Bacterial cellulose skin masks-properties and sensory tests. J Cosmet Dermatol 17:840–847. https://doi.org/10.1111/jocd.12441

Park JK, Jung JY, Khan T (2009) Bacterial cellulose. In: Williams PA (ed) Phillips GO. Handbook of Hydrocolloids, Elsevier, pp 724–739

Park S, Baker JO, Himmel ME, Parilla PA, Johnson DK (2010) Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. Biotechnol Biofuels 24:3–10. https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10

Pathak H, Prasad A (2014) Applications and prospects of microbial polymers in textile industries. J Text Sci Eng 4:1000172. https://doi.org/10.4172/2165-8064.1000

Posada JA, Rincón LE, Cardona CA (2012) Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem. Biores Technol 111:282–293. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.151

Raghavendran V, Asare E, Roy I (2020) Bacterial cellulose: biosynthesis, production, and applications. In: Poole RK (ed) Advances microbial physiology, vol 77. Elsevier, Oxford, pp 89–138. https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2020.07.002

Raghunandan K, Kumar A, Kumar S, Permaul K, Singh S (2018) Production of gellan gum, an exopolysaccharide, from biodiesel-derived waste glycerol by *Sphingomonas* spp. 3 Biotech 8(1):71. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1096-3

Ramana K, Tomar A, Singh L (2000) Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. World J Microbiol Biotechnol 16:245–248. https://doi.org/10.1023/A:1008958014270

Ravindran R, Jaiswal AK (2016) Exploitation of food industry waste for high-value products. Trends Biotechnol 34(1):58–69. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008

Rehm BHA (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nat Rev Microbiol 8:578–592. https://doi.org/10.1038/nrmicro2354

Reiniati I, Hrymak AN, Margaritis A (2017) Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. Crit Rev Biotechnol 37:510–524. https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1189871

Römling U, Galperin MY (2015) Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. Trends Microbiol 23(9):545–557. https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005

Rosa S, Lenz DM (2013) Biocomposites: influence of matrix nature and additives on the properties and biodegradation behavior. In: Charmy R (ed) Biodegradation—engineering and technology. InTech, Rijeka

Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. Bioresour Bioprocess 5:1–15. https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z

Salari M, Sowti Khiabani M, Rezaei Mokarram R, Ghanbarzadeh B, Samadi Kafil H (2019) Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. Int J Biol Macromol 122:280–288. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.136

Salihu R, Foong CY, Abd Razak SI, Kadir MRA, Yusof AHM, Nayan NHM (2019) Overview of inexpensive production routes of bacterial cellulose and its applications in biomedical engineering. Cell Chem Technol 53(1–2):1–13. https://doi.org/10.35812/CelluloseChemTechnol.2019.53.0133

Samul D, Leja K, Grajek W (2013) Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. Ann Microbiol 64(3):891–898. https://doi.org/10.1007/s13213-013-0767-x

Santos SM, Carbajo JM, Villar JC (2013) The effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production and properties from *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 focused on its use in degraded paper restoration. BioResources 8:3630–3645. https://doi.org/10.15376/biores.8.3.3630-3645

Schilling Ch, Weiss S (2021) A roadmap for industry to harness biotechnology for a more circular economy. New Biotechnol 60(1):9–11. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.08.005

Semjonovs P, Ruklisha M, Paegle L, Saka M, Treimane R, Skute M, Rozenberga L, Vikele L, Sabovics M, Cleenwerck I (2017a) Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. Appl Microbiol Biotechnol 101:1003–1012. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7761-8

Semjonovs P, Shakirova L, Broks R, Kistkins S, Zikmanis P (2017b) Influence of environmental factors on extracellular fructan and oligosaccharide production by *Gluconobacter nephelii*. Res J Microbiol 12:33–41. https://doi.org/10.3923/jm.2017.33.41

Sen KY, Baldurah S (2021) Renewable biomass feedstocks for production of sustainable biodegradable polymer. Curr Opin Green Sustain Chem 27:1–6. https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100412

Shanmugam M, Abirami RG (2019) Microbial polysaccharides—chemistry and applications. J Bio Active Prod Nat 9:73–78. https://doi.org/10.1080/22311866.2019.1571944

Shi Z, Zhang Y, Phillips GO, Yang G (2014) Utilization of bacterial cellulose in food. Food Hydrocoll 35:539–545. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012

Singhsa P, Narain R, Manuspiya H (2018) Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. Cellulose 25:1571–1581. https://doi.org/10.1007/s10570-018-1699-1

Siro I, Plackett D (2010) Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials—a review. Cellulose 17(3):459–494. https://doi.org/10.1007/s10570-010-9405-y

Sirohi R, Kumar Gaur V, Kumar Pandey A, Jun Sim S, Kumar S (2021) Harnessing fruit waste for poly-3-hydroxybutyrate production: a review. Bioresour Technol 326:124734. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124734

Skvortsova ZN, Gromovykh TI, Gracheva VS, Traskina VY (2019) Physicochemical mechanics of bacterial cellulose. Colloid J 81:366–376. https://doi.org/10.1134/S1061933X19040161

Soemphol W, Hongsachart P, Tanamool V (2018) Production and characterization of bacterial cellulose produced from agricultural by-product by *Gluconacetobacter* strains. Mater Today Proc 5:11159–11168. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.01.036

Son HJ, Heo MS, Kim YG, Lee SJ (2001) Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. Biotechnol Appl Biochem 33:1–5. https://doi.org/10.1042/BA20000065

Sperotto G, Stasiak LG, Godoi JP, Gabiatti NC, De Souza SS (2021) A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined and minimal media modulations. Cellulose 28:2649–2673. https://doi.org/10.1007/s10570-021-03754-5

Taban BM, Saichana N (2017) Physiology and biochemistry of acetic acid bacteria. In: Sengun IY (ed) Acetic acid bacteria: fundamentals and food applications. CRC Press, Boca Raton

Thoden JB, Holden HM (2007) Active site geometry of glucose-1-phosphate uridylyltransferase. Protein Sci 16(7):1379–1388. https://doi.org/10.1110/ps.072864707

Thompson DN, Hamilton MA (2001) Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. Appl Biochem Biotechnol Part A Enzym Eng Biotechnol 91–93:503–513. https://doi.org/10.1385/ABAB:91

Thorat MN, Dastager SG (2018) High yield production of cellulose by a *Komagataeibacter rhaeticus* PG2 strain isolated from pomegranate as a new host. RSC Adv 8:29797–29805. https://doi.org/10.1039/C8RA05295F

Tiwari ON, Sasmal S, Kataria AK, Devi I (2020) Application of microbial extracellular carbohydrate polymeric substances in food and allied industries. 3 Biotech 10:221. https://doi.org/10.1007/s13205-020-02200-w

Toda K, Asakura T, Fukaya M, Entani E, Kawamura Y (1997) Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. J Ferment Bioeng 84(3):228–231. https://doi.org/10.1016/s0922-338x(97)82059-4

Tonouchi N (2016) Cellulose and other capsular polysaccharides of acetic acid bacteria. In: Matsushita K, Toyama H, Tonouchi N, Okamoto-Kainuma A (eds) Acetic acid bacteria: ecology and physiology. Springer, Tokyo

Torres DPM, Gonçalves MPF, Teixeira JA, Rodrigues LR (2010) Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. Compreh Rev Food Sci Food Saf 9(5):438–454. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x

Trindade RA, Munhoz AP, Burkert CAV (2015) Raw glycerol as an alternative carbon source for cultivation of exopolysaccharide-producing bacteria. Appl Biotechnol 3:61–73

Trovatti E, Serafim LS, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP (2011) *Gluconacetobacter sacchari*: an efficient bacterial cellulose cell-factory. Carbohydr Polym 86:1417–1420. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.046

Tsang YF, Kumar V, Samadar P, Yang Y, Lee J, Ok YS, Song H, Kim KH, Kwon EE, Jeon YJ (2019) Production of bioplastic through food waste valorization. Environ Int 127:625–644. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.076

Tsouko E, Kourmentza C, Ladakis D, Kopsahelis N, Mandala I, Papanikolaou S, Paloukis F, Alves V, Koutinas A (2015) Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. Int J Mol Sci 16:14832–14849. https://doi.org/10.3390/ijms160714832

Ul-Islam M, Khan S, Ullah MW, Park JK (2015) Bacterial cellulose composites: synthetic strategies and multiple applications in biomedical and electro-conductive fields. Biotechnol J 10:1847–1861. https://doi.org/10.1002/biot.201500106

Ul-Islam M, Ullah MJ, Khan S, Shah N, Park JK (2017) Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. Int J Biol Macromol 102:1166–1173. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.110

Ul-Islam M, Ullah MW, Khan S, Park JK (2020) Production of bacterial cellulose from alternative cheap and waste resources: a step for cost reduction with positive environmental aspects. Korean J Chem Eng 37:925–937. https://doi.org/10.1007/s11814-020-0524-33

Ummartyotin S, Sain M (2016) Cellulose composites for electronic devices. Nova Science Publishers Inc, New York

Vazquez A, Foresti ML, Cerrutti P, Galvagno M (2013) Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. J Polym Environ 21:545–554. https://doi.org/10.1007/s10924-012-0541-3

Velasco-Bedrán H, López-Isunza F (2007) The unified metabolism of *Gluconacetobacter entanii* in continuous and batch processes. Process Biochem 42(8):1180–1190

Vigentini I, Fabrizio V, Dellacà F, Rossi S, Azario I, Mondin C, Benaglia M, Foschino R (2019) Set-up of bacterial cellulose production from the genus *Komagataeibacter* and its use in a gluten-free bakery product as a case study. Front Microbiol 10:1953. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01953

Volova TG, Prudnikova SV, Sukovatyi AG, Shishatskaya EI (2018) Production and properties of bacterial cellulose by the strain *Komagataeibacter xylinus* B-12068. Appl Microbiol Biotechnol 102:7417–7428. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9198-8

Wang S-S, Han Y-H, Chen J-L et al (2018) Insights into bacterial cellulose biosynthesis from different carbon sources and the associated biochemical transformation pathways in *Komagataeibacter* sp W1. Polymers (basel) 10:963. https://doi.org/10.3390/polym10090963

Wendisch VF, Meiswinkel T, Lindner S (2011) Use of glycerol in biotechnological applications. In: Montero G, Stoytcheva M (eds) Biodiesel—quality emissions and by-products. InTech, Rijeka

Wu M, Chen W, Hu J, Tian D, Shen F, Zeng Y, Yang G, Zhang Y, Deng S (2019) Valorizing kitchen waste through bacterial cellulose production towards a more sustainable biorefinery. Sci Total Environ 695:133898. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133898

Yang F, Hanna MA, Sun R (2012) Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. Biotechnol Biofuels 5:13. https://doi.org/10.1186/1754-6843-5-13

Yang HJ, Lee T, Kim JR, Choi Y-E, Park Ch (2019) Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by *Gluconacetobacter xylinus*. J Ind Eng Chem 75:158–163. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.03.017

Yasuda K, Gong JP, Katsuyama Y, Nakayama A, Takanabe Y, Kondo E, Ueno M, Osada Y (2005) Biomechanical properties of high-toughness double network hydrogels. Biomaterials 26:4468–447510. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.021

Zhong C (2020) Industrial-scale production and applications of bacterial cellulose. Front Bioeng Biotechnol 8:605374. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374

Zhong C, Zhang GC, Liu M, Zheng XT, Han PP, Jia SR (2013) Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. Appl Microbiol Biotechnol 97:6189–6199. https://doi.org/10.1007/s00253-013-4908-8

Zikmanis P, Kolesovs S, Semjonovs P (2020a) Production of biodegradable microbial polymers from whey. Bioresour Bioprocess 7:36. https://doi.org/10.1186/s40643-020-00326-6

Zikmanis P, Brants K, Kolesovs S, Semjonovs P (2020b) Xtracellular polysaccharides produced by bacteria of the Leuconostoc genus. World J Microbiol Biotechnol 36(11):161. https://doi.org/10.1007/s11274-020-02937-9

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Submit your manuscript to a SpringerOpen journal and benefit from:

- ► Convenient online submission
- ► Rigorous peer review
- ► Open access: articles freely available online
- ► High visibility within the field
- ► Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

3.P. Zikmanis, K. Juhnevica-Radenkova, V. Radenkovs, D. Seglina, I. Krasnova, S. Kolesovs, Z. Orlovskis, A. Silaks, P. Semjonovs (2021), Mocrobial polymers in edible films and coatings of garden berry and grape: current and prospective use. Food and Bioprocess Technology, 14:1432–1445. https://doi.org/10.1007/s11947-021-02666-3 (*SCOPUS*).

Food and Bioprocess Technology
https://doi.org/10.1007/s11947-021-02666-3

REVIEW

Microbial Polymers in Edible Films and Coatings of Garden Berry and Grape: Current and Prospective Use

Peteris Zikmanis[1] · Karina Juhņeviča-Radenkova[2] · Vitalijs Radenkovs[2] · Dalija Segliņa[2] · Inta Krasnova[2] · Sergejs Kolesovs[1] · Zigmunds Orlovskis[1] · Artūrs Šilaks[1] · Pavels Semjonovs[1]

Received: 10 December 2020 / Accepted: 13 May 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract
Garden berries and grapes constitute an integral part of a healthy and functional diet. Reduction of post-harvest losses can maximize the shelf life of berry fruits, increasing their market value and promoting consumption. Among current storage techniques, the use of edible films is an emerging strategy for packaging and protecting the surface of small fruits. They provide the necessary barrier for berries against adverse external biotic or abiotic factors while supporting the necessary physiological processes such as moisture and gas exchange. Carbohydrate polymers are an important component of edible films. The desired mechanical strength as well as barrier properties are achieved by combining carbohydrate polymers with other bio-based compounds, such as lipids, proteins, and functional additives. Unlike plant polysaccharides, the studies and use of microbial extracellular polysaccharides (EPSs) remain scarce, especially for films and coatings of garden berries and grapes. This review summarizes the available data for currently used (xanthan, pullulan, gellan, dextran, bacterial cellulose) and prospective microbial EPSs (levan, curdlan, kefiran, bacterial alginate). Directions in future research to achieve more widespread, cost-effective, environmentally friendly production and applications of edible microbial EPS films are discussed.

Keywords Microbial exopolysaccharides · Garden berries · Storage · Edible films · Coatings · Shelf life · Post-harvest losses

Introduction

There is a widely accepted link between the consumption of diets rich in fruits and vegetables and a lower risk for various chronic health ailments including cardiovascular diseases and malignancies (Hannum, 2004). A wide variety of garden berries (including strawberries, raspberries, blueberries, blackberries, and grapes) is an important part of a functional and healthy diet. This is due to the fact that berries are very rich in bioactive compounds which are considered essential ingredients in functional foods (Skrovankova et al., 2015). Among them, in addition to a wide range of vitamins, are minerals and dietary fibers. Flavonoids (anthocyanins, flavonols, and flavanols), phenolic acids, and hydrolyzable tannins have pronounced physiological effects and health-promoting properties. These phenolic phytochemicals contribute to the prevention of inflammatory and oxidative stress associated with many organic pathologies (Giampieri et al., 2012). However, berries have relatively short post-harvest shelf life, especially if they are exposed to inappropriate storage conditions (excessive moisture, variable temperature) which may facilitate microbiological contamination. In addition, unsuitable storage conditions may negatively affect the nutritional value of berries and the potential health benefits (Gil-Giraldo et al., 2018). Therefore, more effective storage methods are needed to prevent undesirable compositional changes, reduce product loss, and increase the presence of berries in the functional foods market.

Various storage methods and techniques have been developed and successfully utilized (refrigeration, controlled atmosphere storage, ultrasound treatment, sterilization by both UV and γ-radiation) for this purpose (El-Ramady et al., 2015; De Souza et al., 2019). However, there is an increasing focus on the use of edible coatings and packaging for efficient

✉ Pavels Semjonovs
pavels.semjonovs@lu.lv

1 Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology, University of Latvia, 4, Ojara Vaciesa Str., Riga 1004, Latvia

2 Processing and Biochemistry Department, Institute of Horticulture, Graudu str. 1, Dobele 3701, Latvia

Published online: 27 May 2021

storage of garden berries and grapes (Dhaka & Upadhyay, 2018; Hing et al., 2019; Tahir et al., 2019; Maringgal et al., 2020; Galus et al., 2020; Radev & Pashova, 2020; Salehi, 2020). Similar to synthetic polymer packaging, the main function of food-grade biopolymer solutions, such as polysaccharides, proteins, and lipids (or their combinations), is to create a physical barrier between the food surface and external spoilage factors, thus improving the shelf life of the coated product. Traditional polymeric films (polyethylene, polypropylene, polystyrene, etc.) are often used for packaging of fresh produce due to their low cost as well as excellent gas barrier properties. However, the use of such materials is a serious environmental concern because of their non-biodegradable nature. In addition, political incentives to reduce single-use plastics, such as European Commission's (EC) directive EU 2019/904, puts additional demand on developing sustainable alternatives in food packaging. Therefore, edible films and coatings obtained from renewable biological and agricultural sources attract considerable attention (starch, gelatin, chitosan, alginate, proteins, etc.). These materials are recyclable and degradable, possess good barrier properties for moisture and gases, and can even possess antimicrobial properties (e.g., chitosan). However, degradable edible films and coatings still represent a niche market due to higher manufacturing costs, difficult processing, and worse mechanical performance of certain (e.g., starch based) materials compared to traditional plastic packaging (Galgano et al., 2015). Like traditional plastics, edible films are suitable for all kinds of perishable foods: fruits, vegetables, and meat. Biodegradable films help food maintain its original appearance, thus making it more appealing to customers (Abdallah et al., 2018). Moreover, benefits of a protective layer made from edible biopolymers may include (1) efficient exchange of gas and moisture, (2) mechanical strength and durability in a range of materials (e.g., galactomannans, chitosan), (3) pleasant sensory qualities for customer appeal, (4) potential improvements in the nutritional value or taste of the coated product, and (5) biodegradability for disposed products.

Polysaccharides are biocompatible and biodegradable carbohydrate polymers that are non-toxic to living organisms, making them suitable for application in food packaging in the form of edible coatings and films (Nešić et al., 2019). In addition, their use can significantly reduce the consumption of conventional fossil-based plastics which cause damage to the environment but are still widely used to this day (Luzi et al., 2019). The main source of polysaccharides currently used for biocoating is the biomass of plants and marine organisms, as extensively discussed in specialized reviews (Hassan et al., 2018; Tabasum et al., 2018; Alizadeh-Sani et al., 2019; Azeredo et al., 2019; Mohamed et al., 2020; Nešić et al., 2019; Ramesh & Tharanathan, 2003; Salehi, 2020). Nevertheless, there is a growing interest in the production of extracellular polysaccharides (EPSs) using microbial fermentation for their film-forming potential. While biotechnological production of microbial polymers (mainly EPSs) offers several advantages compared to the production of plant-derived polysaccharides (Angelina & Vijayendra, 2015; Jindal & Khattar, 2018; Barcelos et al., 2019; Nešić et al., 2019), there are a number of current limitations in their use and cost-effective production (Barcelos et al., 2019). Examples of actual uses of microbial EPSs in edible food coatings, especially studies on their use for garden berries and grapes, are still not numerous. This article aims to discuss the current and prospective uses for microbial EPSs, focusing on their application in biocoatings and films of garden berries and grapes and highlighting the strategies for optimizing the cost-effectiveness of microbial EPS production.

Required Properties, Ingredients and Evaluation Methods of Fruit Coatings

General Characteristics and Composition of Microbial Polymer–Based Fruit Coatings

While the terms "food films" and "food coatings" are often used interchangeably, we refer to the following distinction between the two throughout this review. A "film" is as a thin structure which has been pre-formed by casting a biopolymer solution separately from the product. Thus, the pre-manufactured film can be later used for packaging food (wrapping material, pouches, bags, etc.). In contrast, the "coating" is an unmolded product in the form of suspension or emulsion which is applied directly to the food surface by means of spray-coating, brushing, or dipping before it transforms into a solid film (Souza et al., 2010). Proteins, lipids, and polysaccharides are commonly used as ingredients in edible coatings, with plant cellulose derivatives, chitosan, pectin, (modified) starch, alginate carrageenan, and some plant exudate gums being the main carbohydrate polymers currently in use (Kumar & Neeraj, 2019; Avramescu et al., 2020). The main function of food films and coatings is to control the mass transfer between food and the ambient atmosphere. Depending on the selection of individual biopolymer coating ingredients, different levels of selective permeability and film properties can be achieved (Table 1).

Single biopolymer coatings (polysaccharide, protein, or lipid) often do not provide sufficient properties to be effective edible packaging. Instead, a combination of individual polymer types and the addition of other components are required to achieve greater product protection and market value. Thus, composite biopolymer films have combine the functional properties of individual polymers and overcome their respective flaws (Janjarasskul & Krochta, 2010; Kumar & Neeraj, 2019; Pascall & Lin, 2013). For instance, polysaccharides have good oxygen and carbon dioxide barrier properties but are permeable to moisture. Lipid-based

Table 1 Potentials and requirements for edible coatings and packaging[a]

Potential uses of edible coatings	Produce a modified atmosphere in the fruit Reduce water loss and decay Protect against microbial contamination Delay ripening of climacteric (ethylene related) fruits Delay color changes Improve appearance Reduce aroma loss Reduce exchange of humidity between fruit pieces Carriers of antioxidants and texture enhancers Carriers of volatile precursors Impart color and flavor Carriers of nutraceuticals
Requirements for edible coatings	Food-grade/GRAS (generally recognized as safe) components Stability under high relative humidity Good water vapor barrier Efficient gas (oxygen, carbon dioxide, ethylene) barrier Good mechanical properties Biodegradability Adhesion to the fruit Pleasant in taste/tasteless and colorless Physico-chemical and microbial stability Reasonable cost

[a]Adapted from from Olivas and Barbosa-Cánovas (2005), Janjarasskul and Krochta (2010), and Saklani et al. (2019)

materials, in turn, are great moisture barriers but with poor mechanical properties due to their hydrophobic nature. Proteins are hydrophilic but they possess good mechanical strength (Pascall & Lin, 2013; Nešić et al., 2019). Therefore, control over precise proportions of combined ingredients may ensure satisfactory mechanical strength as well as selective permeability for edible coatings and films. This is particularly important for fruit, berry, and vegetable packaging since the materials used must maintain a certain degree of respiration and cannot be absolutely water, gas, and ethylene-proof (Nešić et al., 2019). The blending of biopolymers with plasticizers (especially polyols like glycerol, sorbitol, propylene glycol, sucrose, fatty acids, polyethylene glycol, and monoglycerides) and emulsifiers/surfactants (such as Tween, spans, fatty acid salts, and lecithins) is also important for modifying the properties (especially increasing mechanical stability) of edible coatings and films. The addition of antioxidants and antimicrobial compounds provides the necessary functional properties of the coating which, in turn, improves the quality, stability, and safety of the food. A wide range of such additives and their applications were summarized in several recent reviews (Senturk Parreidt et al., 2018a; Hassan et al., 2018; Stroescu et al., 2018; Sharma et al., 2019; Hing et al., 2019; Maringgal et al., 2020; Ribeiro et al., 2020).

To ensure that the newly developed food coatings and packaging meet the requirements and are effective in maintaining the quality of fruits and berries (Table 1), a comprehensive evaluation of both physical and functional properties is necessary (Avramescu et al., 2020; Galus et al., 2020; González Sandoval et al., 2019; Krasniewska et al., 2020). Since most physical properties, such as gas permeability and mechanical characteristics, are difficult to measure after coating the products, the evaluation is often performed by testing standalone films under the conditions (humidity, temperature) that are appropriate for product storage (Olivas & Barbosa-Cánovas, 2005; Saklani et al., 2019). The physical properties of novel biopolymer films and coatings depend on the properties of their main ingredients. For multicomponent formulations, the chemical composition and miscibility of all ingredients is crucial and affects the physical properties of most biopolymer materials, as well as the origin/source of the polymers, their structural organization, processing technologies, degree of crystallinity, and crosslinking (Galus et al., 2020).

Evaluation Methods

The most common physical properties measured are water vapor permeability (WVP), oxygen permeability (OP) and mechanical resistance (tensile strength, Young's modulus and elongation at break). The tensile strength (TS) describes the maximum stress (force/cross-sectional area) required to break the film, the elongation at break (EB) quantifies the degree (%) to which the film specimen can be stretched before breaking, and the elasticity or Young's modulus (EM or YM) as the stiffness index which indicates the resistance of the material towards elastic deformation (Janjarasskul & Krochta, 2010). These characteristics were universally used in studies on the development of edible films, their numerical values for different formulations under varied external conditions and the methods used for measurements have been summarized in

several reviews (Aguirre-Joya et al., 2018; Cazon et al., 2017; Galus et al., 2020; Senturk Parreidt et al., 2018a, b; Wang et al., 2019). The standard measurement methods according the ASTM (American Society for Testing and Materials) protocols are mainly used for these purposes (Cazon et al., 2017; Janjarasskul & Krochta, 2010; Ramos et al., 2013; Siracusa et al., 2008; Wang et al., 2019). It is also important to assess, especially in the case of fruits and berries, the barrier functions of edible coatings in terms of moisture and gas (oxygen, carbon dioxide) permeability, as these parameters have a significant impact on water loss, respiration, and the internal atmosphere of fruits and thus on their shelf life (Tahir et al., 2019; Maringgal et al., 2020; Nešić et al., 2019). Like the mechanical properties, these parameters are evaluated in most experimental studies and the relevant data are summarized in several reviews (Cazon et al., 2017; Galus et al., 2020; Lacroix & Le Tien, 2005; Senturk Parreidt et al., 2018a, b; Sharma et al., 2019). Methods for determining the permeability of food films based on gravimetric, manometric, volumetric, or optical measurements of water vapor or gas flows have been comprehensively summarized described and evaluated in specialized reviews by Fereydoon and Ebnesajjad (2013), Müller et al. (2017).

In addition to the barrier functions and mechanical properties, there are some other important characteristics of edible films that are often used for their evaluation and selection in relevant studies, such as thickness, solubility, wettability, sorption isotherms, color, flavor, and microbiological stability (González Sandoval et al., 2019; Olivas & Barbosa-Cánovas, 2005). After an appropriate selection by testing the film alone, the performance and effectiveness of the edible coating/packaging of choice should be evaluated according to its effect on the product quality and customer appeal (Table 1). Given the fact that the edible coatings solidify after application to the product, the effect of fruit shape and texture on the formation and final properties of the film may differ from the properties of standalone film. In the case of fresh or minimally processed fruits or berries, the following parameters should be considered: oxygen and carbon dioxide concentrations, water loss, evolution of organic volatiles (ethanol, ethylene and acetate esters), changes in titratable acidity, color and texture changes, microbial growth, soluble solids, and sensory properties. It is generally acknowledged that these parameters can demonstrate the effects of the selected composite formulations and advise the composition of edible coatings (Avramescu et al., 2020; Guerreiro, 2015; Kumar & Sethi, 2018; Olivas & Barbosa-Cánovas, 2005). A wide range of measurement methods are used for this purpose, many of which represent the official AOAC (Association of Official Analytical Chemists) methods. A considerable number of recent studies have reported on the efficacy of various edible coatings when measuring overall quality parameters of coated fruit which have been thoroughly summarized and discussed in a specialized review by de Souza et al. (2019). It is well known that microbial polysaccharides are tasteless, odorless, and colorless (Nešić et al., 2019; Shit & Shah, 2014; Widyaningrum & Meindrawan, 2020), so the coatings formed from them do not directly affect, positively or negatively, the sensory characteristics of the fruit during storage, strongly confirmed by evaluations of relevant changes in appearance, odor, taste, color, texture, and overall acceptance (de Souza et al., 2019). However, if coatings contain ingredients with pronounced sensory properties such as geraniol (G) or pomegranate extract (PE) in addition to bacterial EPS such as gellan, an appropriate in-depth assessment (e.g., sweetness, acidity, odor) of both the coating composition and coated fruit will help to avoid undesirable deviations in product properties such as strawberries (Tomadoni et al., 2018).

Production of Extracellular Polysaccharides by Microbial Biosynthesis

Process Benefits

Polysaccharides and bioactive compounds from plants and animals (beeswax, propolis) are widely used in edible coating or film production. Microbial exopolysaccharides (EPSs) further extend the range of prospective ingredients for edible coatings and packaging and may be combined with bioactive components of plant or animal origin (Table 2). Microbial EPS also offer several advantages. First, microbial EPS synthesis can be genetically engineered to provide metabolic products with desired properties and functionality (Nielsen & Keasling, 2016). Second, EPSs are also easier to produce on an industrial scale because the growth of microorganisms does not depend on regional and climatic conditions or marine pollution, and microorganisms exhibit a fast growth rate compared to plant biomass. In addition, EPSs are secreted in the external environment, thus facilitating the recovery of the final product and the use of industrial and agricultural waste as a fermentation substrate (Angelina & Vijayendra, 2015; Barcelos et al., 2019; Nešić et al., 2019). Both eukaryotic and prokaryotic microorganisms produce a diverse range of structural and functional polysaccharides, which may be homopolymers or heteropolymers. Homopolymeric EPS molecules consist of repeating monosaccharide units, mostly glucose or fructose, whereas heteropolysaccharides are usually branched and composed of units of several different monosaccharides, mainly galactose, glucose, fructose, etc., as well as other carbohydrate groups (Mohite et al., 2017; Tiwari et al., 2020). EPS biosynthesis can occur through different mechanisms and is influenced by a variety of environmental factors, but the general biotechnological route of production is similar for different organisms and types of exopolysaccharides (Fig. 1).

Table 2 Advantages and challenges in utilization of microbial EPS or plant/animal substances for edible films and coatings of small berry fruits

Edible microbial EPS coatings	Edible coatings of plant and animal origin
Advantages: • Microbial EPS coatings offer good physical barrier properties and expected positive effects on fruit shelf-life similar to plant-derived polymers, bee-wax or propolis. • Given the variability and fruit-specific post-harvest storage properties of traditional coatings from plant and animal origin, microbial EPS holds the potential to offer an extended range of edible polymer coatings for wider variety of small berry fruits. • Biological engineering and manipulation of the EPS composition in microbes is comparatively easier and faster than plants or animals to develop previously defined fruit-specific coating properties. • Possibilities to use renewable substrates and food-industry by-products for microbial EPS biosynthesis. • Microbial EPS may be optimized to function as a scaffold or carrier of active antimicrobial components or additional nutraceuticals in edible coatings. Challenges in future use: • Need for efficient multifactorial screening (RSM methods) of novel EPS compositions and microbial cultivation strategies. • Future studies required to evaluate the combined effects of microbial EPS coatings and active plant antimicrobial components on physical and biological protection of small berry fruits.	Advantages: • Propolis and wax coating have increased sensory acceptability and decreased decay of certain small berry fruits (strawberries and raspberries) and additional positive effect on firmness, chilling injury resistance, soluble solids concentration & nutritional content (ascorbic acid, phenolics, antioxidants) in larger fruits such as papaya, mango, oranges, and cucumber (Kahramanoglu et al., 2020; El-Badway et al., 2012). • Plant-derived extracts and essential oils may serve as antimicrobial additives to the microbial EPS coatings and alternatives to synthetic pesticides (Palou et al., 2015). Challenges in current use: • The positive effects on post-harvest storage and product quality appear to be species-specific (Kahramanoglu et al., 2020). More research needed on applicability to wide diversity of small berries. • Preservation of synthetic fungicide residuals when applied together with wax coatings. • Little research on the molecular mechanisms of antimicrobial effects of plant extracts within edible coatings: direct antimicrobial toxicity or stimulation of plant defense responses within the fruit. • More research needed on the effects of active ingredients of edible antimicrobial coatings on human gut microbiome and nutrient uptake by consumer.

Implementation of EPS Biosynthesis and Optimization Possibilities

The biosynthesis of EPSs can be divided into three main stages, namely carbon substrate assimilation, intracellular polysaccharide synthesis, and polymer release from cells (Becker, 2015). The assimilation of a carbon substrate depends on composition of the medium (carbon and nitrogen content, sources of micronutrients and their concentrations), as well as on the operational (bioreactor type and mode of operation) and culture conditions (temperature, pH, agitation rate, aeration rate, growth phase) (Ahmad et al., 2014; Barcelos et al., 2019; Mohite et al., 2017; Tiwari et al., 2020). Notably, the magnitude and direction of these effects are highly strain-specific and have significant effect on the yield and characteristics of

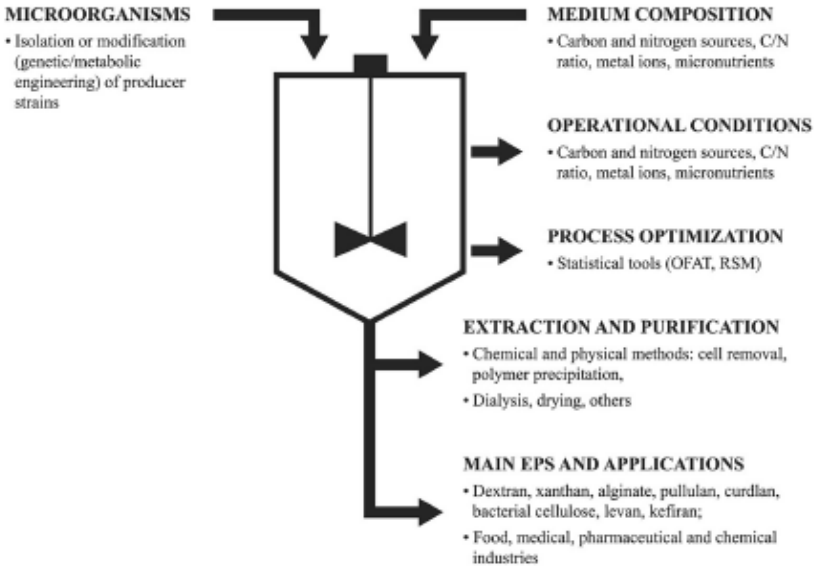


Fig. 1 General production scheme of the microbial exopolysaccharide (EPS) biotechnological production. Adapted from Barcelos et al. (2019)

EPS produced. Therefore, it is necessary to find and define the most appropriate cultivation conditions for each producer strain (Devi & Alamu, 2013; Nwodo et al., 2012; Olivas & Barbosa-Cánovas, 2005; Semjonovs et al., 2017). EPS can be produced by four different pathways: (1) the Wzx/Wzy-dependent pathway, (2) the ATP-binding cassette (ABC) carrier-dependent pathway, (3) the synthase-dependent pathway, and (4) extracellular synthesis using a single sucrase protein (Tiwari et al., 2020; Whitfield et al., 2020). A number of generalized features and conditions have been proposed to promote EPS biosynthesis. These include increased C/N ratio in the medium (about 10:1), below optimal cell growth temperature, harvest during the early stationary growth phase for maximum product yield, and positive effects of some cell stressors (e.g., the presence of heavy metal ions) (Barcelos et al., 2019; Kumar et al., 2007; Lule et al., 2016; Mohite et al., 2017; Onilude et al., 2013; Zikmanis et al., 2020a, b). Nevertheless, optimal cultivation conditions have not yet been sufficiently defined for most EPS producing strains, and due to the diversity of EPS synthesis pathways, the process optimization should be performed to maximize the yield of EPS for each selected producer strain. Optimization techniques, such as response surface methodology (RSM), should be considered as a favorable, more powerful, and convenient strategy compared to one-factor-at-a-time (OFAT) technique. RSM allows simultaneous selection of a wide range of relevant factors and determination of their optimal levels for EPS production (Kolesovs & Semjonovs, 2020; Semjonovs et al., 2017; Zikmanis et al., 2020a, b).

In order to enhance the production of microbial EPSs and make it more cost-efficient, it is important not only to search for efficient producers and optimize their cultivation conditions (Barcelos et al., 2019; Sengupta et al., 2018), but also to evaluate the use of untraditional and renewable substrates. The main factor responsible for the high biotechnological production expenses is the cost of substrate and downstream processing. For example, raw materials account for at least 40–50% of the total production costs, whereas a carbon source contributes to 70–80% of the total expenses (Gahlawat & Srivastava, 2017). As a result, various by-products and waste products from agriculture and food industry (Arancon et al., 2013; Sadh et al., 2018; Tsang et al., 2019; Zikmanis et al., 2020a) are utilized as a low-cost and environmentally friendly carbon and nitrogen source alternative for microbial growth and polymer production. It is also essential to continuously improve downstream processing procedures (Fig. 1) which include a variety of techniques for precipitation and purification of synthesized EPSs (Barcelos et al., 2019; Kambourova et al., 2015; Roca et al., 2015). Such improvements will contribute to economically feasible production of microbial EPSs in the future (Kambourova et al., 2015).

Microbial Extracellular Polysaccharides in Berry Edible Coatings

Currently Used Polysaccharides

Formulations which contain polysaccharides are well suited for edible coatings to extend the shelf life and preserve the quality of garden berries and grapes (Maringgal et al., 2020; De Souza et al., 2019; Nair et al., 2020). Strawberry (*Fragaria* spp.) is used as a model in several studies (Gaston et al., 2020; Liston et al., 2014) to assess of the properties of different components in edible fruit coatings/packaging (Baicu & Popa, 2018; Niu et al., 2019; Shao et al., 2018). However, the range of different berry species as well as EPSs, especially microbial EPS, used for producing edible coatings remains limited (Table 3).

Pullulan Pullulan is the most widely used polysaccharide (Table 3). It is a homopolysaccharide synthesized by the yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* and consists of maltotriose units connected to each other by an α-(1,6)-glycosidic bond and is capable of forming edible films with several advantages over other polysaccharides. Pullulan is considered a relatively expensive EPS. Therefore, it is necessary to use a wide variety of alternative and renewable carbon/nitrogen sources to produce pullulan in more cost-effective manner (Barcelos et al., 2019; Zikmanis et al., 2020a). In addition to their low caloric value, pullulan films are tasteless, colorless, oil-resistant, and heat-sealable, have low oxygen permeability, and can change their mechanical and gas barrier properties in a controlled way when blended with other biopolymers and plasticizers (Barcelos et al., 2019; Diab et al., 2001; Niu et al., 2019). The film-forming solutions of edible coatings are quite variable, ranging from pure pullulan in distilled water (Li et al., 2017) to mixtures that contain plasticizers (glycerol, sorbitol), other biopolymers (chitosan, gelatin), their derivatives (carboxymethyl cellulose), and antimicrobial compounds (Shao et al., 2018; Treviño-Garza et al., 2015; Zhang et al., 2014). Thus, a targeted and comparative study showed (Li et al., 2017) that the efficacy of pullulan as an edible coating for strawberries is quite comparable to that of alginate, widely used in the field (Nair et al., 2020; Shit & Shah, 2014), although it lags behind chitosan, which is also well-known in this regard (Radev & Pashova, 2020; Shit & Shah, 2014).

It should be noted that several pullulan esters (acetate, propionate, butyrate), which are obtained by reacting the polysaccharide with the corresponding acid anhydrides, can also be useful (especially butyrate). As edible coatings for strawberries, they outperform the non-derivative EPSs (Niu et al., 2019). Pullulan has also been used as a basic component in a multi-component system of edible coating

Table 3 Usage of microbial polysaccharides in garden berry and grape coatings

Microbial polysaccharide used (monomers to form)	Coated berries	Coating formulation	References
Xanthan (glucose, mannose, and glucuronate)	Strawberries	XA (3 g/L), beeswax, propylene glycol	Zambrano-Zaragoza et al. (2020)
		XA (0.5%), glycerol, oleic acid, $CaCl_2$	Leite et al. (2015)
	Grapes	XA (100 g/L), glycerol, Tween-20, citric acid and ascorbic acids	Golly et al. (2019)
		XA (0.3%),olive oil, gallic, ferulic, ascorbic acids	Baraiya et al. (2016)
	Blueberries	XA (0.3%)	Totad et al. (2019)
Pullulan (glucose)	Strawberries	PL (150 g/L), carboxymethyl cellulose, tea phenols	Shao et al. (2018)
		PL (6.5%); distilled water	Li et al. (2017)
		PL (65 g/L), glycerol, Na-benzoate, K-sorbate	Trevino-Garza et al. (2015)
		PL (80–100 g/L), glycerol, Tween-80	Eroglu et al. (2014)
		PL (25 g/L), gelatin, chitosan, acetic acid	Zhang et al. (2014)
		PL (50 g/L),sorbitol, sucrose fatty acid ester	Diab et al. (2001)
	Blueberries	PL (10 g/L), glycerol (10 g/L), propolis EtOH extract (50 or 100 g/L)	Pobiega et al. (2020)
	Grapes	PL (1.5%), essential oils (o-cymene, thymol, γ-terpinene in PVA nanocapsules)	Piña-Barrera et al. (2019)
Pullulan esters acetate, propionate or butyrate	Strawberries	PLAc, PLPr, or PLBu (15 g/L), ethyl acetate	Niu et al. (2019)
Gellan (glucose, rhamnose, and glucuronate)	Strawberries	GE (0.5%), glycerol, geraniol, pomegranate extract	Tomadoni et al. (2018)
Bacterial cellulose (glucose)	Strawberries	BC nanofibers (0.5–1%), okra (*Abelmoschus esculentus*) fruit mucilage, *Eryngium planum* extract	Shahbazi et al. (2020)
Dextran (glucose)	Strawberries Blueberries	DE (2–5%), glycerol, pectin, polysorbate	Moncayo-Martinez (2013)

for grapes which includes polyvinyl alcohol nanocapsules loaded with spice plant (*Thymus vulgaris* L.) and essential oils (EO) containing o-cymene, thymol, and γ-terpinene. Such a composition provides strong antibacterial, antifungal, and antioxidant activities and preserves the quality of stored grapes for a longer time than without treatment (Pina-Barrera et al., 2019). Likewise, a pullulan coating combined with an ethanol extract of bee propolis delayed the ripening and weight loss, reduced the microbial contamination, and extended the shelf life of blueberries (Pobiega et al., 2020).

Xanthan The heteropolymer xanthan has also been used in edible coatings on both garden berries and grapes (Table 3). This industrially important EPS is produced by phytopathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas* (mainly *X. campestris* pv. *campestris*) from different monomers (glucose, mannose, and glucuronic acid with acetate or pyruvate group) and has gained wide recognition due to its excellent solubility, rheological properties, and stability over a wide range of external conditions (Sengupta et al., 2018). Like pullulan (Li et al., 2017), xanthan alone has been used as an edible coating not only for strawberries but also for blueberries, extending the shelf life of the coated product. A targeted study comparing xanthan with other compounds as edible coatings for blueberries (Totad et al., 2019) found a significant advantage of this exopolysaccharide over the plant origin guar gum and gum Arabic, which are substantial ingredients in related fruit coatings (Shit & Shah, 2014; Salehi, 2020; Saleem et al., 2020). Although it remains slightly behind to synthetic carboxymethyl cellulose, which also is often used in edible coatings for fruits and vegetables (Panahirad et al., 2021), xanthan not only reduced water loss and retained fruit firmness, but also maintained levels of ascorbic acid, antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content (Totad et al., 2019). The gel-like and film-forming properties of xanthan can be improved by adding a lipid component to the mixture (Baraiya et al., 2016). Thus, oleic acid or peppermint EO (Leite et al., 2015) or bee wax lipid nanoparticles (Zambrano-Zaragoza et al., 2020) were included in the strawberry coating along with xanthan and plasticizers (glycerol and propylene glycol, respectively). Bee wax contains a complex mixture of hydrocarbons, free

fatty acids, fatty alcohols, and saturated and unsaturated linear and complex mono-esters. Beeswax particle addition to xanthan proved to be effective for increasing strawberry shelf life when refrigerated. The mixture of xanthan, antioxidants (ascorbic acid, gallic, ferulic acids), plasticizer (glycerol), and olive oil also forms an edible coating for grapes which enhanced their nutritional value and extended shelf life up to 24 days (Baraiya et al., 2016). The use of surfactants (Tween 20) instead of oil provided almost the same shelf life for grapes coated with xanthan that is enriched with ascorbic acid and citric acid (Golly et al., 2019). In addition to pullulan and xanthan, other microbial EPSs — gellan, bacterial cellulose, and dextran — also possess the properties required for production of edible food coatings/packaging. Hitherto, their use in vegetable coating or other products has been more widespread than applications to edible coatings in garden berries or grapes (Alizadeh-Sani et al., 2019; Azeredo et al., 2019, b; Zikmanis et al., 2020a).

Gellan Gellan, like xanthan, is an extracellular heteropolysaccharide produced by bacteria of the genus *Sphingomonas*. It consists of repeating tetrasaccharide units, each containing two residues of glucose, one of rhamnose, and one of glucuronic acid, the hydroxyl groups of which in the native gellan are partially esterified with acyl (glycerate and acetate) substituents. Gellan is soluble in water, is insoluble in ethanol, and possesses excellent colloidal and gelling properties, so it has a good film-forming capacity. While gellan including coatings have been applied to various fruits and vegetables, it has rarely been used for garden berries or grapes. However, it has been reported that the edible coating for strawberries, consisting of gellan with glycerol as a plasticizer and enriched with natural antimicrobials (particularly geraniol), significantly reduced microbial counts (mesophilic and psychrophilic bacteria, yeasts and molds), thus improving the microbiological stability of berries compared to untreated sample (Tomadoni et al., 2018). Besides the pathogen protection, gellan-containing coating did not demonstrate any other beneficial effects on berry storage.

Bacterial Cellulose and Dextran The situation is similar for two extracellular homopolysaccharides, bacterial cellulose (BC) and dextran, which are synthesized from glucose. BC is a D-glucose polymer composed mainly of β-(1,4)-glycosidic bonds, and its main producers are acetic acid bacteria of the genus *Komagataeibacter*. It also possesses exclusive structural, mechanical, and functional properties and has gained considerable attention in the biomedicine and food industries. Particularly important and prospective is the increasing use of BC in biocomposites. As with other EPSs, microbiological synthesis of BC is very expensive and alternatives are being sought to obtain economically viable culture media that will promote production and develop more applications for BC. Although there are a number of studies in which BC or its composites are involved in the formulations of edible coatings/packaging for various foods (Azeredo et al., 2019), only one of them is being tested for garden berries (Shahbazi et al., 2020). BC nanofibers together with okra (*Abelmoschus esculentus*) fruit mucilage, quince seed mucilage, and *Eryngium planum* extract (Shahbazi et al., 2020) can form an edible coating for strawberries, which provides good antimicrobial protection, preservation of physicochemical properties, and sensory attributes in line with data on the positive effects of BC nanofibers on the diverse properties of coatings for other products (Shahbazi et al., 2020). Dextran is also an extracellular homopolymer of glucose, but with a different structure characterized by α-(1,6) linkages in the main chain and a variable amount of α-(1,2), α-(1,3), and α-(1, 4) branched linkages, and it is synthesized from sucrose by several bacterial genera among which *Leuconostoc* spp. are the industrially important producers (Zikmanis et al., 2020a, b). Dextran is not only a biocompatible and biodegradable, but also a water-soluble polymer which has versatile potential for commercial use, mainly in the food and medical fields. However, only a few studies to date have considered the film forming potential and use of dextran in edible coatings (Davidović et al., 2018; Lakshmi Bhavani & Nisha, 2010; Moncayo-Martínez, 2013; Quezada Gallo et al., 2005). Dextran film has been reported to protect various foods from oxidation and other unwanted changes (Lakshmi Bhavani & Nisha, 2010) Dextran-based films, plasticized by sorbitol in an optimized ratio, can be potentially used as an edible food packaging material (Davidović et al., 2018). Dextran plasticized with glycerol has been shown to form effective edible coatings for fruits such as guavas and apricots (Quezada Gallo et al., 2005), which provide better protection than other polymers (potato starch, alginate, xanthan, carboxy methylcellulose). The formulation of dextran, pectin, polysorbate, and glycerol as a plasticizer has significantly extended the shelf life of garden berries, strawberries, and blueberries and preserved their physicochemical, textural, and sensory properties and microbiological quality (Moncayo-Martinez, 2013).

Promising Polysaccharides

It is obvious that currently not all microbial exopolysaccharides, even those considered commercially and industrially important, are used in formulations of edible coatings (Mohite et al., 2017; Sengupta et al., 2018). Moreover, it should be noted that among them, there are compounds that fully meet the requirements (Table 1) for edible coatings, including the film-forming ability. Such EPSs include levan, curdlan, kefiran, and alginate synthesized by bacteria.

Levan Levan is a homopolysaccharide formed from sucrose by polymerization of D-fructosyl units with β-2.6 linkages in linear chains and β-2,1 linkages at branching points. Its extracellular synthesis can be performed by bacteria from many genera (*Halomonas*, *Bacillus*, *Zymomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*) and thus considered to be the most widely represented and important bacterial fructan (Combie & Öner, 2018; Tomulescu et al., 2016; Zikmanis et al., 2020b). Levan is characterized by a unique combination of properties, in which its adhesivity is particularly important, as it opens wide prospects in both the biomedical and technical fields (Combie & Öner, 2018). The adhesive properties of levan are essential for the film-forming ability, although plasticizers are needed to mitigate the brittleness of the levan film itself (Chen et al., 2014). Thus, blending levan with a plasticizer such as glycerol can form flexible and extrudable films (Barone & Medynets, 2007; Kwon et al., 2018). Nanocomposites with improved thermal and mechanical properties consisting of montmorillonite clay blended with levan can also be obtained (Chen et al., 2014). Similarly, edible films were produced by a casting procedure using aqueous solutions of levan, cassava starch, and glycerol as the plasticizer (Mantovan et al., 2018). However, levan films suitable for food coatings and packaging materials can also be prepared without such plasticizers using aqueous solutions of levan with the optimal proportion of cornstarch as the filler (Huber et al., 1994). It is also possible to create more complex ternary blend films, such as those consisting of levan, chitosan, and polyethylene oxide, suggested for active food packaging or biomedical applications (Bostan et al., 2014).

Curdlan In recent years, the abilities of curdlan have also been repeatedly tested. It is an extracellular polysaccharide with a linear structure composed of β-(1,3)-linked glucose residues, produced under nitrogen-limiting conditions by the non-pathogenic strains of *Agrobacterium* and *Alcaligenes* spp. Although directly insoluble in water or ethanol, it can be dissolved in alkaline solutions and has thermo-induced gelling properties that also promote film formation, especially when blended with other polymers. Thus, novel fish gelatin/curdlan blended films with different proportions of ingredients and good mechanical and barrier properties were developed. This suggests that these films might become a prospective packaging material (Ahmad et al., 2015). Similarly, films that meet food-packaging requirements are obtained by mixing xanthan and curdlan which also improves their overall water solubility (Mohsin et al., 2020). Packaging films with suitable mechanical and barrier properties can also be formed using curdlan and caprolactam as ingredients, although the latter is not considered to be a food-grade polymer (Zhu et al., 2021). It has also been shown that ternary composite formulations, such as chitosan/curdlan/carboxymethyl cellulose (Wang et al., 2019) and curdlan/polyvinyl alcohol/thyme essential oil (Zhang et al., 2020) biodegradable packaging films, can be employed for the preservation of perishable foods.

Kefiran Edible films and coatings with a wide range of required properties can be developed if kefiran is included in the composition. This water-soluble EPS is separated from the kefir grains and produced by a consortium of lactic acid bacteria, mainly *Lactobacillus* spp. and yeast (Tan et al., 2020). Kefiran is a heteropolysaccharide consisting of hexa- or heptasaccharide repeating units with approximately equal amounts of glucose and galactose and variations in both the α- and β-configurations and the glycosidic linkages (Ghasemlou et al., 2011; Piermaria et al., 2011). Such structural diversity ensures that kefiran is well compatible with other ingredients (proteins, lipids, other polysaccharides) and plasticizers (polyols, sugars) in the formation of edible film composites and thus provides a wide range of possibilities to modify their properties and adapt to the requirements for different foods (Marangoni Junior et al., 2020; Tan et al., 2020).

Alginates Alginates and the possibility of their use as edible films are a somewhat specific case and deserve a more detailed consideration. These are heteropolysaccharides made of unbranched, linear binary copolymers of β-D-mannuronic acid (M) and α-L-guluronic acid (G) residues linked by (1–4) glycosidic linkages (Senturk Parreidt et al., 2018a, b) and commonly produced by and refined from various genera of brown algae. However, their microbiological production by several *Azotobacter* and *Pseudomonas* species has also become increasingly important, including the use of renewable resources (Senturk Parreidt et al., 2018a, b; Urtuvia et al., 2017; Zikmanis et al., 2020a, b). Due to very good rheological properties, alginates are widely used in the development of edible films and coatings, including fruits, garden berries, and grapes (De Souza et al., 2019; Maringgal et al., 2020; Nair et al., 2020; Salehi, 2020; Sharma et al., 2019). However, it should be noted that only algal-derived polysaccharides (but not bacterial ones) were used in such studies. The point is that alginates of algae and bacterial origin cannot be considered interchangeable due to significant differences in the structure and hence in the properties of both polymers. Thus, alginates of bacterial origin can be characterized by a lower proportion of guluronates (G) leading to higher M/G ratio as well as higher levels of acetylated mannouronate (M) residues (Senturk Parreidt et al., 2018a, b), which significantly affect their rheology. In other words, if a different source of alginates is used, it may be necessary to change both the composition of the coating and the object that is going to be coated.

Specifics of Fruit Coatings

Garden berries and grapes, as one of the most highly consumed perishable fruits, require special attention when developing new materials for edible coatings (Avramescu et al., 2020). Given the fact that different coatings have different effects on the quality of coated fruits/berries, the choice of coating ingredients (microbial EPSs, their combinations and additives) depends on both the physiological properties of the fruit, such as transpiration and respiration rates after harvesting, and the intended berry storage conditions. The coatings developed for one fruit variety may not be appropriate for another, as each is characterized by different gas diffusion and respiration rates, skin resistance, and other features (Park, 1999; Hagenmaier, 2005; Olivas et al. 2008). The differences in coating thickness, application technique, as well as storage conditions have significant effect on coating properties (Banks et al., 1993). Therefore, due to highly specific features of both EPS microbial synthesis and edible coatings, functionality targeted comparative studies (Li et al., 2017; Totad et al., 2019) are further required to obtain technologically and economically viable solutions to extend the shelf life of garden berries and grapes as well as objectively choose the most promising of them. In addition, this creates the basis for a technical and economic assessment, including the risk–benefit analysis of the proposed coatings and technologies for their production, which is absolutely required when scaling bioprocesses up to an industrial level (Crater & Lievense, 2018). The development of novel coating and film compositions is complex and requires careful choice of EPS coating ingredients, as demonstrated by prospective use of alginates (de Souza et al., 2019; Nair et al., 2020; Salehi, 2020). Besides, an additional research is needed to characterize and evaluate the properties of novel microbial EPSs such as levan, curdlan, kefiran, or bacterial alginate. Furthermore, any large-scale use of novel microbial EPSs requires more environmentally friendly and cost-effective production techniques to make this an economically viable alternative to plant origin polysaccharides.

Conclusions

The use of edible films and coatings is a rapidly developing method of food storage with attractive prospects to effectively maintain the qualities and extend the shelf time for garden berries and grapes.

Carbohydrate polymers are very important components for such protective coatings since they provide physical barrier to unwanted biogenic contaminants while maintaining desirable properties such as selective permeability to oxygen and carbon dioxide which provides the required level of fruit respiration. Additional modification of polysaccharide properties can be achieved by adding other bio-based compounds, such as lipids, proteins, and functional additives.

Unlike plant polysaccharides, which are widely known and thoroughly researched, the use of microbial extracellular polysaccharides (EPSs) remains very limited, especially for films and coatings of garden berries and grapes, mainly due to the expensive raw materials and high production costs associated with microbiological fermentation.

The current limitations in this area can be overcome by using by-products and wastes of the agro-industrial complex as renewable sources of carbon and nitrogen in fermentation media formulations, as well as by extensive optimization of operational and process conditions at all stages of EPS production.

Targeted and well-designed comparative studies need to be further developed to obtain both technologically and economically viable EPS-based edible coatings for garden berries and grapes.

The limited range of EPS already used in edible films and coatings for garden berries and grapes can be extended to other polysaccharides, such as levan, curdlan, kefiran, or bacterial alginate, which possess comparable film-forming and other functionally important properties.

Funding This study was supported by the Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia (grant number 19–00-A01612-000004).

Availability of Data and Material The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the first author on reasonable request and/or are freely accessible via the Internet.

Declarations

Competing Interests The authors declare no competing interests.

References

Abdallah, M. R., Mohamed, M. A., Mohamed, H., & Emara, T. M. (2018). Application of alginate and gelatin-based edible coating materials as alternatives to traditional coating for improving the quality of pastirma. *Food Science and Biotechnology.*, *27*, 1589–1597. https://doi.org/10.1007/s10068-018-0393-2

Aguirre-Joya, J., De Leon-Zapata, M. A., Alvarez-Perez, O. B., Torres-León, C., Nieto-Oropeza, D. E., Ventura-Sobrevila, J. M., et al. (2018). Basic and applied concepts of edible packaging for foods. In: A.M.Grumezesku & A.M.Holban (Eds.), *Food packaging and preservation* (pp. 1–61). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00001-4

Ahmad, M., Nirmal, N. P., & Chuprom, J. (2015). Blend film based on fish gelatine/curdlan for packaging applications: spectral, microstructural and thermal characteristics. *RSC Advances*, *5*(120), 99044–99057. https://doi.org/10.1039/C5RA20925K

Ahmad, N. H., Mustafa, S., & Che Man, Y. B. (2014). Microbial polysaccharides and their modification approaches: a review. *International Journal of Food Properties, 18*(2), 332–347. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.693561

Angelina, & Vijayendra, S. V. N. (2015). Microbial biopolymers: the exopolysaccharides. In: V. Kalia (Ed.), *Microbial factories* (pp. 113–125). New Delhi: Springer.

Alizadeh-Sani, M., Ehsani, A., Moghaddas, K. E., & Khezerlou, A. (2019). Microbial gums: introducing a novel functional component of edible coatings and packaging. *Applied Microbiology and Biotechnology, 103*(17), 6853–6866. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09966-x

Arancon, R. A. D., Lin, C. S. K., Chan, K. M., Kwan, T. H., & Luque, R. (2013). Advances on waste valorization: new horizons for a more sustainable society. *Energy Science & Engineering, 1*(2), 53–71. https://doi.org/10.1002/ese3.9

Avramescu, S. M., Butean, C., Popa, C. V., Ortan, A., Moraru, I., & Temocico, G. (2020). Edible and functionalized films/coatings—performances and perspectives. *Coatings, 10*(7), 687. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.693561

Azeredo, M. C., Barud, H., Farinas, C. S., Vasconcellos, V. M., & Claro, A. M. (2019). Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems, 3*, 7. https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007

Baicu, A. A., & Popa, M. E. (2018). Trends in prolonging the post-harwest life of strawberries – a review. *Food Technology, 42*(1), 9–16.

Banks, N. H., Dadzie, B. K., & Cleland, D. J. (1993). Reducing gas exchange of fruits with surface coatings. *Postharvest Biology and Technology, 3*(3), 269–284.

Barcelos, M. C. S., Vespermann, K. A. C., Pelissari, F. M. & Molina, G. (2019). Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60*(9), 1475– 1495. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1575791

Barone, J. R., & Medynets, M. (2007). Thermally processed levan polymers. *Carbohydrate Polymers, 69*(3), 554–561. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.01.017

Baraiya, N. S., Ramana, R. T. V., & Thakkar, V. R. (2016). composite coating as a carrier of antioxidants improves the post-harvest shelf life and quality of table grapes (*Vitis vinifera* l. var. Thompson seedless). *Journal of Agricultural Science and Technology, 18*(1), 93–107.

Becker, A. (2015). Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Frontiers in Microbiology, 6*, 687. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00687

Bostan, M. S., Mutlu, E. C., Kazak, H., Keskin, S., Öner, E. T., & Eroglu, M. S. (2014). Comprehensive characterization of chitosan/PEO/levan ternary blend films. *Carbohydrate Polymers, 102*, 993–1000. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.096

Cazon, P., Velazquez, G., Ramirez, J. A., & Vazquez, M. (2017). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids, 68*, 136–148. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009

Chen, X., Gao, H., & Ploehn, H. J. (2014). Montmorillonite-levan nanocomposites with improved thermal and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers, 101*, 565–573. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.073

Combie, J., & Öner, E. T. (2018). From healing wounds to resorbable electronics, levan can fill bioadhesive roles in scores of markets. *Bioinspiration & Biomimetics, 14*, 011001. https://doi.org/10.1088/11748-319

Crater, J. S., & Lievense, J. C. (2018). Scale-up of industrial microbial processes. *FEMS microbiology letters, 365*(13), fny138. https://doi.org/10.1093/femsle/fny138

Davidović, S., Miljković, M., Tomić, M., Gordić, M., Nešić, A., & Dimitrijević, S. (2018). Response surface methodology for optimisation of edible coatings based on dextran from Leuconostoc mesenteroides T3. *Carbohydrate Polymers, 184*, 207–213. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.061

De Souza, E. L., Lundgren, G. A., Oliveira, K. Á. R., Berger, L. R. R., & Magnani, M. (2019). An analysis of the published literature on the effects of edible coatings formed by polysaccharides and essential oils on postharvest microbial control and overall quality of fruit. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18*(6), 1947–1967. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12498

Devi, G. K., & Alamu, A. (2013). Production of biopolymer levan by *Bacillus subtilis* using non-ionic surfactants. *Asian Journal of Pharmacy and Technology, 3*(4), 149–154.

Dhaka, R., & Upadhyay, A. (2018). Edible films and coatings: a brief overview. *The Pharma Innovation, 7*(7), 331–333.

Diab, T., Biliaderis, C. G., Gerasopoulos, D., & Sfakiotakis, E. (2001). Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. *The Journal of the Science of Food and Agriculture, 81*(10), 988–1000. https://doi.org/10.1002/jsfa.883

El-Badawy, H. E. M., Baiea, M. H. M., Eman, A. A., & El-Moneim, A. (2012). Efficacy of propolis and wax coatings in improving fruit quality of 'Washington' navel orange under cold storage. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 8*(5), 420–428.

El-Ramady, H. R., Domokos-Szabolcsy, E., Abdalla, N. A., Taha, H. S. & Fári, M. (2015). Postharvest management of fruits and vegetables storage, In: E. Lichtfouse (Eds.), *Sustainable Agriculture Reviews* Volume 15 (pp. 65–152). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09132-7_2

Eroglu, E., Torun, M., Dincer, C., & Topuz, A. (2014). Influence of pullulan-based edible coating on some quality properties of strawberry during cold storage. *Packaging Technology and Science, 27*(10), 831–838. https://doi.org/10.1002/pts.2077

Fereydoon, M., & Ebnesajjad, S. (2013). Development of high barrier films for food packaging. In S. Ebnesajjad (Ed.), *Plastic films in food packaging* (pp. 671–692). Elsevier.

Gahlawat, G., & Srivastava, A. K. (2017). Model-based nutrient feeding strategies for the increased production of polyhydroxybutyrate (PHB) by Alcaligenes latus. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 183*(2), 530–542. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2482-8

Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A., & Yarmand, M. S. (2011). Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. *Food Chemistry, 127*(4), 1496–1502.

Galgano, F., Condelli, N., Favati, F., Di Bianco V., Perretti G., & Caruso M. C. (2015). Biodegradable packaging and edible coating for fresh-cut fruits and vegetables. *Italian Journal of Food Science, 27*, 1–20. https://doi.org/10.14674/1120-1770%2Fijfs.v27i1.70

Galus, S., Arik, K., Emine, A., Gniewosz, M., & Krasniewska, K. (2020). Novel materials in the preparation of edible films and coatings—A review. *Coatings, 10*(7), 674–688. https://doi.org/10.3390/coatings10070674

Gaston, A., Osorio, S., Denoyes, B., & Rothan, C. (2020). Applying the *Solanaceae* strategies to strawberry crop improvement. *Trends in Plant Science, 25*(2), 130–140. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.10.003

Giampieri, F., Tulipanim S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition, 28*(1), 9–19. https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009

Gil-Giraldo, E. Y., Duque-Cifuentes, A. L., & Quintero-Castaño, V. D. (2018). Obtaining minimally processed strawberry (*Fragaria x ananassa*) products and their physicochemical, microbiological, and sensory characterization by using edible coatings. *Dyna, 85*, 183–191.

Golly, M. K., Ma, H., Sarpong, F., Dotse, B. P.,Oteng-Darko, P., & Dong,Y. (2019). Shelf-life extension of grape (*Pinot noir*) by xanthan gum enriched with ascorbic and citric acid during cold temperature storage. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(11), 4867–4878. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03956-7

González Sandoval, D. C., Luna Sosa, B., Martínez-Ávila, G. C. G., Rodríguez Fuentes, H., Avendaño Abarca, V. H., & Rojas, R. (2019). Formulation and characterization of edible films based on organic mucilage from Mexican *Opuntia ficus-indica*. *Coatings*, *9*(8), 506. https://doi.org/10.3390/coatings9080506

Guerreiro, A. C. (2015). *Innovative edible coatings to improve storage of small fruits and fresh cut*. Ph D Thesis, Universidade do Algarve. https://core.ac.uk/download/pdf/84111522.pdf

Hagenmaier, R. D. (2005). A comparison of ethane, ethylene and CO2 peel permeance for fruit with different coatings. *Postharvest Biology and Technology*, *37*(6), 56–64. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.02.012

Hannum, S. M. (2004). Potential impact of strawberries on human health: A review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(1), 1–17. https://doi.org/10.1080/10408690490263756

Hassan, B., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Zia, K. M., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 1095–1107. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097

Hing, Y., Li, W., Wang, Q., Li, X., Xu, Q., Guo, X., Bi, X., et al. (2019). Antimicrobial nanoparticles incorporated in edible coatings and films for the preservation of fruits and vegetables. *Molecules*, *24*(9), 1695–1725. https://doi.org/10.3390/molecules24091695

Huber, A. E., Kaplan, D. L., & Viney, C. (1994). Liquid crystallinity of levan/water/starch solutions. *Journal of Polymers and the Environment*, *2*(4), 195–199. https://doi.org/10.1007/bf02067445

Janjarasskul, T., & Krochta, J. M. (2010). Edible packaging materials. *Annual Review of Food Science and Technology*, *1*(1), 415–448. https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100836

Jindal, N., & Khattar, S. (2018). Microbial polysaccharides in food industry In: A.M.Grumezesku & A.M.Holban (Eds.) *Biopolymers for Food Design* (pp. 95–123). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811449-0.00004-9415448

Kahramanoğlu, I, Okatan, V., & Wan, C. (2020). Biochemical composition of propolis and its efficacy in maintaining postharvest storability of fresh fruits and vegetables. *Journal of Food Quality*, *2020*, e8869624.

Kambourova, M., Oner, E.T., & Poli, A. (2015). Exopolysaccharides from prokaryotic microorganisms – promising sources for white biotechnology, In: A.Pandey, R. Höfer. Ch. Larroche,M. Taherzadeh & M. Nampoothiri (Eds.), *Industrial biorefineries & white biotechnology* (pp. 523–554). Elsevier. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.693561

Kolesovs, S., & Semjonovs, P. (2020). Production of bacterial cellulose from whey - current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(18):7723–7730. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10803-9

Krasniewska, K., Galus, S., & Gniewosz, M. (2020). Biopolymers-based materials containing silver nanoparticles as active packaging for food applications—a review. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3), 698.

Kumar, A. S., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Journal of Basic Microbiology*, *47*(2), 103–117. https://doi.org/10.1002/jobm.200610203

Kumar, P., & Sethi, S. (2018). Edible coating for fresh fruit: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(5), 2619–2626. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.303

Kumar, N., & Neeraj (2019). Polysaccharide-based component and their relevance in edible film/coating: A review. *Nutrition & Food Science*, *49*(5), 793–823. https://doi.org/10.1108/nfs-10-2018-0294

Kwon, K. Y., Lee, J. S., Ko, G. J., Sunwoo, S. H., Lee, S., Jo, Y. J., et al. (2018). Biosafe, eco-friendly levan polysaccharide toward transient electronics. *Small*, *32*, e1801332. https://doi.org/10.1002/smll.201801332.

Lacroix, M. L., & Tien, C. L. (2005). Edible films and coatings from nonstarch polysaccharides. In: H. Jung (Ed.) *Innovations in Food Packaging* (pp. 338–361). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50052-8

Lakshmi Bhavani, A., & Nisha, J. (2010). Dextran—the polysaccharide with versatile uses. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *1*(4), 569–573.

Leite, B. S. F., Borges, C. D., Carvalho, P. G. B., & Botrel, N. (2015). Revestimento comestível à base de goma xantana, compostos lipofílicos e/ou cloreto de cálcio na conservação de morangos. *Revista Brasileira De Fruticultura*, *37*(4), 1027–1036. https://doi.org/10.1590/0100-2945-228/14

Li, L., Sun, J., Gao, H., Shen, Y., Li, Ch., Yi, P., He, X., et al. (2017). Effects of polysaccharide-based edible coatings on quality and antioxidant enzyme system of strawberry during cold storage. *International Journal of Polymer Science*, *2017*(3), 1–8. https://doi.org/10.1155/2017/9746174

Liston, A., Cronn, R., & Ashman, T. L. (2014). *Fragaria*: A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American Journal of Botany*, *101*(10), 1686–99. https://doi.org/10.3732/ajb.1400140

Lule, V. K., Singh, R., Pophaly, S. D., Poonam, S. K., & Tomar, S. K. (2016). Production and structural characterisation of dextran from an indigenous strain of Leuconostoc mesenteroides BA08 in whey. *International Journal of Dairy Technology*, *69*(4), 520–531. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12271

Luzi, F., Torre, L., Kenny, J., & Puglia, D. (2019). Bio - and fossil-based polymeric blends and nanocomposites for packaging: structure–property relationship. *Materials*, *12*(3), 471–520. https://doi.org/10.3390/ma12030471

Mantovan, J., Bersaneti, G. T., Faria-Tischer, P. C., Celligoi, M. A., & Mali, S. (2018). Use of microbial levan in edible films based on cassava starch. *Food Packaging and Shelf Life*, *18*, 31–36. https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2018.08.003

Marangoni Junior, L., Vieira, R. P., & Anjos, C. A. R. (2020). Kefiran-based films: fundamental concepts, formulation strategies and properties. *Carbohydrate Polymers*, *246*, 116609. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116609.

Maringgal, B., Hashim, N., Mohamed Amin Tawakkal, I. S., & Muda Mohamed, M. T. (2020). Recent advance in edible coating and its effect on fresh/fresh-cut fruits quality. *Trends in Food Science & Technology*, *96*, 253–267. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.024

Mohamed, S. A. A., El-Sakhawy, M., & El-Sakhawy, M. A. Monem. (2020). Polysaccharides, protein and lipid - based natural edible films in food packaging: A review. *Carbohydrate Polymers*, *238*, 116178. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116178

Mohite, B. V., Koli, S. H., Narkhede, C. P., Patil, S. N., & Patil, S. V. (2017). Prospective of microbial exopolysaccharide for heavy metal exclusion. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *183*(3), 582–600. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2591-4

Mohsin, A., Zaman, W. Q., Guo, M., Ahmed, W., Khan, I. M., Niazi S., et al. (2020). Xanthan-Curdlan nexus for synthesizing edible food packaging films. *International Journal of Biological Macromolecules*, *162*, 43–49. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.008

Moncayo-Martínez, D. (2013). *Desarrollo de un recubrimiento comestible a partir de un biopolímero para prolongar la vida útil de frutas frescas*. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia. http://www.bdigital.unal.edu.co/44864/1/24336979.2013.pdf.

Müller, K., Scheuerer, Z., Florian, V., Skutschik, T., & Sängerlaub, S. (2017). Comparison of test methods for oxygen permeability: Optical method versus carrier gas method. *Polymer Testing*, *63*, 126–132. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.08.006

Nair, M. S., Tomar, M., Punia, S., Kukula-Koch, W., & Kumar M.(2020). Enhancing the functionality of chitosan - and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *International Journal of Biological Macromolecules, 164*, 304–320. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.083

Nešić, A., Cabrera-Barjas, G., Dimitrijević-Branković, S., Davidović, S., Radovanović, N., & Delattre, C. (2019). Prospect of polysaccharide-based materials as advanced food packaging. *Molecules, 25*(1), 135–170. https://doi.org/10.3390/molecules25010135

Nielsen, J., & Keasling, J. D. (2016). Engineering cellular metabolism. *Cell, 164*(6), https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.004

Niu, B., Shao, P., Chen, H., & Sun, P. (2019). Structural and physiochemical characterization of novel hydrophobic packaging films based on pullulan derivatives for fruits preservation. *Carbohydrate Polymers, 208*, 276–284. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.070

Nwodo, U., Green, E., & Okoh, A. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences, 13*(11), 14002–14015. https://doi.org/10.3390/ijms131114002

Olivas, G. I., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). Edible coatings for fresh-cut fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45*(7–8), 657–670. https://doi.org/10.1080/10408690490911837

Olivas, G. I., Dávila-Aviña, J., Salas-Salazar, N. A., & Molina, F. J. (2008). Use of edible coatings to preserve the quality of fruits and vegetables during storage. *Stewart Postharvest Review, 4*(3), 1–10. https://doi.org/10.2212/spr.2008.3.6

Onilude, A. A., Olaoye, O., Fadahunsi, I. F., Owoseni, A., Garuba, E. O., & Atoyebi, T. (2013). Effects of cultural conditions on dextran production by *Leuconostoc* spp. *International Food Research Journal, 20*(4), 1645–1651.

Palou, L., Valencia-Chamorro, S. A., & Pérez-Gago, M. B. (2015). Antifungal edible coatings for fresh citrus fruit: A review. *Coatings, 5*, 962–986.

Panahirad, S., Dadpour, M., Peighambardoust, S. H., Soltanzadeh, M., Gullón, B., Alirezalu, K., & Lorenzo, J. M. (2021). Applications of carboxymethyl cellulose – and pectin-based active edible coatings in preservation of fruits and vegetables: A review. *Trends in Food Science & Technology, 110*, 663–673. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.025

Park, H. J. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science & Technology, 10*(8), 254–260.

Pascall, M. A., & Lin, S. J. (2013). The application of edible polymeric films and coatings in the food industry. *Journal of Food Processing and Technology, 4*, e116. https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000e116

Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M. A., & Abraham, A. G. (2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: Water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids, 25*(5), 1261–1269. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.024

Pina-Barrera, A. M., Alvarez-Romanm R., Baez-Gonzalez, J. G., Amaya-Guerra, C. A., Rivas-Morales, C., et al. (2019). Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus Vulgaris* L. to increase the shelf life of table grapes (*Vitis Vinifera* L.). *IEEE Transactions on NanoBioscience, 18*(4), 549–557. https://doi.org/10.1109/TNB.2019.2941931

Pobiega, K., Igielska, M., Walodarczyk, P., & Gniewosz, M. (2020). The use of pullulan coatings with propolis extract to extend the shelf life of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit. *Journal of Food Processing and Technology, 56*(2),1013–1020. https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000e116

Quezada Gallo, J., Gramin, A., Pattyn, C., Díaz Amaro, M. R., Debeaufort, F., & Voilley, A. (2005). Biopolymers used as edible coating to limit water transfer, colour degradation and aroma compound 2-pentanone lost in Mexican fruits. *Acta Horticulturae, 682*, 1709–1716. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.682.228

Radev, R., & Pashova, S. (2020). Application of edible films and coatings for fresh fruit and vegetables. *Acces La Success, 21*(177), 108–112.

Ramesh, H. P., & Tharanathan, R. N. (2003). Carbohydrates – the renewable raw materials of high biotechnological value. *Critical Reviews in Biotechnology, 23*(2), 149–173. https://doi.org/10.1080/713609312

Ramos, Ó. L., Reinas, I., Silva, S. I., Catalão, J., Cerqueira, M., Pereira, R. N., et al. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocollids, 30*(1), 110–122. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.001

Ribeiro, A. M., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2020). Preparation and incorporation of functional ingredients in edible films and coatings. *Food and Bioprocess Technology*. https://doi.org/10.1007/s11947-020-02528-4

Roca, C., Alves, V. D., Freitas, F., & Reis, M. A. (2015). Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Frontiers in Microbiology*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00288

Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: A review. *Bioresources and Bioprocessing, 5*, 1. https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z

Saklani, P., Siddnath Das, S. K., & Singh, S. M. (2019). A review of edible packaging for foods. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 8*(7), 2885–2895. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.807.359

Saleem, M. S., Ejaz, S., Anjum, M. A., Nawaz, A., Naz, S., Hussain, S., Ali, S. & Canan, I. (2020). Postharvest application of gum arabic edible coating delays ripening and maintains quality of persimmon fruits during storage. *Journal of Food Processing and Preservation, 44*(8), e14583. https://doi.org/10.1111/jfpp.14583

Salehi, F. (2020). Edible coating of fruits and vegetables using natural gums: A review. *International Journal of Fruit Science, 2020*, 1–20. https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1746730

Shao, P., Niu, B., Chen, H., & Sun, P.(2018). Fabrication and characterization of tea polyphenols loaded pullulan-CMC electrospun nanofiber for fruit preservation. *International Journal of Biological Macromolecules, 107*(PtB), 1908–1914. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.054

Shit, S. C., & Shah, P. M. (2014). Edible polymers: Challenges and opportunities. *Journal of Polymers, 2014*(427259), 1–13. https://doi.org/10.1155/2014/427259

Semjonovs, P., Shakirova, L., Broks, R., Kistkins, S., & Zikmanis, P. (2017). Influence of environmental factors on extracellular fructan and oligosaccharide production by Gluconobacter nephelii. *Research Journal of Microbiology, 12*, 33–41. https://doi.org/10.3923/jm.2017.33.41

Sengupta, D., Datta, S., & Biswas, D. (2018). Towards a better production of bacterial exopolysaccharides by controlling genetic as well as physico-chemical parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology, 102*(4), 1587–1598. https://doi.org/10.1007/s00253-018-8745-7

Senturk Parreidt, T., Schott, M., Schmid, M., & Müller, K. (2018a). Effect of presence and concentration of plasticizers, vegetable oils, and surfactants on the properties of sodium-alginate-based edible coatings. *International Journal of Molecular Sciences, 19*(3), 742. https://doi.org/10.3390/ijms19030742

Senturk Parreidt, T., Müller, K., & Schmid, M. (2018b). Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. *Foods, 7*(10), 170–208. https://doi.org/10.3390/foods7100170

Shahbazi, Y., Shavisi, N., & Karami, N. (2020). Development of edible bioactive coating based on mucilages for increasing the shelf life

of strawberries. *Journal of Food Measurement and Characterization*. https://doi.org/10.1007/s11694-020-00638-3

Sharma, P., Shehin, V. P., Kaur, N., & Vyas ,P. (2019). Application of edible coatings on fresh and minimally processed vegetables: a review. *International Journal of Vegetable Science*, *25*(3), 295–314. https://doi.org/10.1108/NFS-08-2018-0246

Siracusa, V, Rocculi, P., Romani, S., & Dalla Rosa, M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *19*(12), 634–643. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003

Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(10), 24673–24706. https://doi.org/10.3390/ijms161024673

Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). The use of electric fields for edible coatings and films development and production: A review. *Food Engineering Reviews*, *2*(4), 244–255. https://doi.org/10.1007/s12393-010-9029-x

Stroescu, M., Isopencu, G., Busuioc, C., & Stoica-Guzun, A. (2018). Antimicrobial food pads containing bacterial cellulose and polysaccharides. In: Md. I. H. Mondal (Ed.) *Cellulose-based superabsorbent hydrogels, polymers and polymeric composites: A reference series* (pp. 1 – 36). Springer International Publishing AG. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0_3-1

Tabasum, S., Noreen, A., Maqsood, M. F., Umar, H., Akram N, Nazli, Z. -i. -H., et al. (2018). A review on versatile applications of blends and composites of pullulan with natural and synthetic polymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, *120*(Pt A), 603–622. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.154

Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Mahunu, G. K., Arslan, M., Abdalhai, M., & Zhihua, L. (2019). Recent developments in gum edible coating applications for fruits and vegetables preservation: A review. *Carbohydrate Polymers, 224*, 115141. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115141

Tan, K. X., Chamundeswari, V. N., & Loo, S. C. J. (2020). Prospects of kefiran as a food-derived biopolymer for agri-food and biomedical applications. *RSC Advances, 10*(42), 25339–25351. https://doi.org/10.1039/D0RA02810J

Tiwari, O. N., Sasmal, S., Kataria, A. K., & Devi, I. (2020). Application of microbial extracellular carbohydrate polymeric substances in food and allied industries. *3 Biotech*, *10*(5), 221. https://doi.org/10.1007/s13205-020-02200-w

Tomadoni, B., Moreira, M. R., Pereda, M., & Ponce, A. G. (2018). Gellan-based coatings incorporated with natural antimicrobials in fresh-cut strawberries: Microbiological and sensory evaluation through refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology, 97*, 384–389. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.029

Tomulescu, C., Stoica, R., Sevcenco, C., Casarica, A., Moscovici, M., & Vamanu, A. (2016). Levan-a mini review. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, 20*, 309–317.

Totad, M. G., Sharma, R. R., & Verma, M. A. (2019). Effect of edible coatings on 'Misty' blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruits stored at low temperature. *Acta Physiologiae Plantarum, 41*, 183. https://doi.org/10.1007/s11738-019-2973-z

Treviño-Garza, M. Z., García, S., del Socorro Flores-González, M., & Arévalo-Niño, K. (2015). Edible active coatings based on pectin, pullulan, and chitosan increase quality and shelf life of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Food Science, 80*(8), M1823–M1830. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12938

Tsang, Y. F., Kumar, V., Samadar, P., Yang, Y., Lee, J., Ok, Y. S., et al. (2019). Production of bioplastic through food waste valorization. *Environment International, 127*, 625–644. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.076

Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2017). Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x

Wang, K., Du, L., Zhang, C., Lu, Z., Lu, F., & Zhao, H. (2019). Preparation of chitosan/curdlan/carboxymethyl cellulose blended film and its characterization. *Journal of Food Science and Technology, 56*(12), 5396–5404. https://doi.org/10.1007/s13197-019-04010-2

Whitfield, C., Wear, S. S., & Sande, C. (2020). Assembly of bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides. *Annual Review of Microbiology, 74*, 521–543. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-011420-075607

Widyaningrum, D., & Meindrawan, B. (2020). The application of microbial extracellular polymeric substances in food industry. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 426*, 012181.

Zambrano-Zaragoza, M. L., Quintanar-Guerrero, D., Del Real, A., & González –Reza, R. M., Cornejo-Villegas, M. A. & Gutiérrez-Cortez, E. . (2020). Effect of nano-edible coating based on beeswax solid lipid nanoparticles on strawberry's preservation. *Coatings, 10*(3), 253–264. https://doi.org/10.3390/coatings10030253

Zhang, Y., Zhou, L., Zhang, C., Show, P. L., Du, A., Fu, J., & Ashokkumar, V. (2020). Preparation and characterization of curdlan/polyvinyl alcohol/ thyme essential oil blending film and its application to chilled meat preservation. *Carbohydrate Polymers, 247*, 116670. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116670

Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q., & Liang, H. (2014). Effects of nisin on the antimicrobial activity of d-limonene and its nanoemulsion. *Food Chemistry, 150*, 307–312. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.160

Zhu, J., Wang, Q., Han, L., Zhang, C., Wang, Y., Tu, K., et al. (2021). Effects of caprolactam content on curdlan-based food packaging film and detection by infrared spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 245*, 118942. https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118942

Zikmanis, P., Kolesovs, S., & Semjonovs, P. (2020a). Production of biodegradable microbial polymers from whey. *Bioresources and Bioprocessing*, *7*, 36. https://doi.org/10.1186/s40643-020-00326-6

Zikmanis, P., Brants, K., Kolesovs, S., & Semjonovs, P. (2020b). Extracellular polysaccharides produced by bacteria of the *Leuconostoc* genus. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *36*, 161. https://doi.org/10.1007/s11274-020-02937-9

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4. P. Zikmanis, K. Brants, S. Kolesovs, P. Semjonovs (2020), Extracellular polysaccharides produced by bacteria of the Leuconostoc genus. World J of Microbiol and Biotech, 36:161. https://doi.org/10.1007/s11274-020-02937-9 (*SCOPUS*).

World Journal of Microbiology and Biotechnology (2020) 36:161
https://doi.org/10.1007/s11274-020-02937-9

REVIEW

Extracellular polysaccharides produced by bacteria of the *Leuconostoc* genus

Peteris Zikmanis[1] · Karlis Brants[2] · Sergejs Kolesovs[1] · Pavels Semjonovs[1]

Received: 1 July 2020 / Accepted: 16 September 2020
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract

Structurally diverse biopolymers, including extracellular polysaccharides (EPS), synthesized by bacteria can possess physicochemical and functional properties that make them important products of microbial synthesis with a broad and versatile biotechnological potential. *Leuconostoc* spp. belongs to the group of lactic acid bacteria as one of the predominant members and are relevant not only in varied food fermentations, but also can be employed in the production of extracellular homopolysaccharides (HoPS) such as α-glucans (dextran, alternan) and β-fructans (levan,inulin) from the sucrose-containing substrates. EPS are synthesized by specific *Leuconostoc* spp. extracellular glycosyltransferases [dextran sucrase, alternansucrase (ASR)] and fructosyltransferases (levansucrase, inulosucrase) and enzymatic reactions can be performed in whole culture systems as well as using cell-free enzymes. Both α-glucans and β-fructans have a wide range of properties, mostly depending on their pattern of linkages, which, although differing in some respects, make suitable prerequisites for their versatile application in many fields, especially in the food industry and biomedicine. As a rule, these properties (polymer type, molecular mass, rheological parameters), as well as the overall EPS yield, are strain-specific for the selected producers and depend to a large extent on the nutritional and growth conditions used, which in many cases remain not sufficiently optimized for *Leuconostoc* spp. This review summarizes the current knowledge on the potential of *Leuconostoc* spp. to produce commercially relevant EPS, including information on their applications in various fields, producer strains, production methods and techniques used, selected conditions, the productivity of bioprocesses as well as the possible use of renewable resources for their development.

Keywords Alternan · Dextran · Exopolysaccharides · Inulin · *Leuconostoc* spp. · Levan

Introduction

From the structurally diverse extracellular biopolymers synthesized by bacteria, their polysaccharide component is the most frequently represented and particularly functionally important one (Nwodo et al. 2012; Schmid et al. 2015). These extracellular polysaccharides (EPS) can either be attached to the bacterial cell surface or excreted into the growth medium and play an important role in cell protection against adverse environments, intercellular aggregation, surface adhesion and biofilm formation. On the other hand, EPS released into the environment can possess physicochemical and functional properties that make them important products of microbial synthesis with a broad and versatile biotechnological potential (Barcelos et al. 2019; Giavasis 2013). EPS can be synthesized by a wide range of taxonomically very diverse bacteria, archaea, fungi and algae (Angelina and Vijayendra 2015; Ates 2015; Donot et al. 2012). Among them, bacteria are of particular importance, including the lactic acid bacteria (LAB) from several (*Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc,Weisella*) genera (Patel and Prajapati 2013; Sanalibaba and Cakmak 2016) which are capable of producing structurally diverse EPS with valuable functional properties, and thus with a wide range of actual and potential applications. LAB can synthesize both HoPS, which contain only one type of monosaccharide (e.g., glucose or fructose), and heteropolysaccharides (HePS), which are composed of repeating units containing different monosaccharides and non-sugar molecules (Donot et al. 2012; Lo et al. 2007; Sanalibaba and Cakmak 2016). It is essential

✉ Pavels Semjonovs
pavels.semjonovs@lu.lv

[1] Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology, University of Latvia, Ojara Vaciesa str. 4, Riga 1004, Latvia

[2] Probiotika LV, Ltd, Brivibas gatve 451, Riga 1024, Latvia

Published online: 29 September 2020

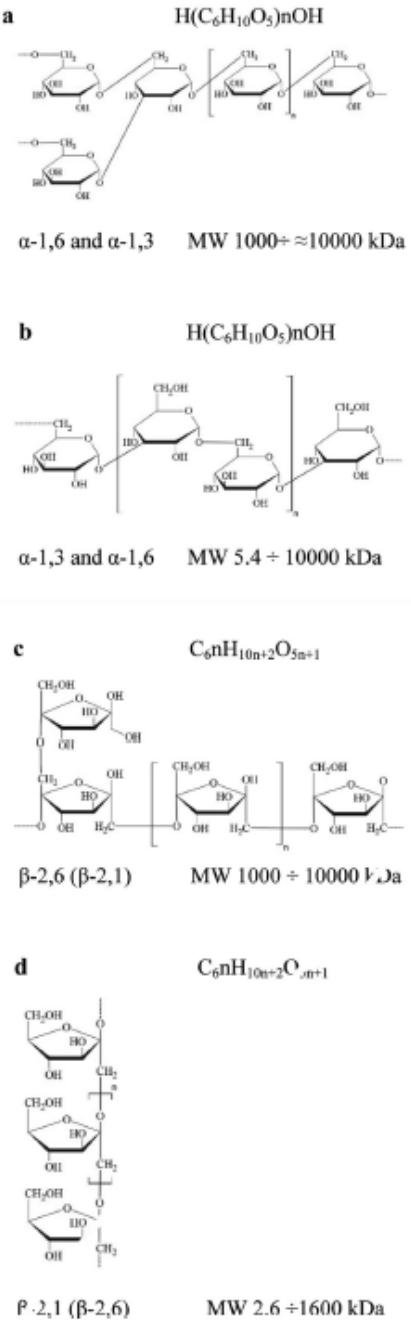
Table 1 Species and subspecies of the genus *Leuconostoc* capable for the EPS synthesis

Species	Primary isolation source	Products (EPS, glycosyl transferases)	References
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*	Plants/raw-milk cheses/meats	Dextran	Lule et al. (2016)
		Dextransucrase	Esmaeilnejad-Moghadam et al. (2019)
			Naessens et al. (2005)
			Miljkovic et al. (2016)
		Alternan	Leathers et al. (1995)
		Alternansucrase	Taylan et al. (2019)
		Levan	Xu et al. (2017)
		Levansucrase	Franken et al. (2013)
subsp.*dextranicum*	Plants/raw-milk cheeses	Dextran	Majumder and Goyal (2008)
		Dextransucrase	Björkroth et al. (2014)
subsp. *cremoris*	Dairy products	Levan	Salman et al. (2019)
			Khudair et al. (2018)
Leuconostoc carnosum	Chill-stored meats Dairy products	Dextran	Björkroth et al. (2014)
Leuconostoc citreum	Human clinical sources	Dextran	Bounaix et al. (2010)
		Dextransucrase	Wangapaiboon et al. (2018)
		Alternan	Amari et al. (2015)
		Alternansucrase	Argüello-Morales et al. (2000)
		Levan	Han et al. (2015)
		Levansucrase	Bounaix et al. (2009)
		Inulin	Oritz-Soto et al. (2004)
		Inulosucrase	Vallejo-García et al. (2019)
		Inulin—type oligosaccharides	Peña-Cardeña et al. (2015)
Leuconostoc kimchi	Food (Kimchi)	Dextran	Björkroth et al. (2014)
Leuconostoc pseudomesenteroides	Human clinical sources Beverages	Dextran	Zhou et al. (2018)
Leuconostoc gelidium	Chill-stored meats	Dextran	Björkroth et al. (2014)
Leuconostoc gasicomitatum	Chill-stored meats	Dextran	Björkroth et al. (2014)

that LAB have been granted the Generally Regarded As Safe (GRAS) and/or Qualified Presumption of Safety (QPS) status which allows them and their EPS to be incorporated in food with virtually no restriction to contribute to the rheology and texture of fermented milk and food products (Patel and Prajapati 2013; Torino et al. 2015; Werning et al. 2012) as well as to have a generally beneficial effect on the gastric system in the host (Mozzi et al. 2009; Patel and Prajapati 2013; Salazar et al. 2015). Although it should be noted that one of the main disadvantages of the EPSs produced by LAB is that in most cases the total amount of polymer synthesized does not exceed 1 g/L even under optimal growth conditions and only in exceptional cases some *Lactobacillus* or *Streptococcus* strains have shown higher (1.2 g/L ÷ 4.8 g/L) results (Ates 2015; Lo et al. 2007; Sanalibaba and Cakmak 2016). Such relatively low concentrations of EPS, while sufficient for their aforementioned beneficial efficacy, nevertheless hinder, even prevent, the use of LAB species commercially to obtain higher yields of industrially important polymers (Ates 2015). However, within the set of EPS-synthesizing LAB, there are also cultures with significantly higher biosynthetic capacity, which mainly represent bacteria of the genus *Leuconostoc* (Table 1) and, accordingly, can reach the several times higher polymer levels (Chagas et al. 2007; Esmaeilnejad-Moghadam et al. 2019; Salman et al. 2019).

These quite efficient producer cultures are capable to synthesize several HoPS (Fig. 1), such as α-D-glucans (dextran, alternan) or β-D-fructan (levan,inulin) (Esmaeilnejad-Moghadam et al. 2019; Han et al. 2015; Björkroth et al. 2014; Leathers et al. 1995; Taylan et al. 2019; Zarour et al. 2017). The synthesis of a structurally quite different HePS by a native isolate of *Leuconostoc* sp. has also been reported (Vijayendra and Sharath Babu 2008). Whether EPS (HoPS) are obtained by fermentation using whole cell systems,including those from *Leuconostoc* spp. or in vitro by individual enzymes (Han et al. 2015; Kanimozhi et al. 2019), practically the same steps are required for their isolation and characterization (Fig. 2). Both α-glucans and β-fructans have a wide range of properties which, although different in some respects, nevertheless make suitable prerequisites for their

Fig. 1 Extracellular homopolysaccharides produced by *Leuconostoc* spp. dextran (**a**), alternan (**b**), levan (**c**), inulin (**d**), their molecular formulas, molecular mass (MW) ranges, main linkages and (branching linkages) (Harutoshi 2013; Mensink et al. 2015; Ortiz-Soto et al.2004)



versatile application in many fields, especially in the food industry and biomedicine (Santos and de Amorim 2018; Shanmugam and Abirami 2019; Patel and Prajapati 2013).

These properties (polymer type, molecular weight, rheological parameters), as in the case of other EPS, are strain-specific for the selected producers and depend to a large extent on the nutritional and growth conditions used (Nwodo et al. 2012; Semjonovs et al. 2017; Vaningelgem et al. 2004). These issues have been presented in a considerable number of research reports as well as summarized, at least in part, in several reviews, although they remain unevenly distributed and relatively limited. Thus, if, in the case of dextran, the properties of the polymer, its applications, the required growing conditions and the properties of the producer strains are quite thoroughly described in the specialized reviews (Hemme and Foucaud-Scheunemann 2004; Naessens et al. 2005; Vettori et al. 2012a), then other possible *Leuconostoc* spp. polysaccharides (alternan, levan, inulin) are only occasionally mentioned in the reviews on LAB (Torino et al. 2015) and such a summary review of experimental data is not yet available. It should be noted that the focus on the applications of all these EPS still remains mainly in the areas of food and biomedicine (Das and Goyal 2012; Lynch et al. 2018; Vettori et al. 2012a), leaving out a number of industrially important and promising approaches and products (e.g., composites, films, coatings). In addition, the possibilities for the use of alternative renewable carbon/nitrogen sources to make the production of *Leuconostoc* EPSs more cost-efficient are also insufficiently summarized.This paper provides a brief overview of current knowledge and prospective approaches which could help to address these issues more fully.

Dextran as the major exopolysaccharide of *Leuconostoc* species

Biosynthesis, structure and properties

Dextrans are bacterial EPS that belong to water soluble and neutral α-D-glucans and represent the best known and most industrially important polymers of microbial origin. These are HoPS of glucose consisting of linear chains of D-glucopyranosyl units with predominantly α-(1,6) linkages in the main chain and a variable amount of α-(1,2), α-(1,3) and α-(1,4) branched linkages (Fig. 1) (Naessens et al. 2005; Purama et al. 2009). Dextrans are synthesized

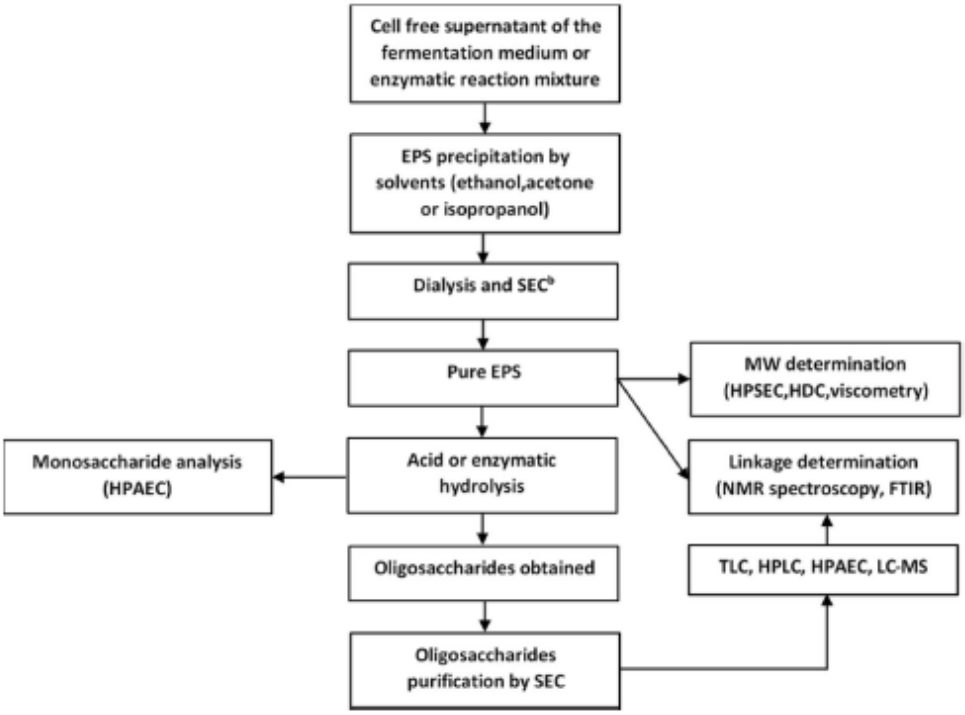


Fig. 2 A general way to isolate and characterize bacterial EPS. **a** The type of scheme published by Kothari et al. (2014) was employed; (**b**). *SEC* size exclusion chromatography; *HPSEC* high performance size exclusion chromatography, *NMR* nuclear magnetic resonance spectroscopy, *FTIR* Fourier transform infrared spectroscopy, *SEM* scanning electron microscopy, *HDC* hydrodynamic chromatography, *LC–MS* liquid chromatography-mass spectrometry EPS precipitation by solvents (ethanol,acetone or isopropanol)

from sucrose by dextransucrase (EC 2.4.1.5) which is an extracellular glucosyltransferase that catalyses the gradual transfer of D-glucopyranosyl residues from sucrose to dextran and the release of fructose residues.[1] The structure of the HoPS formed is highly dependent on the enzyme as well as on the conditions used whereas *Leuconostoc* spp. may harbor multiple highly versatile glucansucrases. This has been demonstrated by cloning, expression, and characterization of relevant recombinant enzymes (Leemhuis et al. 2013; Münkel et al. 2019).

Although dextran can be synthesized by several bacterial genera, including *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Gluconobacter* spp., generally recognized and industrially important strains of producers are currently found only among *Leuconostoc* species. *Leuconostoc* is a genus of Gram-positive, heterofermentative and catalase negative bacteria which are usually slime-forming ovoid cocci often arranged in pairs or short chains. *Leuconostoc* spp. belong to the lactic acid bacteria (LAB) group as one that of the predominant members and are important in varied food fermentations (Björkroth et al. 2014; Das and Goyal 2012; Hemme and Foucaud-Scheunemann 2004; Thunell 1995). Their ability to produce dextran is strictly substrate-specific, because sucrose is absolutely necessary for the process to proceed as it cannot be replaced by any other sugars. In addition, the formation of EPS by *Leuconostoc* spp. is highly strain-specific, as dextrans produced by different strains also have a different branched linkage pattern which have been attributed to action of different dextransucrases each excreted by a certain bacterial strain (Das and Goyal 2012; Vettori et al. 2012a).

Like molecular weight differences so do the different type of bonds and the proportion of branches, in turn, determine the overall properties of dextrans, most notably their solubility and rheological characteristics (Münkel et al. 2019; Purama et al. 2009; Zarour et al. 2017). In general, the higher the proportion of the linear α-(1,6) chains (e.g. 95% or above), the better the water solubility of dextrans and the higher the viscosity of the solutions (Purama et al. 2009; Vettori et al. 2012a; Zarour et al. 2017).

[1] https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.5.

Biomedical and technological applications

Since the free rotation of glycosidic bonds results in the formation of elastic dextran structures and these EPS are highly soluble in water, biocompatible and biodegradable, they are rightly considered to be highly functional hydrocolloids, which possess and realize a versatile potential for commercial applications, mainly in food and medical fields (Ahmad et al. 2014; Patel et al. 2012; Patel and Prajapati 2013; Pavlov et al. 1999; Vettori et al. 2012a). Thus, in the food industry, particularly for cereal-based and dairy products, dextran is widely used as an indirect food additive, as a stabilizer and also as a viscosifying, texturing, gelling and emulsifying agent (Giavasis 2013; Kothari et al. 2014; Leemhuis et al. 2013; Lynch et al. 2018). The actual use of dextran in the medical and pharmaceutical industries is no less comprehensive and, as with food, a considerable amount of literature is devoted to such uses of native or partially degraded dextran or its derivatives (De Belder 2003; Naessens et al. 2005). Aqueous solution of native clinical grade dextran (MW 40 kDa, 60 kDa or 70 kDa) have been widely used as a blood plasma expander to replace moderate blood losses and improve the blood flow presumably caused by decreased blood viscosity and inhibition of possible coagulation. In addition, the presence of dextran in aqueous solutions helps to create a favorable physiological environment due to the colloidal osmotic pressure, which is beneficial for the preservation of viable organs and for use in various ophthalmic formulations (Lakshmi Bahvani and Nisha 2010; Heinze et al. 2006; Patel et al. 2012). Dextran is also very suitable as a macromolecular carrier, e.g. hydrogel which can be conjugated with various drugs or enzymes to make a stabilized preparation for therapeutic use (Kadajji and Betagari 2011). Dextran is also increasingly used in nanomedicine, a novel discipline that applies submicron particles for therapeutic and diagnostic purposes (Wasiak et al. 2016). In addition to food and medicine dextran also has several potential applications in photographic film manufacturing, fine chemical, cosmetic, paper, petroleum, and textile industries, oil recovery (Jeong et al. 2019; Kothari et al. 2014; Lakshmi Bhavani and Nisha 2010; Leemhuis et al. 2013; Naessens et al. 2005). The presence of multiple free hydroxyl groups in dextran molecules has made it possible to obtain a large number of derivatives (oxidized dextran, ethers, esters, including phosphates, sulphates, carbonates.) which have also found wide and varied applications as promising medicinal products (Heinze et al. 2006; Maia et al. 2014; Wang et al. 2016). Besides the cross-linking of dextran to obtain derivatives with desired properties can be achieved by physical interactions and chemical reactions (Heinze et al. 2006; Maia et al. 2014; Van Tomme et al. 2008). In this way, efficient matrix systems have been developed to separate biomolecules, cross-linking of dextran with epichlorohydrin, as well as an allyl dextran cross-linked by N,N-methylene bisacrylamide form efficient matrix systems used for macromolecular separation and gel filtration and are commercially known as Sephadex and Sephacryl, respectively (De Belder 2003; Heinze et al. 2006). In order to further promote and expand the use of biodegradable and biocompatible bacterial EPS, including dextran, it is important to assess their ability to form films, grafted copolymers as well as to incorporate into composite materials (Hussain et al. 2017; Vijayendra and Shamala 2013). Already natural, chemically unmodified dextrans have film-forming properties (Pavlov et al. 1999), which, when supplemented with plasticizers (glycerol, sorbitol) or other biopolymers, allow the formation of edible coatings for fruits, berries and other products (Quezada Gallo et al. 2005; Davidović et al. 2018; Moncayo-Martinez 2013). The film-forming properties of dextrans and their varied applications expand when their chemical modifications are used, such as esters (Liebert et al. 2011), derivatives of furfuryl—and maleimido carboxylic acids (Elschner et al. 2017) or alkylamines (Trivedi et al. 2017), also the hydrophobically modified copolymer obtained by grafting of caprolactone over the dextran backbone (Leiva et al. 2010). The film-forming properties also promote the use of dextran in nanoparticle coatings (Wasiak et al. 2016), such as cerium (Yazici et al. 2015), iron oxide (Naha et al. 2019) or various macroporous metallic and metal oxide sponges (Walsh et al. 2003). Of particular importance are dextran-based scaffolds, which have gained wide applications in tissue engineering and are supportive to cell proliferation and regeneration processes (Hussain et al. 2017; Maia et al. 2014; Tiwari et al. 2018). These scaffolds can be formed as a composite of dextran and another unmodified biopolymer, such as pullulan (Cutiongco et al. 2014) or chitosan (El-Meliegy et al. 2018), or structures with a rather complex composition developed through a variety of dextran physical/chemical modifications using crosslinking, grafting, polyion complexation and blending (Hussain et al. 2017; Maia et al. 2014; Tiwari et al. 2018). Although the main field of application for dextran and all its derivatives is and will remain biomedicine, there are good prospects for their other uses, such as dextran-based electrolytes (Hamsan et al. 2019), adhesives from dextran esters (Togo et al. 2019; Liebert et al. 2011), or effective flocculants from dextran graft copolymers with varying polyacrylamidosulphonic acids (Azmeera et al. 2012). Thus it should be concluded that the potential of dextran applications is far from exhausted and continues growing.

Production methods, strains and optimum conditions

Although commercial dextran is still mainly produced using the whole culture method, its production can also be

achieved enzymatically with cell-free supernatants containing dextransucrase in the presence of sucrose or using a purified enzyme preparation. In this way, conditions can be more easily controlled and the polymer obtained is more uniform and easier to purify. In addition, fructose can be obtained as a valuable co–product (Heinze et al. 2006; Leemhuis et al. 2013; Vettori et al. 2012a). Besides, fructose released in the biosynthesis of dextran can also be used as a carbon and energy source in further fermentations to obtain other products, e.g., for efficient conversion into ethanol by *Zymomonas mobilis* (He et al. 2014), which would be both cost-effective and environmentally friendly. Both the production of dextran by the direct whole-culture fermentation and the biosynthesis of dextransucrase for its production by using the enzymatic cell-free method depend on a large number of nutritional and environmental parameters. In turn, the levels and changes of these parameters significantly affect the yield and properties of the resulting EPS. This set of factors relevant to microbial fermentation consists of parameters such as carbon, nitrogen and mineral sources and their concentrations, initial pH, fermentation duration and temperature, inoculation and aeration levels (Kumar et al. 2007; Naessens et al. 2005; Vettori et al. 2012a). Successful design of the fermentation process is based on obtaining the product according to a certain specification, achieving the product concentration, yield and productivity required for a specific economic target. However, there is no single set of culture conditions that guarantees high product yields, since organisms differ in their attitudes towards these critical factors for maximum EPS production (Kumar et al. 2007). At the same time, the production of most EPS, including dextran, can also be characterized by a number of common features and preconditions, such as the growth-associated nature of the process, where the maximum of product is reached at the early stationary phase, the need for elevated C/N ratios and temperature below the optimal for cell growth (Barcelos et al. 2019; Kumar et al. 2007; Lule et al. 2016; Onilude et al. 2013; Vijayendra and Sharath Babu 2008). The observed relationships between dextran molecular weight distribution, reaction temperature, dextransucrase and sucrose concentrations observed in most cases of cell-free enzymatic syntheses are also of a common nature (Falconer et al. 2011; Kanimozhi et al. 2019). However, since the yields and properties of microbial EPS are most directly dependent on a variety of external factors, whose efficiency, in turn, are highly strain-dependent (Das and Goyal 2012, Vettori et al. 2012a), it is difficult to select the relevant factors and define their levels in order to maximize the yield of dextran with the desired properties (Majumder et al. 2009; Patel et al. 2012). In this regard, extensive studies have been performed to improve dextran production in many *Leuconostoc* strains using both whole culture and enzymatic methods, as well as various optimization techniques (Angelina and Vijayendra 2015; Majumder et al. 2009; Patel et al. 2012; Vijayendra and Shamala 2013; Vijayendra and Sharath Babu 2008). Among them, the most important and widely used are the one-factor-at-a-time (OFAT) technique and the response surface methodology (RSM), which, respectively, allow to assess the impact of one single factor, because while changing one parameter others are kept constant or permit to evaluate simultaneous effects of several parameters by using multivariate techniques (Bezerra et al. 2008; Wahid and Nadir 2012). Although the use of OFAT in dextran production studies (Behravan et al. 2003; Goyal and Katiyar 1997; Vijayendra and Sharath Babu 2008), especially when initiated, can provide an indispensable insight into the process, it does not allow to identify the interactions between factors and therefore cannot perform a full optimization of culture conditions (Bezerra et al. 2008; Wahid and Nadir 2012). Unlike OFAT, the application of the RSM methodology (Esmaeilnejad-Moghadam et al. 2019; Majumder and Goyal 2008; Majumder et al. 2009; Sawale and Lele 2010; Vettori et al. 2012b) allows to develop second-order polynomial models, describing the production of dextran and/or dextransucrase at varying levels of several influential factors in order to detect their global maxima which, in turn, indicate optimal sets of culture conditions (Bezerra et al. 2008; Patel et al. 2012). Therefore, the use of RSM, including the combination of Plackett–Burman two-level design and Box-Behnken three-level design can be considered as a favourable strategy and a convenient tool to select the relevant factors and determine their optimal levels in order to maximize the formation of dextran, as well as other EPS, by the producing strains of *Leuconostoc* spp. (Bezerra et al. 2008; Semjonovs et al. 2017) and would be increasingly applicable. Although current studies on dextran-producing strains have focused mainly on *L. mesenteroides* and *L. citreum spp.* (Table 1), the search for new efficient producers also continues. Thus, a rather high yield of dextran of 35.5 g/L (0.74 g/L/h) was achieved (Zhou et al. 2018) using the strain *L. pseudomesenteroides* isolated from a homemade wine, in the MRS (De Man-Rogosa-Sharpe) medium (12.5% sucrose) at static conditions (30° C).

In addition, as for other biopolymers (Gahlawat and Srivastava 2017), it is important to make greater use of renewable and cheaper resources in the microbial production of dextran. Sugar beet or cane molasses are the most widely used renewable sources of sucrose in the production of dextran. However, it is also possible to use other renewable nutrients, including cheese whey. In this regard, the ability of *L. mesenteroides* to produce dextran in combined sucrose-whey media has been demonstrated for a long time (Schwarz and Bodie 1984). Thus, during the growth of *L. mesenteroides* ATCC 14935 in shake flasks and combined medium containing sweet cheese whey (CW) powder (4%) and sucrose (10%), the viscosity of the culture medium

increases significantly (more than 500 cps in 46 h), most likely due to dextran formation, as the product showed compatible properties (Schwartz and Bodie 1984). The use of various renewable carbon sources for dextran production has been proved. The producer strain *L. mesenteroides* NRRL B512F in the broth consisting of Carob (*Ceratonia siliqua*) pod extract (sucrose 20 g/L) and percentage of deproteinized CW to obtain 5% of lactose in the medium during batch cultivation (14 h) in bioreactor, achieved dextran concentration of 7.23 g/L (Santos et al. 2005). In a later study using the same *L. mesenteroides* NRRL B512F strain and medium containing molasses (Brix 40) as a carbon source and CW powder (10%) as a nitrogen source, the concentration of dextran 12.7 g/L was reached during cultivation in shake flasks (Moosavi-Nasab et al. 2010). However in earlier studies, relatively high concentrations of dextran (26 g/L) have been obtained using this producer strain *L. mesenteroides* NRRL B-512F and the medium with 20% sugar beet molasses (9.5% sucrose) as a carbon source and 15% wheat-bran extract as a nitrogen source in flasks within 48 h under static conditions (Behravan et al. 2003). Using other producers 12.7 g/L (0.79 g/L/h) and 10.51 g/L (0.66 g/L/h) of dextran were obtained for *L. mesenteroides* NCDC 744 and *L. mesenteroides* NCDC 745, respectively, in a partially deproteinized paneer whey medium supplemented with 10% sucrose (Lule et al. 2015). Increased concentration of dextran (17.25 g/L, was observed under optimized (15% sucrose) conditions using the strain *L. mesenteroides* NCDC 7459 (Lule et al. 2016). Recently, fairly good results have been obtained using *L. mesenteroides* strains NRRL B512F, NCIB 8023 and NRRL B12, yielding dextran 16.35 g/L (0.68 g/L/h), 15.89 g/L (0.66 g/L/h) and 16.28 g/L/h (0.68 g/L/h), respectively, during the batch fermentation in the medium containing whey permeate (15 g/L), sucrose 20 g/L and yeast extract (15 g/L) (Esmaeilnejad-Moghadam et al. 2019). Using sugar beet molasses with a relatively high (17.5%) sucrose concentration as a carbon source together with conventional (yeast extract, peptone) nitrogen sources, the strain *L. mesenteroides* VKM V-2317D produced dextran at 50 g/L and above during the cultivation (96 h) in shake flasks or a bioreactor (Vedyashkina et al. 2015). Potato peel extract (20% w/v) has also been reported to be a suitable carbon source for the dextran production by *Leuconostoc* spp. up to a concentration of 79 g/L during 20 h (Onilude et al. 2013). Molasse-containing media have also been used to obtain dextran sucrase (DS) preparations. For example, *L. mesenteroides* FT045B produced maximum DS activity (4.03 U/mL) after 24 h of fermentation on sugar cane molasses (40 g/L) with addition of corn steep liquor (20 g/L) as a nitrogen source (Vettori et al. 2012a). Using the *L. mesenteroides T3* strain, the maximum DS activity (2.02 U/mL) was reached after 16 h of cultivation under static conditions, when the sucrose concentration (4%) in the medium was supplemented with sugar beet molasses (2.5%) and sugar beet pulp (2.5%) (Miljković et al. 2016). Significant dextransucrase activity (7 U/mL) has been achieved with the strain *L. mesenteroides* NRRL B512F by including the cashew apple juice in the synthetic growth medium and supplementing it with sucrose up to 50 g/L (Chagas et al. 2007). Overall, the results above confirm that a number of agro-industrial wastes and byproducts can be used as nutrients for *Leuconostoc* spp. cultivation to achieve more cost-effective and environmentally friendly production of dextran and/or dextransucrase.

Alternan: a different kind of glucan produced by *Leuconostoc* spp

Biosynthesis, structure and properties

In addition to dextran, *Leuconostoc* spp. are able to form the other EPS alternan, which also represents HoPS belonging to α-glucans. This polysaccharide, originally considered to be a dextran with better solubility (i.e., S-fraction), has been known for decades (Jeanes et al. 1956; Leathers et al. 2006). However, it was named alternan after determining its structure (Fig. 1), which consists of α-D-glucopyranosyl units interconnected by alternating α-(1,6) and α-(1,3) glycosidic linkages with a relatively low degree of α-(1,3) branchings, thus without the consecutive sequence of α- (1,6) linkages that characterizes a structure of "pure" dextran (Purama et al. 2009). Due to its unique structure, alternan has high solubility, low viscosity and remarkable resistance to hydrolysis by most microbial and mammalian enzymes (Naessens et al. 2005; Patel et al. 2012). Alternan biosynthesis is performed by alternansucrase (ASR) (EC 2.4.1.140), which is a specific cell-associated glycosyltransferase[2] and transfers alternately the α-D-glucosyl residue from sucrose to the 6-position and the 3-position of the non-reducing terminal residue of an α-D-glucan, thus producing a glucan having alternating α-(1,6) and α-(1,3) linkages together with a release of fructose residues. There is a reason to believe that ASR is probably a translation product of a mutant gene sequence originally coding for dextransucrase (Kumar et al. 2007; Leemhuis et al. 2013). Studies on the molecular sequences of ASRs have not been very extensive, although they have included several alternan-producing strains of *Leuconostoc* spp. (Argüello-Morales et al. 2000; Joucla et al. 2006; Kim et al. 2008; Musa et al. 2014; Passerini et al. 2015; Wangpaiboon et al. 2018). Thus, the gene (Lmalt) encoding ASR from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 was cloned, sequenced and expressed in *Escherichia coli* to obtain a recombinant enzyme that catalyzed the alternan

[2] https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.140.

synthesis using sucrose or maltose as an acceptor, although the enzyme was unstable and rapidly degraded (Argüello-Morales et al. 2000). Although deletion of repeated motifs at the C-terminus of Lmalt has been shown to increase the solubility and stability of the enzyme without affecting the linkage pattern of alternan (Joucla et al. 2006). The studies of full genomic sequence of *L. citreum* KM20 revealed a cluster of three putative dextransucrases and an ASR gene (Kim et al. 2008). Alternan's structural features, which are determined by the specific linkage pattern, have also largely shaped its rheological properties, which in turn have proved to be very suitable for the food industry, which remains the main field of EPS applications (Patel et al. 2012; Santos and de Amorim 2018; Zannini et al. 2015).

Biomedical and technological applications

Native alternan is easily soluble in water, which is quite convenient for use, reaching concentrations up to 10% which can be increased by mechanical agitation or by ultrasonication which randomly hydrolyzes the covalent linkages of polymers to smaller fragments with higher solubility (Charoenwongpaiboon et al. 2019; Côté et al. 1997). In addition, some glycan hydrolyzing enzymes can be also used for this purpose (Leathers et al. 2010). This allows the rheological properties of alternan to be changed in the desired way, bringing them comparable to, for instance, gum arabic which is also a well-known food texture modifier (Côté et al. 1997; Leathers et al. 2010). The use of alternan and its oligosaccharides in food is primarily related to the production of ingredients for functional foods such as prebiotics (Park and Khan 2009; Côté 2009), low glycemic sweeteners (Gangoiti et al. 2018; Leathers et al. 2003; Santos and de Amorim 2018) and dietary fiber (Hasselwander et al. 2017). Alternan is very widely used as a thickening agent, most commonly in combination with another thickener (Pilling 2009) to increase the viscosity of solutions or to improve the thixotropic properties of gels, achieving a synergistic effect of these agents. Alternan as low viscosity bulking agent and extender (Pilling and Frohberg 2009) can be used in a wide variety of foodstuffs (sauces, cream, yoghurt, jelly, ice cream, soups, baked products) in the form of powder or paste (0.1% w/w and above). The uses of alternan, including in food, have been mentioned and summarized in many reports and reviews (Gangoiti et al. 2018; Giavasis 2013; Grimaud et al. 2018; Harutoshi 2013; Park and Khan 2009; Patel et al. 2012; Wangpaiboon et al. 2018; Zannini et al. 2015). It is mentioned that alternan could also replace polydextrose, maltodextrins and gum arabic for use as inks, glues, cosmetic creams and ointments (Côté 1992; Park and Khan 2009). Not only alternan itself, but also its derivatives such as alternan-carboxylic acid esters are particularly suitable for use in foods, pharmaceutical products or cosmetics as emulsifiers and surfactants (Frohberg et al. 2009). Unlike many other polysaccharides, including glycans, alternan's functions in cell biology, especially relative to cell growth and differentiation as well as its potential for medical use are still not well understood (Charoenwongpaiboon et al. 2019). Recent promising results in this regard demonstrate biological effects of alternan, promoting the proliferation, migration, and differentiation of human mesenchymal stem cells (MSCs). These novel roles of alternan may have important beneficial medical applications and may provide a basis from which stem cell therapies can be developed in the future (Charoenwongpaiboon et al. 2019). Recent studies have also revealed (Yilmaz et al. 2020) the potential of alternan for the production of silver nanoparticles which can be used for different applications as antimicrobial agents.

Production methods, strains and conditions

The production of alternan is not a simple, but even quite a complicated task, because practically all naturally occurring strains of *Leuconostoc* spp., which are able to produce alternan, also form dextran due to the simultaneous presence of dextransucrase (Côté et al. 1997; Kim et al. 2008; Monsan et al. 2001; Park and Khan 2009). Therefore, in order to obtain alternan alone, if the whole culture method is employed, it must be separated from the dextran fraction using, for example, graded ethanol precipitation, which is both tedious and difficult to control on a large scale (Côté et al. 1997; Park and Khan 2009). Another way is to separate the crude mixture of both enzymes and use the isolated ASR for the alternan or oligoalternan synthesis, which also requires some additional procedures (dextran enzymatic remove, chromatography). Thus, both approaches are somewhat limited and were more widely used in the early stages of alternan studies (Côté et al. 1997; López-Munguía et al. 1993; Park and Khan 2009). Nowadays, a more preferable and relevant way is the improvement of *L. mesenteroides* strains to enhance the ASR production and to obtain a strain that produces only this enzyme, which can be achieved using mutant producers and molecular techniques. It should be noted that although some new alternan producing strains are isolated (Amari et al. 2015; Bounaix et al. 2010; Wangpaiboon et al. 2018) the number of sufficiently efficient producers is still limited (Argüello-Morales et al. 2000; Monsan et al. 2001) and the best known are *L. mesenteroides* NRRL B-1355, NRRL B-1501 and NRRL B-1498. These producers, most notably the strain NRRL B-1355, have been used either for the direct production of ASR and alternan derivatives (López-Munguía et al. 1993; Raemaekers and Vandamme 1997) or to obtain mutant strains (Leathers et al. 1995, 1997; Smith and Zahnley 1997; Smith et al. 1998), in which the amount of ASR has been substantially elevated and the overall properties improved. The acquisition of such

mutant strains, in turn, has facilitated a further research by molecular and biochemical techniques, such as the development of a more stable and efficient ASR (Joucla et al. 2006) or a highly productive method for the obtaining of oligoalternans (penta-, hexa- and hepta-saccharides) (Côté and Sheng 2006). It has been shown that alternan can be produced not only in microbial systems but also in plants, such as potato tubers, by expressing a mature ASR gene from *L. mesenteroides* NRRL B-1355 in potato (Kok-Jacon et al. 2007). ASR can be used not only for the production of alternan and its oligosaccharides, but also as a biotransformation agent to perform the transformation of the low-calorie sweetener stevioside, a diterpenoid glycoside, by the enzyme from *L. citreum* CCTCC M 2011398 and achieving a high transglycosylation yield (Musa et al. 2014). As with dextran production, the progress and outcome of alternan and ASR obtaining are influenced by many environmental factors such as sucrose concentration, nitrogen and mineral sources and their concentrations, pH, temperature, aeration level, duration of process (Côté et al. 1997; Vettori et al. 2012a, b; Naessens et al. 2005; López-Munguía et al. 1993; Raemaekers and Vandamme 1997) and an adequate selection and control of their levels is required. There is no doubt that optimizing these factors according to the RSM methodology (Esmaeilnejad-Moghadam et al. 2019; Vettori et al. 2012b), which, in the case of alternan, remains the next research challenge, would make a significant contribution in this regard. However, in the light of recent developments (Charoenwangpaiboon et al. 2019; Frohberg et al. 2009; Yilmaz et al. 2020), the production of alternan and its oligosaccharides is expected to increase in the near future, as well as the applications in both food and medical fields.

Levan and inulin: the fructose polymers synthesized by *Leuconostoc* spp

Biosynthesis, structure and properties

The ability of *Leconostoc* spp. to form fructan-type polymers in addition to glucans has long been reported (Corrigan and Robyt 1979; Han 1990) although the number of such producers remains still much lower(Côté and Robyt 1982) compared to bacteria of other genera (*Zymomonas*, *Streptococcus*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Gluconacetobacter*) (Jakob et al. 2012; Jathore et al. 2012; Kornmann et al. 2003; Tomulescu et al. 2016). Fructose polymers are produced extracellularly from sucrose-based substrates by bacterial fructosyltransferases which are multifunctional enzymes capable of directly converting sucrose into highly polymerized levan or inulin. Levan (Fig. 1) is the most important and widely represented bacterial fructan and is synthesized by levansucrase (EC 2.4.10), an extracellular fryctosyltransferase[3] that catalyses the transfer of D-fructosyl units from sucrose to a growing acceptor molecule, their polymerization by formation of β-(2,6) linkages in linear chains with β-2,1 linkages for branching points and the release of glucose residues. As in the case of dextran production (He et al. 2014), such a co-product released in the biosynthesis of fructose polymers is suitable and beneficial for a further fermentation into ethanol by *Z. mobilis* (Shih et al. 2010). Another fructose polymer inulin (Fig. 1) is formed in a similar way, by the related enzyme inulosucrase[4] (EC 2.4.1.9) although with a different structure and linkage type, containing β-(2,1) linked fructose molecules in the main chain and β-(2,6) ramifications (Vallejo-García et al. 2019; Mensink et al.2015). In addition, the presence of inulosucrase has been reported only in some genera of gram-positive bacteria, including *Leuconostoc* spp., which may additionally contain levansucrases (Table 1). while the occurrence of levansucrases is widespread in gram-positive and gram-negative bacteria (Anwar et al. 2010; Olvera et al. 2007; Öner et al. 2016; Vallejo-García et al. 2019).

Biomedical and technological applications

It has been repeatedly emphasized that levan stands out from other microbial polymers by its unique combination of properties such as strong adhesivity, self-assembly into spherical colloids, very low intrinsic viscosity and high biocompatibility, which in turn make it a very valuable polymer for various applications in biomedical field, cosmetic, pharmaceutical, food and other industries (Combie and Öner 2018; Erkorkmaz et al. 2018; González-Garcinuño et al. 2017; Öner et al. 2016; Tomulescu et al. 2016). Thus, levan can be used in medicine as a plasma substitute, source of fructose, anti-inflammation, detoxifying agent, drug activity promoter and a broad-spectrum immunomodulator having radio-protector properties and anti-tumor activity (González-Garcinuño et al. 2017; Han 1990; Kang et al. 2009; Srikanth et al. 2015a). Due to its prebiotic properties, levan can be used as an additive in functional foods to have a beneficial effect on the intestinal microflora (Kang et al. 2009; Srikanth et al. 2015b). Besides, levan can also be applied as a thickener, emulsifier, encapsulating agent, as a carrier of color and flavor in food as well as pharmaceutical and cosmetic industries (Donot et al. 2012; Patel and Prajapati 2013; Semjonovs et al. 2017).

In recent years, particular attention has been given to the use of the adhesive properties of levan, which opens wide prospects in both technical and biomedical fields (Combie

[3] https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.10.

[4] https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.9.

and Öner 2018; Costa et al. 2013; Patel et al. 2012). There are a number of reports describing the exceptional bonding capacity of levan (Combie and Öner 2018) as a binder for manufactured wood (Revin et al. 2016a, b), fiberglass (Van Herwijnen et al. 2011), foundry sand cores (Thiel 2009) and also a bare aluminium (Combie et al. 2004). There is a lot of research on the use of levan as a bioadhesive in tissue engineering, drug delivery systems and scaffolds for wound healing (Combie and Öner 2018). Adhesive properties obviously are essential for the film forming capacity of levan. Although levan is a suitable film former, it is quite brittle without additives, which makes it difficult to obtain stand-alone films and therefore should be blended with suitable plasticizers, other polymers or binders for this purpose (Chen et al. 2014; Giavasis 2013). Thus, when levan is blended with plasticizer, such as glycerol, elastic and extrudable films can be formed (Barone and Medynets 2007) and nanocomposites with improved thermal and mechanical properties, composed of montmorillonite clay blended with levan, obtained (Chen et al. 2014). Levan films suitable for food coatings and packaging materials were prepared using aqueous solutions of levan (5 ÷ 6% w/w) containing corn starch (0.05%) as a filler (Huber et al. 1994). Similarly, edible films were produced by a casting procedure using aqueous solutions of levan (0.6 ÷ 0.9% w/w), cassava starch (2.1 ÷ 2.4%) and glycerol (6%) as a plasticizer (Mantovan et al. 2018). More complex ternary blend films consisting of levan (13% w/w) chitosan (52.2 ÷ 78.3%) and polyethylene oxide (8.7 ÷ 34.8%) were also prepared, expected to have find uses as active food packaging, hemodialysis membrane and artificial skin materials (Bostan et al. 2014). Films composed of levan (4% w/w) and glycerol (0.4%) have also proven to be very suitable for the development of transient microelectronic devices such as bioresorbable electronic implants and drug release systems (Kwon et al. 2018). To achieve enhanced medical and biological performance, there are also good prospects for the use of levan derivatives, such as phosphonated levan, for the production of multilayer films (Costa et al. 2013). Over the last decade, advanced modern techniques such as matrix-assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) (Sima et al. 2011, 2012) and electrospinning methods (Manandhar et al. 2009) have become increasingly important for the production of levan-containing films for a wide variety of medically relevant biomaterials (Combie and Öner 2018). Compared to levan, the use of inulin, also of bacterial origin, is more limited and includes mainly functional food and some biomedical fields. Inulin and its related oligosaccharides (IOS) are among the best known, widely used and commercially important prebiotics (Lynch et al. 2018). This is due to the fact that inulin is able to resist hydrolysis by digestive enzymes, but at the same time has a beneficial effect on the gastrointestinal microflora of the host organism which generally leads to the strengthening of immunity (Patel et al. 2012; Patel and Prajapati 2013; Oritz-Soto et al. 2004). Thus, the use of inulin in functional food is based mainly on its prebiotic properties (Patel and Prajapati 2013) although its applications serve many purposes (Mensink et al. 2015). Inulin is employed as a dietary fiber, as a fat replacer and a low calorie sweetener, provides viscosity, texture, gel-forming and stability, as well as improves organoleptic properties of several dairy (cheese, milk, yoghurt, ice cream) and non-dairy (bread, biscuits, cereal, meat) products (González-Herrera et al. 2015; Mensink et al. 2015; Meyer et al. 2011; Oritz-Soto et al. 2004; Srisuvor et al. 2013). A number of physiological and biochemical effects of inulin have been confirmed applicable for direct pharmaceutical or medical use, for example, in targeted drug delivery in anticancer therapy (Imran et al. 2012; Pool-Zobel 2005; Taper and Roberfroid 2002), as an adjuvant for vaccines (Honda-Okubo et al. 2012), stabilization of protein-based pharmaceuticals (Hinrichs et al. 2001; Tonnis et al. 2015), as signals, in stimulating immune cell activity through receptor-mediated signaling (Peshev and Van den Ende 2014). Inulin has less industrial applications and, in general, requires various chemical modifications (reduction, oxidation, esterification, etherification) for these purposes, which in turn result in a number of valuable products, including biodegradable surfactants based on this polymer (Stevens et al. 2001). It is therefore reasonable to conclude that both levan and inulin have an extensive potential and are already widely used in a variety of fields ranging from medicine to technology, which in turn requires their efficient and economically viable production.

Production methods, strains and optimum conditions

As with glycans, microbial synthesis of fructose polymers can be performed using the *Leuconostoc* spp. (Table 1) in whole cell systems or by cell-free enzymatic reactions. However, the formation of levan and dextran in *Leuconostoc* cultures mostly occurs simultaneously (Bounaix et al. 2009; Siddiqui et al. 2014; Torres-Rodriguez et al. 2014; Vasileva et al. 2012), which makes it difficult to separate the individual fructan and thus favors the enzymatic cell-free method. There are only a few studies confirming the formation of individual levan using producers of *Leuconostoc* spp. (Han et al. 2015; Khudair et al. 2018; Salman et al. 2019; Taylan et al. 2019) and their yields are also somewhat lower compared to several dextran producing strains (Chagas et al. 2007; Onilude et al. 2013; Vedyashkina et al. 2015). Thus, using the producer *Leuconostoc citreum* BD1707 (CGMCC 6431) in a tomato juice medium supplemented with 15% sucrose, the levan concentration reached 28 g/L (0.29 g/L/h) (Han et al. 2015). In turn, the *L. mesenteroides* ssp. *cremoris* isolate in the synthetic medium (20 g/L sucrose) has produced 9.23 g/L (0.426 g/L/h) levan, which had a strong

inhibitory effect on the growth and virulence factors of *Candida albicans* (Salman et al. 2019). Another but taxonomically identical isolate of *L. mesenteroides* ssp. *cremoris* LF5 in a similar synthetic medium (sucrose 20 g/L) attained an even higher levan concentration of 14.82 g/L (0.618 g/L/h) (Khudair et al. 2018), while somewhat lower productivity (13.2 g/L; 0.183 g/L/h) was shown by the strain *L. mesenteroides* S81 in the modified BHI (ATCC 2187) medium (Taylan et al. 2019). Like whole culture studies, the use of *Leuconostoc* spp. levansucrases for levan biosynthesis in cell-free systems is a relatively recent research topic and so far without real technological applications (Iliev et al. 2018; Kang et al. 2011). Nevertheless, a number of studies have confirmed that this enzyme, which has been comprehensively described for several *Leuconostoc* spp. strains (Iliev et al. 2018; Ishida et al. 2016; Jadaun et al. 2019; Kang et al. 2005; Morales-Arrieta et al. 2006) can be characterized by a high specificity, activity and stability and is therefore suitable for the synthesis of both levan and related oligosaccharides in cell-free systems, generally performed by the relevant recombinant levansucrases. To obtain such recombinant enzymes, the levansucrase genes are isolated from the corresponding *Leuconostoc* spp. strains, then sequenced and cloned into selected heterologous expression systems, which may be of either bacterial (mostly *E.coli*) (Iliev et al. 2018; Ishida et al. 2016; Jadaun et al. 2019; Kang et al. 2005; Morales-Arrieta et al. 2006; Xu et al. 2017) or yeast (*Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*) origin (Franken et al. 2013; Kang et al. 2011). Levan synthesis is performed with isolated and purified recombinant enzyme in chemically defined media, under the optimal conditions (sucrose, enzyme and metal ion concentrations, pH, temperature) for the each particular reaction (Jadaun et al. 2019; Kang et al. 2005). The recombinant levan sucrose reaction can also occur in the whole culture systems, i.e., in the presence of expressing cells, as shown for the *L. mesenteroides* M1FT levansucrase expression in *S. cerevisiae*, where levan accumulates in both growth medium (6.5 g/L) and yeast cells (Franken et al. 2013). It should be noted that not only pure sucrose but also various raw materials containing it, such as sugarcane molasses, unrefined sugar, sweet sorghum juice (Jadaun et al. 2019) can be used for the enzymatic synthesis of levan. Although recombinant levansucrases are primarily used to produce levan and related fructooligosaccharides (FOS), other applications are possible, for example the production of melibiose from raffinose, by the enzyme expressed in *E. coli* according the levansucrase gene (GenBank accession No AY665464) of *L. mesenteroides* (Xu et al. 2017). Compared to levan, both the whole culture method and the enzymatic synthesis so far are even less frequently used for the production of microbial inulin, as currently only a few sequences of bacterial inulosucrases have been fully described (Anwar et al. 2008, 2010; Ortiz-Soto et al. 2004; van Hijum et al. 2002) and none of them have reached an application status neither for inulin synthesis nor for production of related oligosaccharides (FOS) (Vallejo-García et al. 2019). However, inulin and FOS synthesized by microbial processes remain still considered (Vallejo-García et al. 2019) to be a viable alternative to the fructans of vegetable origin that have been dominant so far (Olivares-Illana et al. 2002; Mensink et al. 2015;Vallejo-García et al. 2019) and some promising results have also been achieved (Ozimek et al. 2006; Peña-Cardeña et al. 2015; Wada et al. 2005). Only one strain *L. citreum* CW28 of *Leuconostoc* spp. has been studied very comprehensively and currently reported as capable of producing inulosucrase with the required characteristics for the enzymatic synthesis of inulin and/or FOS (Olivares-Illana et al. 2002, 2003; Oritz-Soto et al. 2004; Peña-Cardeña et al. 2015; Vallejo-García et al. 2019). A bacterial strain from *Leuconostoc* spp. with a strong fructosyltransferase activity was isolated and identified as *L. citreum* CW28, as well as determined that such activity, being specific for inulin synthesis, refers to the high (170 kDa) molecular mass cell wall-associated insoluble enzyme which can be solubilized by the urea treatment (Olivares-Illana et al. 2002) and the peculiarity of this enzyme apparently allows the synthesis of inulin by both whole culture and cell-free methods. Subsequent studies using conventional molecular and biochemical techniques have identified and characterized the islA gene, which is a coding gene for inulosucrase and has been sequenced, cloned and expressed in *E. coli* (Olivares-Illana et al. 2003). It was also found that islA inulosucrase has a kind of chimeric multidomain structure, where the structural and modular features of the C- and N-terminal domains correspond to glycosyltransferases and only the second, i.e., the catalytic domain, has fructosyltransferase properties (Del Moral et al. 2008; Olivares-Illana et al. 2003). Studies of the catalytic properties of *L. citreum* CW28 inulosucrase have shown that high sucrose concentrations (≈ 250 g/L) are required for maximal fructose transfer and that the cell-associated enzyme produces high molecular weight inulin (1350 ÷ 1600 kDa) while the use of a solubilized enzyme results in a more extensive proportion of smaller size (2.6 ÷ 3.4 kDa) inulin (Ortiz-Soto et al. 2004). According to the whole culture method in a 30 L pilot plant with 250 g/L sucrose and using the cell-associated inulosucrase 76% transformation of substrate and concentration of inulin 95 g/L (2.375 g/L/h) were achieved (Ortiz-Soto et al. 2004), indicating a relatively efficient and productive process of enzymatic synthesis. In recent years research has focused more on the production of FOS than on inulin itself using different but equally efficient approaches (Peña-Cardeña et al. 2015; Vallejo-García et al. 2019). Thus, cloning and expression in *E. coli* of the truncated form, retaining only the catalytic domain islA4 of the *L. citreum* CW28 inulosucrase gene islA, has been shown to inhibit

inulin formation, increase the hydrolytic activity of the enzyme and shift the specifity of the reaction towards FOS synthesis if high sucrose concentrations (400 ÷ 700 g/L) and an appropriate enzyme activity (1÷5 U/mL) from the *E. coli* cell-free extract are used (Peña-Cardeña et al. 2015). Another approach to the production of inulin-type FOS is based on the combined use of two enzymes that simultaneously perform both inulin synthesis and hydrolysis reactions (Vallejo-García et al. 2019). Using the whole culture method, the first of these is performed by the cell-associated inulosucrase (islA) of *L. citreum* CW28, and the resulting high molecular mass inulin is hydrolyzed by the commercially available (Novozym 960) endoinulinase of *Aspergillus niger*. The reactions are favored by a high concentration of sucrose (250 g/L) and a defined (5:10) IslA/endoinulinase activity ratio, providing almost complete (96.7% ± 3.3%) substrate conversion and a high yield of broad spectrum (mainly of 6÷8 fructose residues) oligosaccharides (Vallejo-García et al. 2019). It should be noted that elements of the *L. citreum* CW28 islA structure, such as the C-domain, can also be employed in the design of chimeric levansucrases resulting in a substantially improved enzyme activity (Olvera et al. 2012). So there are good grounds to believe that the use of *Leuconostoc* spp. levansucrases and inulosucrases have definite prospects for the production of fructose polymers and oligomers, although further research and scale-up of processes are needed.

Conclusions

Lactic acid bacteria of the genus *Leuconostoc* have a high biosynthetic potential for the formation of structurally diverse EPS, mostly homopolysaccharides (HoPS), as they may harbor a set of multiple highly versatile glucansucrases and fructansucrases.

These HoPS, characterized by valuable functional properties, have a wide range of actual and potential applications, mainly in the food and medical fields.

Both the production of glucose and fructose polymers by the direct whole-culture fermentation or their production by the enzymatic cell-free method depend on a large number of nutritional and environmental factors the levels, changes of which significantly affect the yield and properties of the EPS obtained, and their actual efficiency are extremely strain-dependent.

The formation of HoPS in *Leuconostoc* cultures mostly occurs simultaneously, which makes it difficult to separate the individual fructan or glucan polymer and thus favors the enzymatic cell-free method, using either individual enzymes isolated from the culture medium or the relevant recombinant glucansucrases or fructansucrases.

Various optimization techniques, particularly the response surface methodology (RSM), should be considered as a favourable strategy and a convenient tool as well as introduced much more widely to objectively select the relevant factors and determine their optimal levels in order to maximize the formation of glucose and fructose polymers, by the producing strains of *Leuconostoc* spp.

The ability to use renewable and cheaper resources such as agro-industrial and waste should be considered as the *Leuconostoc* spp. advantage to be used to achieve more cost-effective and environmentally friendly production of extracellular polysaccharides.

The use of *Leuconostoc* spp.has definite and evolving prospects for a commercially viable production of both glucose and fructose polymers and oligomers which is expected to increase in the near future, although further research and scale-up of processes are needed.

Funding This study was supported by the Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia (grant number 19-00-A01612-000004). The funders had no role in study design, data collection and interpretation or the decision to submit the work for publication.

Data availability The datasets used and/or analysed during the current study are available from the first author on reasonable request and/or are freely accessible via the Internet.

Compliance with ethical standards

Conflicit of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

Ahmad NH, Mustafa S, Che Man YB (2014) Microbial polysaccharides and their modification approaches: a review. Int J Food Prop 18:332–347. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.693561

Amari M, Valérie G, Robert H, Morel S, Moulis C, Gabriel B et al (2015) Overview of the glucansucrase equipment of *Leuconostoc citreum* LBAE-E16 and LBAE-C11, two strains isolated from sourdough. FEMS Microbiol Lett 362:1–8. https://doi.org/10.1093/femsle/fnu024

Angelina, Vijayendra SVN (2015) Microbial biopolymers: the exopolysaccharides. In: Kalia V (ed) Microbial factories. Springer, New Delhi, pp 113–125

Anwar MA, Kralj S, Van Der Maarel MJEC, Dijkhuizen L (2008) The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. Appl Environ Microbiol 74:3426–3433. https://doi.org/10.1128/Aem.00377-08

Anwar MA, Kralj S, Piqué AV, Leemhuis H, Van Der Maarel MJEC, Dijkhuizen L (2010) Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. Microbiology 156:1264–1274. https://doi.org/10.1099/Mic.0.036616-0

Argüello-Morales MA, Remaud-Simeon M, Pizzut S, Sarcabal P, Willemot R-M, Monsan P (2000) Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. FEMS Microbiol Lett 182:81–85. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08878.x

Ates O (2015) Systems biology of microbial exopolysaccharides production. Front Bioeng Biotechnol 3:200. https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200

Azmeera V, Adhikary P, Krishnamoorthi S (2012) Synthesis and characterization of graft copolymer of Dextran and 2-Acrylamido-2-methylpropane sulphonic acid. Intern J Carbohydr Chem 2012:1–7. https://doi.org/10.1155/2012/209085

Barcelos MCS, Vespermann KAC, Pelissari FM, Molina G (2019) Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. Crit Rev Food Sci Nutr 60:1475–1495. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1575791

Barone JR, Medynets M (2007) Thermally processed levan polymers. Carbohydr Polym 69:554–561. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.01.017

Behravan J, Fazly Bazzaz BS, Salimi Z (2003) Optimization of dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen. Biotechnol Appl Biochem 38:267–269. https://doi.org/10.1042/ba20030084

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta 76:965–977. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019

Björkroth J, Dicks LMT, Endo A, Holzapfel WH (2014) The genus *Leuconostoc*. In: Holzapfel WH, Wood BJB (eds) Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. Wiley, New York, pp 391–404. https://doi.org/10.1002/9781118655252

Bostan MS, Mutlu EC, Kazak H, Sinan Keskin S, Öner ET, Eroglu MS (2014) Comprehensive characterization of chitosan/PEO/levan ternary blend films. Carbohydr Polym 102:993–1000. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.096

Bounaix M-S, Gabriel V, Morel S, Robert H, Rabier P, Remaud-Siméon M, Gabriel B, Fontagné-Faucher C (2009) Biodiversity of Exopolysaccharides Produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. J Agric Food Chem 57:10889–10897. https://doi.org/10.1021/jf902068t

Bounaix M-S, Gabriel V, Morel S, Robert H, Rabier P, Remaud-Siméon M, Gabriel B, Fontagné-Faucher C (2010) Characterization of glucan-producing *Leuconostoc* strains isolated from sourdough. Int J Food Microbiol 144:1–9. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.026

Chagas CMA, Honorato TL, Pinto GAS, Maia GA, Rodrigues S (2007) Dextransucrase production using cashew apple juice as substrate: effect of phosphate and yeast extract addition. Bioprocess Biosyst Eng 30:207–215. https://doi.org/10.1007/s00449-007-0117-0

Charoenwongpaiboon T, Supraditaporn K, Phatchanat Klaimon P, Wangpaiboon K, Pichyangkura R, Issaragrisilb S, Lorthongpanich Ch (2019) Effect of alternan versus chitosan on the biological properties of human mesenchymal stem cells. RSC Adv 9:4370–4379. https://doi.org/10.1039/c8ra10263e

Chen X, Gao H, Ploehn HJ (2014) Montmorillonite-levan nanocomposites with improved thermal and mechanical properties. Carbohydr Polym 101:565–573. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.073

Combie J, Öner ET (2018) From healing wounds to resorbable electronics, levan can fill bioadhesive roles in scores of markets. Bioinspir Biomim 14:011001. https://doi.org/10.1088/11748-3190/aa-ed92

Combie J, Haag A, Suci P, Geesey G (2004) Adhesive produced by microorganisms. In: Nelson W (ed) Agricultural applications of green chemistry. ACS, Washington, pp 53–62

Corrigan A, Robyt JF (1979) Nature of the Fructan of *Streptococcus mutans* OMZ 176. Infect Immunity 26:387–389

Costa RR, Netol AII, Calgeris I, Correia CR, Pinho ACM, Fonseca J, Öner TE, Mano JF (2013) Adhesive nanostructured multilayer films using a bacterial exopolysaccharide for biomedical applications. J Mater Chem B1:2367–2374. https://doi.org/10.1039/c3tb20137f

Côté GL (1992) Low-viscosity a-D-glucan fractions derived from sucrose which are resistant to enzymatic digestion. Carbohydr Polym 19:249–252. https://doi.org/10.1016/0144-8617(92)90077-4

Côté GL (2009) Acceptor products of alternansucrase with gentiobiose. Production of novel oligosaccharides for food and feed and elimination of bitterness. Carbohydr Res 344:187–190. https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.10.017

Côté GL, Robyt JF (1982) Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1-6), (1-3)-d-glucan. Carbohydr Res 101:57–74. https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)80795-8

Côté GL, Sheng S (2006) Penta-, hexa-, and heptasaccharide acceptor products of alternansucrase. Carbohydr Res 341:2066–2072. https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.04.044

Côté GL, Leathers TD, Ahlgren JA, Wyckoff HA, Hayman T, Biely P (1997) Alternan and highly branched limit dextrans: low-viscosity polysaccharides as potential new food ingredients. In: Okai H, Mills O, Spanier AM, Tamura M (eds) Chemistry of novel foods. Allured Publ, Illinois, pp 95–109

Cutiongco MFA, Tan MH, Ng MYK, Le Visage C, Yim EKF (2014) Composite pullulan–dextran polysaccharide scaffold with interfacial polyelectrolyte complexation fibers: a platform with enhanced cell interaction and spatial distribution. Acta Biomater 10:4410–4418. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.029

Das D, Goyal A (2012) Lactic acid bacteria in food industry. In: Okai H, Mills O, Spanier AM, Tamura M (eds) Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology. Springer, New Dehli, pp 757–772. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2214-9_33

Davidović S, Miljković M, Tomić M, Gordić M, Nešić A, Dimitrijević S (2018) Response surface methodology for optimisation of edible coatings based on dextran from *Leuconostoc mesenteroides* T3. Carbohydr Polym 184:207–213. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.061

De Belder AN (2003) Dextran. Amersham biosciences, AA Edition, www.amershambiosciences.com. 18-1166-12. Accessed 15 March 2020

Del Moral S, Olvera C, Rodriguez ME, Munguia AL (2008) Functional role of the additional domains in inulosucrase (IslA) from *Leuconostoc citreum* CW28. BMC Biochem 9:6. https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-6

Donot F, Fontana A, Baccou JC, Schorr-Galindo S (2012) Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydr Polym 87:951–962. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083

El-Meliegy E, Abu-Elsaad NI, El-Kady AM et al (2018) Improvement of physico-chemical properties of dextran-chitosan composite scaffolds by addition of nano-hydroxyapatite. Sci Rep 8:12180. https://doi.org/10.1038/s41598-018-30720-2

Elschner T, Obst F, Stana-Kleinschek K, Kargl R, Heinze T (2017) Synthesis and film formation of furfuryl- and maleimido carbonic acid derivatives of dextran. Carbohydr Polym 161:1–9. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.038

Erkorkmaz BA, Kirtel O, Ateş Duru Ö et al (2018) Development of a cost-effective production process for *Halomonas* levan. Bioprocess Biosyst Eng 41:1247–1259. https://doi.org/10.1007/s00449-018-1952-x

Esmaeilnejad-Moghadam B, Mokarram RR, Hejazi MA, Khiyabani MS, Keivaninahr F (2019) Low molecular weight dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* strains: optimization of a new culture medium and the rheological assessments. Bioact Carbohydr Diet Fibre. https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2019.100181

Falconer DJ, Mukerjea R, Robyt JF (2011) Biosynthesis of dextrans with different molecular weights by selecting the concentration of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextransucrase, the sucrose concentration, and the temperature. Carbohydr Res 346:280–284. https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.024

Fl Santos, de Amorim GM (2018) Biotechnological challenges and perspectives using exopolysaccharides. J Anal Pharm Res 7:264–266. https://doi.org/10.15406/japlr.2018.07.00236

Franken J, Brandt BA, Tai SL, Bauer FF (2013) Biosynthesis of levan, a bacterial extracellular polysaccharide, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE 8:e77499. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077499

Frohberg C, Worverg W, Rodosta S (2009) Alternan derivatives. US Patent US 9920138B2 16 Oct 2009

Gahlawat G, Srivastava AK (2017) Model-based nutrient feeding strategies for the increased production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus*. Appl Biochem Biotechnol 183:530–542. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2482-8

Gangoiti J, Corwin SF, Lamothe LM, Vafiadi C, Hamaker BR, Dijkhuizen L (2018) Synthesis of novel α-glucans with potential health benefits through controlled glucose release in the human gastrointestinal tract. Crit Rev Food Sci Nutr. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1516621

Giavasis I (2013) Production of microbial polysaccharides for use in food. In: Brian McNeil B, Archer D, Giavasis I, Harvey L (eds) Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals. Woodhead Publishing Ltd, Oxford, pp 413–468. https://doi.org/10.1533/9780857093547.2.413

González-Garcinuño Á, Tabernero A, Domínguez Á, Galán MA, Martin del Valle EM (2017) Levan and levansucrases: polymer, enzyme, micro-organisms and biomedical applications. Biocatal Biotransform 36:233–244. https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1314467

González-Herrera SM, Herrera RR, López MG, Rutiaga OM, Aguilar CN, Esquivel JCC, Martínez LAO (2015) Inulin in food products: prebiotic and functional ingredient. Br Food J 117:371–387. https://doi.org/10.1108/bfj-09-2013-0238

Goyal A, Katiyar SS (1997) Effect of certain nutrients on the production of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. J Basic Microbiol 37:197–204. https://doi.org/10.1002/jobm.3620370308

Grimaud F, Faucard P, Tarquis L, Pizzut-Serin S, Roblin P, Morel S et al (2018) Enzymatic synthesis of polysaccharide-based copolymers. Green Chem 20:4012–4022. https://doi.org/10.1039/c8gc01251b

Hamsan MH, Shukur MF, Aziz S, Kadir MFZ (2019) Dextran from *Leuconostoc mesenteroides*-doped ammonium salt-based green polymer electrolyte. Bull Mater Sci 42:57. https://doi.org/10.1007/s12034-019-1740-5

Han YW (1990) Microbial levan. Adv Appl Microbiol 35:171–194. https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)70244-21

Han J, Xu X, Gao C, Liu Z, Wu Z (2015) Levan-producing *Leuconostoc citreum* strain BD1707 and its growth in tomato juice supplemented with sucrose. Appl Environ Microbiol 82:1383–1390. https://doi.org/10.1128/AEM.02944-15

Harutoshi T (2013) Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. Biochemistry, genetics and molecular biology. In: Kongo ML (ed) Lactic acid bacteria: R and D for food, health and livestock purposes. Rijeka, InTech, pp 222–238

Hasselwander O, DiCosimo ZY, Cheng Q, Rothman SC, Suwannakham S, Baer ZC, Roesch BM, Ruebling-Jass KD, Lai JP et al (2017) Development of dietary soluble fibres by enzymatic synthesis and assessment of their digestibility in in vitro, animal and randomised clinical trial models. Int J Food Sci Nutr 68:849–864. https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1295027

He M, Qin H, Yin X, Ruan Z, Tan F, Wu B, Shui Z, Dai L, Hu Q (2014) Direct ethanol production from dextran industrial waste water by *Zymomonas mobilis*. Korean J Chem Eng 31:2003–2007. https://doi.org/10.1007/s11814-014-0108-1

Heinze T, Liebert T, Heublein B, Hornig S (2006) Functional polymers based on dextran. In: Klemm D (ed) Polysaccharides II. Springer, Berlin, pp 199–291

Hemme D, Foucaud-Scheunemann C (2004) Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. Int Dairy J 14:467–494. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.005

Hinrichs WL, Prinsen M, Frijlink H (2001) Inulin glasses for the stabilization of therapeutic proteins. Int J Pharm 215:163–174. https://doi.org/10.1016/s0378-5173(00)00677-3

Honda-Okubo Y, Saade F, Petrovsky N (2012) Advax™, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, provides improved influenza vaccine protection through broad-based enhancement of adaptive immune responses. Vaccine 30:5373–5381. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.021

Huber AE, Kaplan DL, Viney C (1994) Liquid crystallinity of levan/water/starch solutions. J Polym Environ 2:195–199. https://doi.org/10.1007/bf02067445

Hussain A, Zia KM, Tabasum S, Noreen A, Ali M, Iqbal R, Zuber M (2017) Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: a review. Int J of Biol Macromol 94:10–27. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104

Iliev I, Vasileva T, Bivolarski V, Salim A, Morel S, Rabier P, Gabriel V (2018) Optimization of the expression of levansucrase L17 in recombinant *E. Coli*. Biotechnol Biotechnol Equip 32:477–486. https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1431056

Imran S, Gillis RB, Kok SM, Harding SE, Adams GG (2012) Application and use of Inulin as a tool for therapeutic drug delivery. Biotechnol Genet Eng Rev 28:33–46. https://doi.org/10.5661/bger-28-33

Ishida R, Sakaguchi K, Matsuzaki C, Katoh T, Ishida N, Yamamoto K, Hisa K (2016) Levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 produces a levan exopolysaccharide with immunomodulating activity. Biotechnol Lett 38:681–687. https://doi.org/10.1007/s10529-015-2024-9

Jadaun JS, Narnoliya LK, Agarwal N, Singh SP (2019) Catalytic biosynthesis of levan and short-chain fructooligosaccharides from sucrose-containing feedstocks by employing the levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* MTCC10508. Int J Biol Macromol 127:486–495. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.070

Jakob F, Steger S, Vogel RF (2012) Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads. Eur Food Res Technol 234:493–499. https://doi.org/10.1007/s00217-011-1658-7

Jathore NR, Bule MV, Tilay AV, Annapure US (2012) Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: characterization and medium optimization for enhanced production. Food Sci Biotechnol 21:1045–1053. https://doi.org/10.1007/s10068-012-0136-8

Jeanes A, Haynes WC, Wilham CA (1956) Characterization of dextrans from four types of *Leuconostoc mesenteroides*. J Bacteriol 71:167–173

Jeong MS, Noh D-H, Hong E, Lee KS, Kwon T-H (2019) Systematic modeling approach to selective plugging using in situ bacterial biopolymer production and its potential for microbial-enhanced

oil recovery. Geomicrobiol J 36:468–481. https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1573277

Joucla G, Pizzut S, Monsan P, Remaud-Simeon M (2006) Construction of a fully active truncated alternansucrase partially deleted of its carboxy-terminal domain. FEBS Lett 580:763–768. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.001

Kadajji VG, Betagari GV (2011) Water soluble polymers for pharmaceutical applications. Polymers 3:1972–2009. https://doi.org/10.3390/polym3041972

Kang HK, Seo MY, Seo ES, Kim D, Chung SY, Kimura A, Robyt JF (2005) Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta 1727(1):5–15. https://doi.org/10.1016/j.bbaex p.2004.10.012c

Kang SA, Jang K-H, Seo J-W, Kim KH, Kim YH, Rairakhwada D, Seo MY, Lee JO, Ha SD, Kim Ch-H, Rhee S-K (2009) Levan: applications and perspectives. In: Rehm BHA (ed) Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives. Caister Academic Press, U.K., pp 145–161

Kang HK, Yun SI, Lim TY, Xia Y-M, Kim D (2011) Cloning of Levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* and its Expression in *Pichia pastoris*. Food Sci Biotechnol 20:77–281. https://doi.org/10.1007/s10068-011-0039-0

Kanimozhi J, Sivasubramanian V, GaneshMoorthy I, Sivashankar R (2019) Influence of Dextransucrase of Weissella Cibaria Nitcsk4 on low molecular weight Dextran yield: a statistical approach using mixed level taguchi design and artificial neural network. Int J Innov Technol Explor Eng 9:657–664. https://doi.org/10.35940/ijitee.B1161.1292S219

Khudair AY, Salman JAS, Ali Ajah H (2018) Production of Levan from locally *Leuconostoc mesensteroides* isolates. J Pharm Sci Res 10:3372–3378

Kim JF, Jeong H, Lee J-S, Choi S-H, Ha M, Hur C-G et al (2008) Complete genome sequence of *Leuconostoc citreum* KM20. J Bacteriol 190:3093–3094. https://doi.org/10.1128/JB.01862-07

Kok-Jacon GA, Vincken J-P, Suurs LCJM, Wang D, Liu S, Visser RGF (2007) Expression of alternansucrase in potato plants. Biotechnol Lett 29:1135–1142. https://doi.org/10.1007/s10529-007-9348-z

Kornmann H, Duboc P, Marison I, von Stockar U (2003) Influence of nutritional factors on the nature, yield, and composition of exopolysaccharides produced by *Gluconacetobacter xylinus* I-2281. Appl Environ Microbiol 69:6091–6098. https://doi.org/10.1128/aem.69.10.6091-6098.2003

Kothari D, Das D, Patel S, Goyal A (2014) Dextran and food application. In: Ramawat K, Mérillon JM (eds) Polysaccharides. Springer, Cham, pp 735–752. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6_66-1

Kumar AS, Mody K, Jha B (2007) Bacterial exopolysaccharides—a perception. J Basic Microbiol 47:103–117. https://doi.org/10.1002/jobm.200610203

Kwon G-J, Sunwoo SH, Lee S, Jo YJ, Choi CH, Hwang S-W, Kim T-I (2018) Biosafe, eco-friendly levan polysaccharide toward transient electronics. Small 14:1801332. https://doi.org/10.1002/smll.201801332

Lakshmi Bhavani A, Nisha J (2010) Dextran—the polysaccharide with versatile uses. Int J Pharma Bio Sci 1:569–573

Leathers TD, Hayman GT, Cote GL (1995) Rapid screening of *Leuconostoc mesenteroides* mutants for elevated proportions of alternan to dextran. Curr Microbiol 31:19–22. https://doi.org/10.1007/bf00294628

Leathers TD, Ahlgren JA, Cote GL (1997) Alternansucrase mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-21138. J Ind Microbiol Biotechnol 18:278–283. https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900380

Leathers TD, Nunnally MS, Ahlgren JA, Cote GL (2003) Characterization of a novel modified alternan. Carbohydr Polym 54:107–113. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00157-7

Leathers TD, Nunnally MS, Côté GL (2006) Modified alternan. US patent US7049105B2, 23 May2006

Leathers TD, Nunnally MS, Côté GL (2010) Optimization of process conditions for enzymatic modification of alternan using dextranase from *Chaetomium erraticum*. Carbohydr Polym 81:732–736. https://doi.org/10.1016/J.Carbpol.2010.03.030

Leemhuis H, Pijning T, Dobruchowska JM, van Leeuwen SS, Kralj S, Dijkstra BW, Dijkhuizen L (2013) Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α-glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. J Biotechnol 163:250–272. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.037

Leiva A, Muñoz N, Urzúa M, Gargallo L, Radic D (2010) Monolayers and thin films of dextran hydrophobically modified. J Braz Chem Soc 21:78–86. https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000100013

Liebert T, Wotschadlo J, Laudeley P, Heinze T (2011) Meltable Dextran Esters as biocompatible and functional coating materials. Biomacromol 12:3107–3113. https://doi.org/10.1021/bm200841b

Lo YM, Sanem AS, Hsu CH (2007) Bioconversion of whey lactose into microbial exopolysaccharides. In: Yang ST (ed) Bioprocessing for value-added products from renewable resources. Elsevier, The Netherlands

López-Munguía A, Pelenc V, Remaud M, Biton J, Michel JM, Lang C et al (1993) Production and purification of alternansucrase, a glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, for the synthesis of oligoalternans. Enzyme Microb Technol 15:77–85. https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90120-q

Lule V, Singh R, Behare P, Tomar SK (2015) Comparison of exopolysaccharide production by indigenous *Leuconostoc mesenteroides* strains in whey medium. Asian J Dairy Food Res 34:8–12. https://doi.org/10.5958/0976-0563.2015.00002.0

Lule VK, Singh R, Pophaly SD, Poonam SK, Tomar SK (2016) Production and structural characterisation of dextran from an indigenous strain of *Leuconostoc mesenteroides* BA08 in whey. Int J Dairy Tech 69:520–531. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12271

Lynch KM, Zannini E, Coffey A, Arendt EK (2018) Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: isolation, properties, characterization, and health benefits. Ann Rev Food Sci Technol 9:155–176. https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012537

Maia J, Evangelista MB, Gil H, Ferreira L (2014) Dextran-based materials for biomedical applications. In: Gil MH (ed) Carbohydrates applications in medicine. Research Signpost, pp 31–53

Majumder A, Goyal A (2008) Enhanced production of exocellular glucansucrase from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146 using response surface method. Bioresour Technol 99:3685–3691. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.027

Majumder A, Bhandari S, Purama RK, Patel S, Goyal A (2009) Enhanced production of a novel dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 by response surface methodology. Ann Microbiol 59:309–315. https://doi.org/10.1007/bf03178333

Manandhar S, Vidhate S, D'Souza N (2009) Water soluble levan polysaccharide biopolymer electrospun fibers. Carbohydr Polym 78:794–798. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.023

Mantovan J, Bersaneti GT, Faria-Tischer PC, Celligoi MA, Mali S (2018) Use of microbial levan in edible films based on cassava starch. Food Packag Shelf Life 18:31–36. https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2018.08.003

Mensink MA, Frijlink HW, van der Voort Maarschalk K, Hinrichs WLJ (2015) Inulin, a flexible oligosaccharide I: review of its

physicochemical characteristics. Carbohydr Polym 130:405–419. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.026

Meyer D, Bayarri S, Tárrega A, Costell E (2011) Inulin as texture modifier in dairy products. Food Hydrocoll 25:1881–1890. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.012

Miljković MG, Davidović SZ, Carević MB, Veljović ĐN, Mladenović DD, Rajilić-Stojanović MD, Dimitrijević-Branković SI (2016) Sugar beet pulp as *Leuconostoc mesenteroides* T3 support for enhanced dextransucrase production on molasses. Appl Biochem Biotechnol 180:1016–1027. https://doi.org/10.1007/s12010-016-2149-x

Moncayo-Martínez D (2013) Desarrollo de un recubrimiento comestible a partir de un biopolímero para prolongar la vida útil de frutas frescas. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, http://www.bdigital.unal.edu.co/44864/1/24336979.2013.pdf. Accessed 15 March 2020

Monsan P, Bozonnet S, Albenne C, Joucla G, Willemot RM, Remaud-Simeon M (2001) Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. Int Dairy J 11:675–685. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00113-3

Moosavi-Nasab M, Alahdad Z, Nazemi SH (2010) Characterization of the dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* from date fruit extract. Iran Agric Res 27(28):79–88

Morales-Arrieta S, Rodríguez ME, Segovia L, López-Munguía A, Olvera-Carranza C (2006) Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. Gene 376:59–67. https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.02.007

Mozzi F, Gerbino E, Font de Valdez G, Torino MI (2009) Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in anin vitrogastric system. J Appl Microbiol 107:56–64. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04182.x

Münkel F, Bechtner J, Eckel V, Fischer A, Herbi F, Jakob F, Wefers D (2019) Detailed structural characterization of glucans produced by glucansucrases from *Leuconostoc citreum* TMW 2.1194. J Agric Food Chem 67:6856–6866. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01822

Musa A, Miao M, Zhang T, Jiang B (2014) Biotransformation of stevioside by *Leuconostoc citreum* SK24002 alternansucrase acceptor reaction. Food Chem 146:23–29

Naessens M, Cerdobbel A, Soetaert W, Vandamme EJ (2005) *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. J Chem Technol Biotechnol 80:845–860. https://doi.org/10.1002/Jctb.1322

Naha PC, Liu Y, Hwang G, Huang Y, Gubara S, Jonnakuti V (2019) Dextran coated iron oxide nanoparticles as biomimetic catalysts for localized and pH-activated biofilm disruption. ACS Nano 13:4960–4971. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b08702

Nwodo U, Green E, Okoh A (2012) Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. Int J Mol Sci 13:14002–14015. https://doi.org/10.3390/ijms131114002

Olivares-Illana V, Wacher-Rodarte C, Le Borgne S, López-Munguía A (2002) Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: a *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. J Ind Microbiol Biotechnol 28:112–117. https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000224

Olivares-Illana V, López-Munguía A, Olvera C (2003) Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. J Bacteriol 185:3606–3612. https://doi.org/10.1128/jb.185.12.3606-3612.2003

Olvera C, Centeno-Leija S, López-Munguía A (2007) Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. Antonie Van Leeuwenhoek 92:11–20. https://doi.org/10.1007/s10482-006-9128-0

Olvera C, Centeno-Leija S, Ruiz-Leyva P, López-Munguía A (2012) Design of chimeric levansucrases with improved transglycosylation activity. Appl Environ Microbiol 78:1820–1825

Öner ET, Hernandez L, Combie J (2016) Review of Levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects. Biotechnol Adv. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.002

Onilude AA, Olaoye O, Fadahunsi IF, Owoseni A, Garuba EO, Atoyebi T (2013) Effects of cultural conditions on dextran production by *Leuconostoc* spp. Int Food Res J 20:1645–1651

Ortiz-Soto ME, Olivares-Illana V, López-Munguía A (2004) Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis. Biocatal Biotransf 22:275–281. https://doi.org/10.1080/10242420400014251

Ozimek LK, Kralj S, van den Maarel MJEC, Dijkhuizen L (2006) The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze processive and non-processive transglycosylation reactions. Microbiology 152:1187–1196. https://doi.org/10.1099/mic.0.28484-0

Park JK, Khan T (2009) Other microbial polysaccharides: pullulan, scleroglucan, elsinan, levan, alternant, dextran. In: Williams PA, Phillips GO (eds) Handbook of hydrocolloids. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp 592–614

Passerini D, Vuillemin M, Ufarté L, Morel S, Loux V, Fontagné-Faucher C (2015) Inventory of the GH70 enzymes encoded by Leuconostoc citreum NRRL B-1299—identification of three novel α- transglucosylases. FEBS J 282:2115–2130. https://doi.org/10.1111/febs.13261

Patel A, Prajapati JB (2013) Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Adv Dairy Res 1:1–7. https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000107

Patel S, Majumder A, Goyal A (2012) Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Indian J Microbiol 52:3–12. https://doi.org/10.1007/s12088-011-0148-8

Pavlov G, Grishchenko A, Rjumtsev E, Yevlampieva N (1999) Optical properties of dextran in solution and in films. Carbohydr Polym 38:267–271. https://doi.org/10.1016/s0144-8617(98)00101-5

Peña-Cardeña A, Rodríguez-Alegría M, Olvera C, Munguía A (2015) Synthesis of Fructooligosaccharides by IslA4, a truncated inulosucrase from *Leuconostoc citreum*. BMC Biotechnol 15:2. https://doi.org/10.1186/s12896-015-0116-1

Peshev D, Van den Ende W (2014) Fructans: prebiotics and immunomodulators. J Funct Foods 8:348–357. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.005

Pilling J (2009) Use of alternan as a thickening agent and thickening agent compositions contining altrnan and another thickening agent. WIPO Patent WO200910408A1 6 March 2009

Pilling J, Frohberg C (2009) The use of alternan as ingredient for certain food stuffs. US Patent US9113652B2 30 January 2009

Pool-Zobel BL (2005) Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. Br J Nutr 93:S73–S90. https://doi.org/10.1079/Bjn20041349

Purama RK, Goswami P, Khan AT, Goyal A (2009) Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. Carbohydr Polym 76:30–35. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.09.018

Quezada Gallo J, Gramin A, Pattyn C, Díaz Amaro MR, Debeaufort F, Voilley A (2005) Biopolymers used as edible coating to limit water transfer, colour degradation and aroma compound 2-pentanone lost in mexican fruits. Acta Hortic 682:1709–1716. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.682.228

Raemaekers MHM, Vandamme EJ (1997) Production of alternansucrase by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 in batch fermentation with controlled ph and dissolved oxygen. J Chem Technol Biotechnol 69:470–478. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4660(199708)69:4%3c470:aid-jctb740%3e3.0.co;2-p

Revin VV, Novokuptsev NV, Kadimaliev DA (2016a) Preparation of biocomposites using sawdust and lignosulfonate with a culture

liquid of levan producer *Azotobacter vinelandii* as a bonding agent. BioRes 11:3244–3258. https://doi.org/10.15376/biores.11.2.3244-3258

Revin VV, Novokuptsev NV, Redkin NA (2016b) Optimization of cultivation conditions for *Azotobacter vinelandii* D-08, producer of the polysaccharide levan, for obtaining biocomposite materials. BioRes 11:9661–9675. https://doi.org/10.15376/biores.11.4.9661-9675

Salazar N, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Ruas-Madiedo P (2015) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota. Crit Rev Food Sci Nutr 56:1440–1453. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.770728

Salman JAS, Ali Ajah H, Khudair AY (2019) Analysis and characterization of purified levan from Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris and its effects on *Candida albicans* virulence factors. Jordan J Biol Sci 12:243–249

Sanalibaba P, Cakmak GA (2016) Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. Appl Microbiol 2:100–115. https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000115

Santos M, Rodrigues A, Teixeira JA (2005) Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). Biochem Eng J 25:1–6. https://doi.org/10.1016/j.bej.2005

Sawale SD, Lele SS (2010) Statistical optimization of media for dextran production by *Leuconostoc* sp., isolated from fermented idli batter. Food Sci Biotechnol 19:471–478. https://doi.org/10.1007/s10068-010-0066-2

Schmid J, Sieber V, Rehm B (2015) Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. Front Microbiol 6:496. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496

Schwartz RD, Bodie EM (1984) Production of viscous dextran-containing whey-sucrose broths by *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 14935. Appl Environ Microbiol 48:678–679

Semjonovs P, Shakirova L, Broks R, Kistkins S, Zikmanis P (2017) Influence of environmental factors on extracellular fructan and oligosaccharide production by *Gluconobacter nephelii*. Res J Microbiol 12:33–41. https://doi.org/10.3923/jm.2017.33.41

Shanmugam M, Abirami RG (2019) Microbial polysaccharides—chemistry and applications. J Bio Active Prod Nat 9:73–78. https://doi.org/10.1080/22311866.2019.1571944

Shih IL, Chen LD, Wang TC, Wu JY, Liaw KS (2010) Tandem production of levan and ethanol by microbial fermentation. Green Chem 12:1242. https://doi.org/10.1039/b924765c

Siddiqui NN, Aman A, Silipo A, Qader SAU, Molinaro A (2014) Structural analysis and characterization of dextran produced by wild and mutant strains of *Leuconostoc mesenteroides*. Carbohydr Polym 99:331–338. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.004

Sima F, Mutlu EC, Eroglu MS, Sima LE, Serban N, Ristoscu C et al (2011) Levan Nanostructured Thin Films by MAPLE Assembling. Biomacromol 12:2251–2256. https://doi.org/10.1021/bm200340b

Sima F, Axente E, Sima LE, Tuyel U, Eroglu MS, Serban N et al (2012) Combinatorial matrix-assisted pulsed laser evaporation: single-step synthesis of biopolymer compositional gradient thin film assemblies. Appl Phys Lett 1–01:233705. https://doi.org/10.1063/1.4769987

Smith MR, Zahnley JC (1997) *Leuconostoc mesenteroides* B-1355 mutants producing alternansucrases exhibiting decreases in apparent molecular mass. Appl Environ Microbiol 63:581–586

Smith MR, Zahnley JC, Wong R, Lundin RE, Ahlgren JA (1998) A mutant strain of *Leuconostoc mesenteroides* B-1355 producing a glucosyltransferase synthesizing α(1→2) glucosidic linkages. J Ind Microbiol Biotech 21:37–45. https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900558

Srikanth R, Siddartha G, Sundhar Reddy CHSS, Harish BS, Ramaiah MJ, Uppuluri KB (2015a) Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. Carbohydr Polym 123:8–16. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.0790

Srikanth R, Sundhar Reddy CHSS, Siddartha G, Ramaiah MJ, Uppuluri KB (2015b) Review on production, characterization and applications of microbial levan. Carbohydr Polym 120:102–114. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.003

Srisuvor N, Chinprahast N, Prakitchaiwattana C, Subhimaros S (2013) Effects of inulin and polydextrose on physicochemical and sensory properties of low-fat set yoghurt with probiotic-cultured banana purée. LWT-Food Sci Technol 51:30–36. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.018

Stevens CV, Meriggi A, Peristeropoulou M, Christov PP, Booten K, Levecke B, Vandamme A, Pittevils N, Tadros TF (2001) Polymeric surfactants based on inulin, a polysaccharide extracted from chicory. 1. Synthesis and interfacial properties. Biomacromolecules 2:1256–1259. https://doi.org/10.1021/bm0155701

Taper HS, Roberfroid MB (2002) Inulin/oligofructose and anticancer therapy. Br J Nutr 87:S283–S286. https://doi.org/10.1079/BJNBJN/20022549

Taylan O, Yilmaz MT, Dertli E (2019) Partial characterization of a levan type exopolysaccharide (EPS) produced by *Leuconostoc mesenteroides* showing immunostimulatory and antioxidant activities. Int J Biol Macromol 136:436–444. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.078

Thiel J (2009) Center for advanced bio-based binders and pollution reduction technologies final report for project DE-FG36-06G086029. http//www.osti.gov/bridge. Accessed 30 March 2020

Thunell RK (1995) Taxonomy of the *Leuconostocs*. J Dairy Sci 78:2514–2522. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76881-3

Tiwari S, Patil R, Bahadur P (2018) Polysaccharide Based Scaffolds for Soft Tissue Engineering Applications. Polymers 11:1. https://doi.org/10.3390/polym11010001

Togo A, Enomoto Y, Takemura A et al (2019) Synthesis and characterization of dextran ester derivatives and their adhesive properties. J Wood Sci 65:66. https://doi.org/10.1186/s10086-019-1845-x

Tomulescu C, Stoica R, Sevcenco C, Casarica A, Moscovici M, Vamanu A (2016) Levan-a mini review. Sci Bull Ser F Biotechnol 20:309–317

Tonnis WF, Mensink MA, de Jager A, van der Voort Maarschalk K, Frijlink HW, Hinrichs WLJ (2015) Size and molecular flexibility of sugars determine the storage stability of freeze-dried proteins. Mol Pharm 12:684–694. https://doi.org/10.1021/mp500423z

Torino MI, Font De Valdez G, Mozzi F (2015) Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. Front Microbiol 6:834. https://doi.org/10.3389/Fmicb.2015.00834

Torres-Rodríguez I, Rodríguez-Alegría ME, Miranda-Molina A, Giles-Gómez M, Conca Morales R, López-Munguía A, Bolívari F, Adelfo Escalante A (2014) Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated from traditional fermented pulque beverage. SpringerPlus 3:583. https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-583

Trivedi JS, Bera A, Jewrajka SK (2017) Alkyl amine functional dextran macromonomer-based thin film composite loose nanofiltration membranes for separation of charged and neutral solutes. J Appl Polym Sci 134:45301. https://doi.org/10.1002/app.45301

Vallejo-García LC, Rodríguez-Alegría ME, Lopez Munguia A (2019) An enzymatic process yielding a diversity of inulin-type microbial fructooligosaccharides. J Agric Food Chem 67:10392–10400. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03782

Van Herwijnen H, Pisanova E and Stefke B (2011) Renewable binder for nonwoven materials US Patent US7893154. 22 February 2011

Van Hijum SAFT, van Geel-Schutten GH, Rahaoui H, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L (2002) Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. Appl Environ Microbiol 68:4390. https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4390-4398.2002

Van Tomme SR, Storm G, Hennink WE (2008) In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. Int J Pharm 355:1–18. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.057

Vaningelgem F, Zamfir M, Mozzi F, Adriany T, Vancanneyt M, Swings J, de Vuyst L (2004) Biodiversity of exopolysaccharides produced by Streptococcus thermophilus strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. Appl Environ Microbiol 70:900–912. https://doi.org/10.1128/aem.70.2.900-912.2004

Vasileva T, Iliev I, Amari M, Bivolarski V, Bounaix M-S, Robert H, Morel S, Rabier P, Ivanova I, Gabriel B, Fontagné-Faucher C, Gabriel V (2012) Characterization of glycosyltransferase activity of wild-type *Leuconostoc mesenteroides* strains from bulgarian fermented vegetables. Appl Biochem Biotechnol 168:718–730. https://doi.org/10.1007/s12010-012-9812-7

Vedyashkina TA, Revin VV, Gogotov IN (2015) Optimizing the conditions of dextran synthesis by the bacterium *Leuconostoc mesenteroides* grown in a molasses-containing medium. Appl Biochem Microbiol 41:361–364. https://doi.org/10.1007/s10438-005-0061-1

Vettori MHPB, Blanco KC, Cortezi M, de Lima CJB, Contiero J (2012a) Dextran: effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent applications. Dialogos Ciencia 31:171–186

Vettori MHPB, de Lima CJB, Blanco KC (2012b) Performance of response surface model for increase of dextransucrase production by Leuconostoc mesenteroides FT 045B. Asian J Biol Life Sci 1:29–35

Vijayendra SVN, Shamala TR (2013) Film forming microbial biopolymers for commercial applications—a review. Crit Rev Biotechnol 34:338–357. https://doi.org/10.3109/07388551.2013.798254

Vijayendra SVN, Sharath Babu RS (2008) Optimization of a new heteropolysaccharide production by a native isolate of *Leuconostoc* sp. CFR-2181. Lett Appl Microbiol 46:643–648. https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02361.x

Wada T, Sugatani J, Terada E, Ohguchi M, Miwa M (2005) Physicochemical characterization and biological effects of inulin enzymatically synthesized from sucrose. J Agric Food Chem 53:1246–1253. https://doi.org/10.1021/jf048711u

Wahid Z, Nadir N (2012) Improvement of one factor at a time through design of experiments. World Appl Sci J 21:56–61. https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.21.mae.99919

Walsh D, Arcelli L, Ikoma T, Tanaka J, Mann S (2003) Dextran templating for the synthesis of metallic and metal oxide sponges. Nat Mater 2:386–390. https://doi.org/10.1038/nmat903

Wang R, Dijkstra PJ, Karperien M (2016) Dextran. In: Neves NM, Reis RL (eds) Biomaterials from nature for advanced devices and therapies, pp 307–319. https://doi.org/10.1002/9781119126218.ch18

Wangpaiboon K, Padungros P, Nakapong S, Charoenwongpaiboon T, Rejzek M, Field RA, Pichyangkura TR (2018) An a-1,6-and a-1,3-linked glucan produced by *Leuconostoc citreum* ABK-1 alternansucrase with nanoparticle and film-forming properties. Sci Rep 8:8340. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26721-w

Wasiak I, Kulikowska A, Janczewska M, Michalak M, Cymerman IA, Nagalski A et al (2016) Dextran nanoparticle synthesis and properties. PLoS ONE 11:e0146237. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146237

Werning ML, Notararigo S, NacherM, de Palencia PF, Aznar R, Lopez P (2012) Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: El-Samragy Y (ed) Food additive. In Teh, Croatia, pp 83–114. https://doi.org/10.5772/32412

Xu W, Yu S, Liu Q, Zhang T, Jiang B, Mu W (2017) Enzymatic production of melibiose from raffinose by the levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC. J Agric Food Chem 65:3910–3918. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01265

Yazici H, Alpaslan E, Webster TJ (2015) The role of dextran coatings on the cytotoxicity properties of ceria nanoparticles toward bone cancer cells. JOM 67(4):804–810. https://doi.org/10.1007/s11837-015-1336-5

Yilmaz MT, İspirli H, Taylan O, Dertli E (2020) Synthesis and characterisation of alternan-stabilised silver nanoparticles and determination of their antibacterial and antifungal activities against foodborne pathogens and fungi. LWT - Food Sci Technol. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109497

Zannini E, Waters DM, Coffey A, Arendt EK (2015) Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. Appl-Microbiol Biotechnol 100:1121–1135. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2

Zarour K, Llamas MG, Prieto A, Ruas-Madiedo P, Duenas MT, de Palencia PF, Aznar R, Mebrouk K, Lopez P (2017) Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. Carbohydr Polym 174:646–657. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.113

Zhou Q, Feng F, Yang Y, Zhao F, Du R, Zhou Z, Han Y (2018) Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. Int J Biol Macromol 107:2234–2241. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.098

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

5. S. Kolesovs, P. Semjonovs (2020), Production of bacterial cellulose from whey – current state and prospects. Applied Microbiology and Biotechnology. 104:7723–7730. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10803-9; (*SCOPUS*).

Applied Microbiology and Biotechnology
https://doi.org/10.1007/s00253-020-10803-9

MINI-REVIEW

Production of bacterial cellulose from whey—current state and prospects

Sergejs Kolesovs[1] · Pavels Semjonovs[1]

Received: 25 March 2020 / Revised: 22 July 2020 / Accepted: 30 July 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Bacterial cellulose (BC) is a biopolymer with a wide range of potential applications starting from the food industry and biomedicine to electronics and cosmetics. Despite that, BC industrial production to date still is associated with certain difficulties. One of them is the high cost of growth media, which can reach up to 30% of production costs. To decrease production costs, use of industrial and agricultural by-products, including whey, as alternative growth media has been reported. Whey, as the main high-volume by-product of dairy industry, which is known for its low valorisation opportunities and negative environmental impact, can nevertheless be considered as an alternative growth medium for BC production. To date, several studies aimed at evaluating BC production on whey and lactose substrates have been reported, but they are still insufficient. Reviews of them showed that, in general, BC production on untreated whey- and lactose-containing media was lower than that on the standard medium. However, some wild and recombinant strains have been reported to produce BC on whey as good as the standard medium. Enzymatic and acidic pre-treatment of whey significantly enhanced BC yield. Changes in the microstructure of BC obtained from whey were also recognised, which should be considered regarding the impact on physical properties of the desired BC product. This mini-review indicates that currently whey can be recognised as quite a problematic alternative growth substrate for industrial BC production; however, further extensive studies may improve the prospects in both the search for a cheap alternative growth substrate for industrial BC production and valorisation of whey.

Key points

- *Whey is a by-product in which valorisation is still challenging.*
- *Whey can be used for bacterial cellulose (BC) production.*
- *BC yield and properties vary upon cultivation conditions and producer strains.*

Keywords Bacterial cellulose · Whey · Biopolymers · Whey valorisation · Acetic acid bacteria

Introduction

Biomaterials and biopolymers are gaining considerable importance as potential environmentally friendly materials that provide a wide range of applications in different fields (Yadav et al. 2015). Bacterial cellulose (BC)—an exopolysaccharide synthesised by certain strains of acetic acid bacteria (AAB) (Semjonovs et al. 2017)—is widely recognised as one of these materials. It is alleged that AAB form BC, possibly as a self-defence mechanism from the UV rays and to help bacteria float at air-liquid interface, in order to secure the required oxygen supply (Reiniati et al. 2017). BC can be obtained by way of static or agitated microbial fermentation (Azeredo et al. 2019). It is known that BC exhibits higher purity compared with plant cellulose which contains lignin, pectin, and hemicellulose, thus making it a more favourable cellulose source for varied use (Huang et al. 2014). Moreover, BC biotechnological production reduces the need to destroy forests for plant-origin cellulose production or overexploit an agricultural land for the same. BC is known for its properties that include high purity, flexibility, high water holding capacity, durability, high polymerisation degree, hydrophilicity, high crystallinity, mouldability into different shapes, and biomimetic 3D

✉ Pavels Semjonovs
pavels.semjonovs@lu.lv

[1] Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology, University of Latvia, Ojara Vaciesa street 4, Riga LV-1004, Latvia

Published online: 06 August 2020

nano matrix—a network which resembles an extracellular matrix and high biocompatibility (Azeredo et al. 2019; Gorgieva and Trček 2019; Blanco Parte et al. 2020). Moreover, the fibrous structure of BC can serve as a matrix for composite materials, thus providing additional properties to the composite such as hydrophobicity, flexibility, increased mechanical strength, and antimicrobial, magnetic, and conducting properties, which are not present in pure BC itself (Ul-Islam et al. 2015).

Because of these properties, BC has a potential application in many fields and can be used to produce high-value eco-friendly products with the properties of outstanding existing products (Azeredo et al. 2019). In the food industry, BC can be used as an edible antimicrobial food coating increasing shelf life, as well as a healthy food supplement for patients with gastrointestinal disorders, obesity, cardiovascular diseases, and diabetes (Cho and Almeida 2017; Shi et al. 2014). BC food coatings make it possible to significantly decrease the use of preservatives and other chemical compounds in food (Rydz et al. 2018). Furthermore, it is widely known that high-fat diets can be harmful to human health, but low-fat products are recognised as less desirable due to inferior sensory properties. In turn, BC can be used as a potential fat replacer in food products such as cakes and ice cream by mimicking fat functionality and not providing any calories (Azeredo et al. 2019). Moreover, BC is a microbiota-friendly product which enhances the human immune system, reduces inflammation and cholesterol level (Holscher 2017), and is "generally recognised as safe" (GRAS status) (Shi et al. 2014). An example of BC application in food is nata de coco, which is traditionally obtained by fermentation of coconut milk with BC-forming AAB (Blanco Parte et al. 2020). BC can also be used in the production of composite packaging materials, instead of that mostly made from unbiodegradable petroleum-derived plastic, which is harmful to the environment and humans (Proshad et al. 2017). BC seems to be a promising alternative for the production of environment-friendly durable packaging materials and has the potential to replace plastics in the future. BC has a wide range of potential biomedical applications such as wound dressings, artificial skin and blood vessels, tissue engineering scaffolds, and coverings in nerve surgery and in prosthetics of fascia, bone, and cartilage (Wan et al. 2011; Picheth et al. 2017). It has been reported that in wound dressing, BC films attach to skin, thus providing the correct environment for skin regeneration (Gorgieva and Trček 2019). Antimicrobial agents can be added to these films in order to reduce the risk of infection (Rouabhia et al. 2014). BC can be merged with different types of drugs and provide matrix for controlled drug delivery and release (Pavaloiu et al. 2014; Ullah et al. 2016). Furthermore, different synthetic prostheses are often not biocompatible and may induce the rejection reaction by the host organism, whereas BC-based prosthesis is biocompatible and allows cell proliferation, blood vessel formation inside of BC prosthesis, because of the ability BC to resemble extracellular matrix (Ul-Islam et al. 2015). In electronics, different BC composites have the potential to be an environment-friendly material for flexible screen production (Ummartyotin et al. 2011), organic light-emitting diodes (Legnani et al. 2008), and humidity and gas sensors (Hu et al. 2011). Magnetically responsive flexible BC films with magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles can be used in magnetic resonance imaging (Ul-Islam et al. 2015). In cosmetics, BC is reported to have already been used as a natural skin care facial mask and scrubs, mostly due to its ability to moisten skin and non-toxicity (Ullah et al. 2016). The use of BC immobilisation platforms for enzymatic reactions in chemical industry made it possible to improve the properties of industrial lipases compared with free lipases (Sheldon and van Pelt 2013). It was reported that BC-immobilised lipases show improved activity under both acidic and alkaline conditions, as well as higher activity at temperatures under 30 °C, making it possible to decrease energy demand in factories (Cai et al. 2018). Additionally, BC can be used in filtration membranes to provide a porous network for graphene oxide, showing good mechanical strength, water stability, and ion permeation, thus allowing it to be recognised as prospective for water purification (Fang et al. 2016).

Despite all the advantages of BC application, its industrial production is still problematic, which is impeding it from being successfully commercialised (da Gama and Dourado 2018). Several companies have tried to commercialise BC, but yet with quite limited success. In the 1990s, several Japanese companies and national institutions collaborated to produce BC. However, because of the lack of efficient fermentation systems, commercial production of BC was not achieved. Another example of a commercial-scale BC production attempt was made by two American joint companies—the Cetus Corporation and Weyerhaeuser Company. In addition, the Brazilian company BioFill Produtos Bioetecnológicos produced several biomedical products from BC. However, it was unsuccessful in large-scale commercialisation and is no longer active. There have only been several successful attempts at BC commercialisation. As previously mentioned, nata de coco is an example of BC application in food that has been active since 1954 and is characterised by high production volumes, but low profit margins. In the 1980s, Johnson & Johnson initiated an attempt to commercialise BC on a large scale. Research was conducted mostly in biomedical fields. Despite making several patents and BC products, the company did not reach commercial scale, probably due to high capital and production cost intensity. In 1996, Xylos Corporation acquired the rights to use these patents and in 2001–2003 commercialised several wound care products. In 2012, this business was bought by Lochmann and Rauscher which has continued producing BC product up to this day. In 2006, Polish scientists from the Lodz University of Technology published their results on BC application in the clinical treatment of different degree burns. After a while, the

technology was bought by a Polish company BOWIL Biotech Ltd., which has started production of BC wound dressing materials and cosmetic products marketed under the trade name CELMAT® (da Gama and Dourado 2018).

Alternative substrates for industrial BC production

As previously stated, it is difficult to achieve BC commercialisation due to high production costs. One of the biggest problems is the high cost of standard BC growth medium, which can take up to 30% of the process's production costs (Rivas et al. 2004). In order to decrease production costs, it is necessary to optimise the production process. One possible solution that should be considered is the use of alternative low-cost carbon sources (Semjonovs et al. 2017). Consequently, use of industrial by-products and agricultural wastes for BC production has been reported: crude glycerol remaining from biodiesel production, grape bagasse, molasses, corn steep liquor, rotten fruits, and milk whey (Table 1). However, several problems are connected to the use of alternative and less expensive carbon sources because they affect not only productivity, but also BC properties such as crystallinity, O_2 and H_2O transmission, and the degree of polymerisation. Moreover, growth media requirements and BC productivity broadly vary within AAB species and strains (Jozala et al. 2015; Salari et al. 2019).

Whey—a challenging dairy by-product

It is widely recognised that among agriculture and industry by-products, whey is problematic regarding its environmental impact, high volumes, and relatively little options of efficient valorisation. Milk production and processing have increased worldwide at a high rate of over 10% every 4 years. During processing of milk products, only 10–20% of milk volume is recovered as desired end product (cheese, casein, yoghurt, etc.), with 80–90% remaining as whey (Panghal et al. 2018). Annual whey production is about $180–190 \times 10^6$ tons (Baldasso et al. 2011). Most whey dry mass consists of 70% lactose with the presence of small amounts of glucose, galactose, lactulose, and arabinose. The well-known high biological value of milk whey is attributed to the content of proteins (mainly albumins and globulins), amino acids, vitamins (B_6 and B_{12}), lactic and citric acids, and minerals such as calcium, magnesium, phosphorous, as well as other minor biologically active compounds (Revin et al. 2018). Cheese whey is the most abundant and environment polluting waste generated by the dairy industry (Prazeres et al. 2012). As far as whey is concerned, the general problem is that only about 50% is processed with different technologies, while the rest is dumped as waste because of a lack of efficient further processing technologies. Due to its high organic load, disposal of whey industries has severe polluting effects on the environment, and on waters in particular (Panghal et al. 2018).

Considerable effort was made in the last few decades to find new whey valorisation techniques and decrease the polluting effects of whey (Koutinas et al. 2009). Whey is rich in sugars that makes it suitable for industrial production of different biotechnological products (Prazeres et al. 2012). There are several modern approaches to whey valorisation summarised in Fig. 1. Besides the applications mentioned in Fig. 1, a sustainable solution for whey valorisation can be provided by its bacterial conversion into a cheap fermentation medium for the production of varied biopolymers and other bioactive compounds (Zotta et al. 2020), including BC.

Table 1 BC production by acetic acid bacteria on industrial waste and agriculture sources

Medium	Strain	BC production, dry weight, g/L	Reference
Whey	*G. sucrofermentans* B-11267	5.45	(Revin et al. 2018)
Grape pomace/corn steep liquor	*A. xylinum* NRRL B-42	6.7	(Cerrutti et al. 2016)
Grape bagasse	*G. xylinus* NRRL B-42	8.0	(Vazquez et al. 2013)
Distillery effluent	*Gluconacetobacter oboediens*	8.9	(Jahan et al. 2018)
Stillage wastewater	*G. xylinus BCRC 12334*	6.26	(Wu and Liu 2013)
Orange juice	*A. xylinum* NBRC 13693	5.9	(Kurosumi et al. 2009)
Apple juice	*A. xylinum* NBRC 13693	3.9	(Kurosumi et al. 2009)
Pineapple juice	*A. xylinum* NBRC 13693	3.9	(Kurosumi et al. 2009)
Molasses	*A. xylinum* BPR2001	5.3	(Bae and Shoda 2004)
Glycerol	*G. xylinus* CGMCC no. 2955	5.97	(Zhong et al. 2013)
Enzymatic hydrolysate of wheat straw	*A. xylinus* ATCC 23770	8.3	(Chen et al. 2013)
Coconut juice (nata de coco)	*Acetobacter sp.*	712.9 (wet BC weight)	(Phong et al. 2017)

Whey as a substrate for BC synthesis

Only a few studies have aimed to evaluate whey as a substrate for BC production. In the study conducted in 2018 by Revin et al. (2018), *Gluconobacter sucrofermentans* B-11267 strain was used to evaluate whey as an alternative substrate for BC production. It was shown that on whey, BC production by this strain reached 5.45 g/L (dry weight), which is higher when compared with that obtained on the standard Hestrin-Schramm (HS) medium (2.14 g/L). The maximum rate of product formation occurred on the first day of the fermentation process. In that time, the amount of lactose decreased from 42.1 to 22.4 g/L indicating that this strain was able to use lactose as a C source. In this study, whey was shown to be a good alternative C source, mainly because of the strain's ability to hydrolyse lactose. However, changes in BC micromorphology and crystallinity were observed after cultivation in whey compared with the standard HS medium. By using atomic force microscopy, it was determined that the widths of BC microfibrils were 60–90 nm and 100–180 nm for HS standard medium and for whey, respectively. In addition, as reported, changes in morphology resulted in changes in crystallinity. By using X-ray chromatography, it was shown that BC crystallinity index in whey was lower (50.2%) than that in HS (79.9%). However, it was shown that whey did not affect the chemical structure of BC (Revin et al. 2018). Obviously, alteration of BC growth medium by use of alternative C substrates, e.g. whey during the production process, can cause changes in BC microstructure, thus affecting the physical and mechanical properties (crystallinity index, polymerisation degree, molecular weight, water holding capacity, oxygen and water transmission rate) of the desired final product (Jozala et al. 2015; Gorgieva and Trček 2019). For example, using whey as an alternative media would decrease the crystallinity

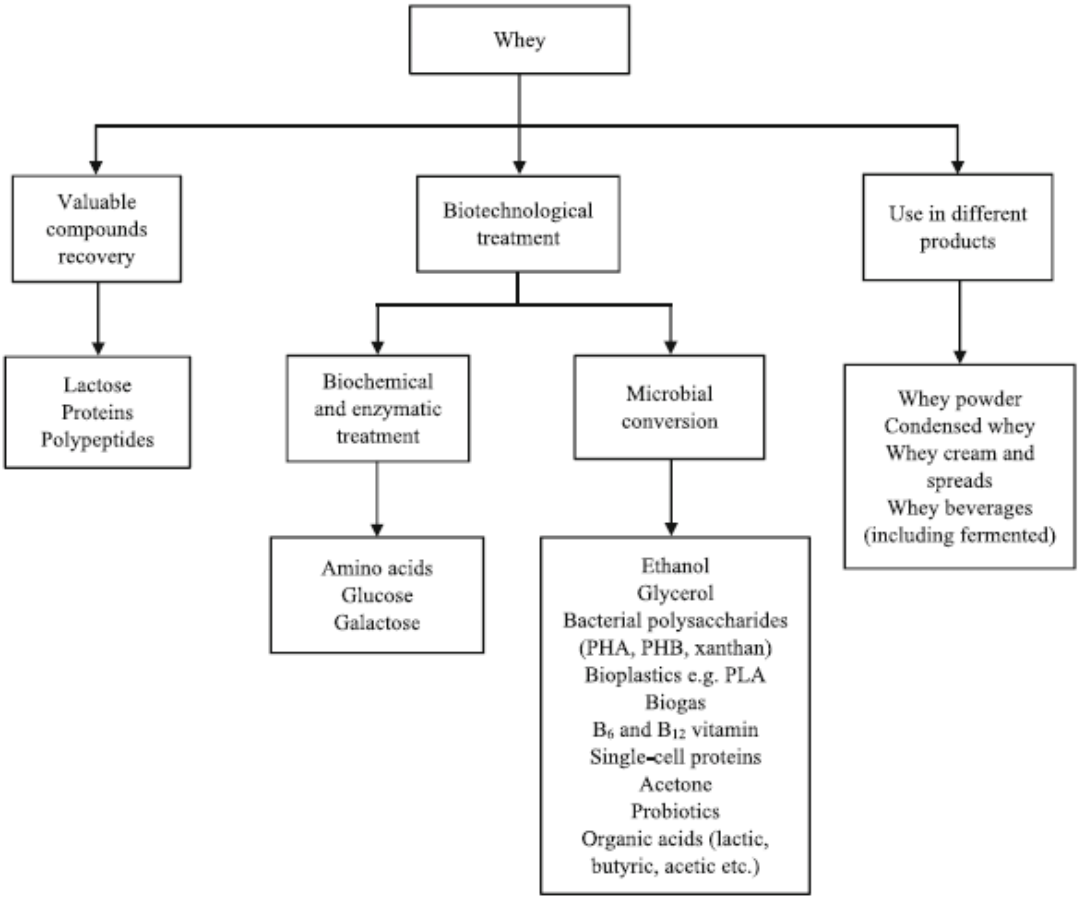


Fig. 1 Current main options of whey valorisation. PHA, polyhydroxyalkanoates; PHB, polyhydroxybutyrate; PLA, polylactic acid

of BC from 80 to 50% (Revin et al. 2018) thus decreasing its mechanical strength and making it less suitable for application, e.g. as a durable bioplastic material.

In the study conducted in 2014 by Jozala et al. (2015) with the BC-producing *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582 strain, milk whey was compared with standard HS medium, as well with media containing other alternative substrates such as rotten fruits, rotten fruits and whey mixtures in different ratios. Experiments showed that the use of whey medium resulted in lower BC yield (25 mg/mL) compared with standard HS medium (30.8 mg/mL) and rotten fruit medium, respectively (60.2 mg/mL). It was emphasised that *G. xylinus* ATCC 53582 preferably metabolises monosaccharides such as fructose and glucose. Furthermore, fruit-whey mixed media were evaluated differently in the study. It was shown that these mixtures are not more effective as a rotten fruit-only substrate, thus attributing a somewhat negative effect to whey on BC production in the presence of no-whey originated sugars. As previously stated, the main C source in whey is lactose which is a disaccharide and is not conducive to *G. xylinus* (Jozala et al. 2015) and other AAB.

Thus, it was reported that the use of whey- and lactose-containing media resulted in relatively low BC production. A study carried out by Tsouko et al. (2015) demonstrated that lactose was not efficiently metabolised by *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973. Bacteria were able to produce only 1.6 g/L of BC by growing on lactose, while it was able to produce 4.9 g/L by growing on sucrose (Tsouko et al. 2015). In another study, *Acetobacter xylinum* was able to produce 1.62 g/L BC by growing on lactose. To compare, this strain achieved its maximum BC production of 7.38 g/L on fructose (Embuscado et al. 1994).

Moreover, several other studies show that lactose does not support significant BC production. It has been shown that cheese whey permeate does not support a significant BC production by *Acetobacter xylinum* 10821 and *Acetobacter xylinum* 23700 (Thompson and Hamilton 2001). Another study showed low levels of BC production by *Gluconacetobacter sacchari* isolated from Kombucha tea on HS media modified by replacement of glucose with lactose (0.31 g/L) and cheese whey medium without any additional supplementations (0.08 g/L). BC production levels were lower compared with the standard HS media after 96 h of cultivation (2.7 g/L) (Carreira et al. 2011). Likewise, another study showed that *Gluconacetobacter xylinus* K3 showed BC yield on lactose (0.07 g/L) (Nguyen et al. 2008). Moreover, in another study, the final BC production of 0.09 g/L by *G. xylinus* ATCC 53524 grown on galactose (Mikkelsen et al. 2009) was reported. The minimal presence of BC in lactose- and whey-containing media was attributed to inoculum remnants or free glucose release upon lactose hydrolysis (Carreira et al. 2011). Low BC production on whey- or lactose-containing media can be caused by lack of *lac*Z gene responsible for β-galactosidase enzyme which ensures lactose hydrolysis to glucose and galactose monomers (Thompson and Hamilton 2001; Battad-Bernardo et al. 2004).

As a solution, construction of recombinant AAB strain capable of hydrolysing lactose and producing BC was proposed. A recombinant strain of *Acetobacter xylinum* was created by inserting *lac*Z gene, thus allowing the hydrolysis of lactose (Battad-Bernardo et al. 2004). The *lac*Z gene, which codes β-galactosidase, is one of the three enzymes responsible for the ability of *Escherichia coli* to metabolise lactose. The mini-Tn*10*:*lac*Z:*kan* gene was inserted into a wild-type strain of *A. xylinus* by mean of random transposon mutagenesis, thus creating lactose utilising and BC-producing strain ITz3. It was revealed that the *lac*Z gene was inserted into the chromosome of the bacteria. The strain maintained the stability of the inserted gene in the non-selective medium after more than 60 generations. The mutant strain was able to produce 1.82 g/L BC in whey-based substrate, which means a 28-fold increase of BC production compared with wild-type strain (Battad-Bernardo et al. 2004). Nevertheless, BC production still was not high enough to implement this strain in commercial BC production.

Another approach to facilitate BC production by AAB on whey lies in its hydrolytic pre-treatment. This can be achieved by two methods: enzymatic hydrolysis by adding β-galactosidase enzyme to the lactose-containing media or acidic hydrolysis, which can be achieved by adding acids instead of enzymes (Amaro et al. 2019). Pre-treatment was used in the study conducted by Salari et al. (2019). In this study, commercial β-galactosidase was used to hydrolyse whey in the culture media. The results showed that enzymatic pre-treatment improved BC production (3.55 g/L) by *G. xylinus* PTCC 1734 on enzymatically hydrolysed cheese whey, which according to the authors was higher than untreated whey and higher than the standard HS medium (3.2 g/L). However, despite its effectiveness, enzymatic pre-treatment significantly increases production costs (Amaro et al. 2019). Moreover, changes in BC microstructure compared with those of standard media were observed. BC produced on whey had a crystallinity index of 61.86% which is lower than the crystallinity index for BC on standard untreated HS media (79.07%) (Salari et al. 2019).

Discussion and conclusions

Since the process for BC commercial production should be simple and cost-effective, whey can be considered as a cheaper growth medium for BC production, in addition to

reducing environmental pollution from dairy waste. However, at present, reported BC productivity on whey remains relatively low (not higher than 5.4 g/L) and BC production varies strongly within different strains. Thus, further extensive research aimed at evaluating BC-producing strains suitable for whey fermentation is required, including taking into account the physical properties of BC synthesised on whey. An important fact is, as reported, that the use of industrial and agricultural by-products as alternative growth media can lead to changes in produced BC microstructure and physical properties, which would significantly affect the physical and mechanical properties of desired BC products (Revin et al. 2018). For efficient BC production on whey, AAB strains with active *lac*Z genes enabling the hydrolysis of lactose should be applied (Battad-Bernardo et al. 2004) and/or hydrolytic pre-treatment should be performed. Despite the ability to hydrolyse lactose, AAB should usually use only glucose for further metabolism, leaving galactose unassimilated (Mikkelsen et al. 2009). The search for strains assimilating both glucose and galactose would have a significant impact on increased BC production. Another problem could be attributed not to lactose metabolism, but to weak hydrolysis of whey proteins. Relatively weak protease activity (Bossi et al. 2006) may not be enough to enable AAB to obtain all the required growth substances from whey, e.g. N, which restricts BC production. This question is still left mostly unstudied. Although whey can provide cheaper C source for BC synthesis than standard synthetic media, its use may result in the loss of some desired BC properties essential to the desired end product. To conclude, it is necessary to say that whey can currently be recognised as quite a problematic alternative growth substrate for industrial BC production. However, further studies may improve the prospects for both the search for a cheap alternative growth substrate for industrial BC production and valorisation of whey.

Authors' contributions General writing of the manuscript, investigation, literature search and data analysis, editing: Sergejs Kolesovs. Conceptualisation, critical revision, and supervision: Pavels Semjonovs. All authors contributed to the study conception and design and read and approved the final manuscript.

Funding information This study was supported by the Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia (grant number 19-00-A01612-000004). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Compliance with ethical standards

Competing interests The authors declare that there are no competing interests.

Ethical approval Not applicable, since the work does not involve any study with human participants or animals.

References

Amaro TMMM, Rosa D, Comi G, Iacumin L (2019) Prospects for the use of whey for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. Front Microbiol 1. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00992

Azeredo HMC, Barud H, Farinas CS, Vasconcellos VM, Claro AM (2019) Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. Front Sustain Food Syst 3. https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007

Bae S, Shoda M (2004) Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. Biotechnol Prog 20:1366–1371. https://doi.org/10.1021/bp0498490

Baldasso C, Barros TC, Tessaro IC (2011) Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. Desalination 278:381–386. https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.055

Battad-Bernardo E, McCrindle SL, Couperwhite I, Neilan BA (2004) Insertion of an *E. coli lacZ* gene in *Acetobacter xylinus* for the production of cellulose in whey. FEMS Microbiol Lett 231:253–260. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00007-2

Blanco Parte FG, Santoso SP, Chou CC, Verma V, Wang HT, Ismadji S, Cheng KC (2020) Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. Crit Rev Biotechnol 40:1–18. https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713721

Bossi A, Bonizzato L, Zapparoli G (2006) Acidic extracellular proteases from microrganisms of fairly acidic niche. Protein Pept Lett 13:737–741. https://doi.org/10.2174/092986606777790647

Cai Q, Hu C, Yang N, Wang Q, Wang J, Pan H, Hu Y, Ruan C (2018) Enhanced activity and stability of industrial lipases immobilized onto spherelike bacterial cellulose. Int J Biol Macromol 109:1174–1181. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.100

Carreira P, Mendes JAS, Trovatti E, Serafim LS, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP (2011) Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. Bioresour Technol 102:7354–7360. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.081

Cerutti P, Roldán P, García RM, Galvagno MA, Vázquez A, Foresti ML (2016) Production of bacterial nanocellulose from wine industry residues: importance of fermentation time on pellicle characteristics. J Appl Polym Sci 133:1–9. https://doi.org/10.1002/app.43109

Chen L, Hong F, Yang X-x, Han S-f (2013) Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. Bioresour Technol 135:464–468. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.029

Cho S, Almeida N (2017) Diatery fiber and health. CRC Press, Boca Raton

da Gama FMP, Dourado F (2018) Bacterial nanocellulose: what future? BioImpacts 8:1–3. https://doi.org/10.15171/bi.2018.01

Embuscado ME, Marks JS, BeMiller JN (1994) Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Top Catal 8:407–418. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80084-2

Fang Q, Zhou X, Deng W, Zheng Z, Liu Z (2016) Freestanding bacterial cellulose-graphene oxide composite membranes with high mechanical strength for selective ion permeation. Sci Rep 6:1–11. https://doi.org/10.1038/srep33185

Gorgieva S, Trček J (2019) Bacterial cellulose: production, modification and perspectives in biomedical applications. Nanomaterials 9:1–20. https://doi.org/10.3390/nano9101352

Holscher HD (2017) Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota Hannah D. Holscher, PhD, RD Assistant Professor of Nutrition and Human Microbiome, Department of Food Science

and Human Nutrition and Division of Nutritional Sciences, University of Ill. 1–23

Hu W, Chen S, Liu L, Ding B, Wang H (2011) Formaldehyde sensors based on nanofibrous polyethyleneimine/bacterial cellulose membranes coated quartz crystal microbalance. Sensors Actuators B Chem 157:554–559. https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.05.021

Huang Y, Zhu C, Yang J, Nie Y, Chen C, Sun D (2014) Recent advances in bacterial cellulose. Cellulose 21:1–30. https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z

Jahan F, Kumar V, Saxena RK (2018) Distillery effluent as a potential medium for bacterial cellulose production: a biopolymer of great commercial importance. Bioresour Technol 250:922–926. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.094

Jozala AF, Pértile RAN, dos Santos CA, de Carvalho S-EV, Seckler MM, Gama FM, Pessoa A (2015) Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. Appl Microbiol Biotechnol 99:1181–1190. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3

Koutinas AA, Papapostolou H, Dimitrellou D, Kopsahelis N, Katechaki E, Bekatorou A, Bosnea LA (2009) Whey valorisation: a complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. Bioresour Technol 100:3734–3739. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.058

Kurosumi A, Sasaki C, Yamashita Y, Nakamura Y (2009) Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. Carbohydr Polym 76:333–335. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.009

Legnani C, Vilani C, Calil VL, Barud HS, Quirino WG, Achete CA, Ribeiro SJL, Cremona M (2008) Bacterial cellulose membrane as flexible substrate for organic light emitting devices. Thin Solid Films 517:1016–1020. https://doi.org/10.1016/j.tsf.2008.06.011

Mikkelsen D, Flanagan BM, Dykes GA, Gidley MJ (2009) Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. J Appl Microbiol 107:576–583. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x

Nguyen VT, Flanagan B, Gidley MJ, Dykes GA (2008) Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. Curr Microbiol 57:449–453. https://doi.org/10.1007/s00284-008-9228-3

Panghal A, Patidar R, Jaglan S, Chhikara N, Khatkar SK, Gat Y, Sindhu N (2018) Whey valorization: current options and future scenario – a critical review. Nutr Food Sci 48:520–535. https://doi.org/10.1108/NFS-01-2018-0017

Pavaloiu RD, Stoica A, Stroescu M, Dobre T (2014) Controlled release of amoxicillin from bacterial cellulose membranes. Cent Eur J Chem 12:962–967. https://doi.org/10.2478/s11532-014-0541-3

Phong HX, Lin LT, Thanh NN, Long BHD, Dung NTP (2017) Investigating the conditions for nata-de-coco production by newly isolated *Acetobacter sp*. Americ J of Food Sci and Nutr 4:1–6

Picheth GF, Pirich CL, Sierakowski MR, Woehl MA, Sakakibara CN, de Souza CF, Martin AA, da Silva R, de Freitas RA (2017) Bacterial cellulose in biomedical applications: a review. Int J Biol Macromol 104:97–106. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171

Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J (2012) Cheese whey management: a review. J Environ Manag 110:48–68. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018

Proshad R, Kormoker T, Islam MS, Haque MA, Rahman MM, Mithu MMR (2017) Toxic effects of plastic on human health and environment: a consequences of health risk assessment in Bangladesh. Int J Heal 6:1. https://doi.org/10.14419/ijh.v6i1.8655

Reiniati I, Hrymak AN, Margaritis A (2017) Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. Crit Rev Biotechnol 37:510–524. https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1189871

Revin V, Liyaskina E, Nazarkina M, Bogatyreva A, Shchankin M (2018) Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. Braz J Microbiol 49:151–159. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.012

Rivas B, Moldes AB, Domínguez JM, Parajó JC (2004) Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. Int J Food Microbiol 97:93–98. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.006

Rouabhia M, Asselin J, Tazi N, Messaddeq Y, Levinson D, Zhang Z (2014) Production of biocompatible and antimicrobial bacterial cellulose polymers functionalized by RGDC grafting groups and gentamicin. ACS Appl Mater Interfaces 6:1439–1446. https://doi.org/10.1021/am4027983

Rydz J, Musioł M, Zawidlak-w B, Sikorska W (2018) Present and of biodegradable polymers for food packaging applications. In: Grumezescu AM and Holban (ed) AM Biopolymers for food design. Academic Press, London, pp 431–467

Salari M, Sowti Khiabani M, Rezaei Mokarram R, Ghanbarzadeh B, Samadi Kafil H (2019) Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. Int J Biol Macromol 122:280–288. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.136

Semjonovs P, Ruklisha M, Paegle L, Saka M, Treimane R, Skute M, Rozenberga L, Vikele L, Sabovics M, Cleenwerck I (2017) Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. Appl Microbiol Biotechnol 101:1003–1012. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7761-8

Sheldon RA, van Pelt S (2013) Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chem Soc Rev 42:6223–6235. https://doi.org/10.1039/c3cs60075k

Shi Z, Zhang Y, Phillips GO, Yang G (2014) Utilization of bacterial cellulose in food. Food Hydrocoll 35:539–545. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012

Thompson DN, Hamilton MA (2001) Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. Appl Biochem Biotechnol Part A Enzym Eng Biotechnol 91–93:503–513. https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:503

Tsouko E, Kourmentza C, Ladakis D, Kopsahelis N, Mandala I, Papanikolaou S, Paloukis F, Alves V, Koutinas A (2015) Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. Int J Mol Sci 16:14832–14849. https://doi.org/10.3390/ijms160714832

Ul-Islam M, Khan S, Ullah MW, Park JK (2015) Bacterial cellulose composites: synthetic strategies and multiple applications in biomedical and electro-conductive fields. Biotechnol J 10:1847–1861. https://doi.org/10.1002/biot.201500106

Ullah H, Santos HA, Khan T (2016) Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. Cellulose 23:2291–2314. https://doi.org/10.1007/s10570-016-0986-y

Ummartyotin S, Juntaro J, Sain M, Manuspiya H (2011) Si-O barrier technology for bacterial cellulose nanocomposite flexible displays. Carbohydr Polym 86:337–342. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.057

Vazquez A, Foresti ML, Cerrutti P, Galvagno M (2013) Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. J Polym Environ 21:545–554. https://doi.org/10.1007/s10924-012-0541-3

Wan Y, Gao C, Han M, Liang H, Ren K, Wang Y, Luo H (2011) Preparation and characterization of bacterial cellulose/heparin hybrid nanofiber for potential vascular tissue engineering scaffolds. Polym Adv Technol 22:2643–2648. https://doi.org/10.1002/pat.1692

Wu JM, Liu RH (2013) Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. J Biosci Bioeng 115:284–290. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.09.014

Yadav P, Yadav H, Shah VG, Shah G, Dhaka G (2015) Biomedical biopolymers, their origin and evolution in biomedical sciences: a

systematic review. J Clin Diagnostic Res 9:21–25. https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13907.6565

Zhong C, Zhang GC, Liu M, Zheng XT, Han PP, Jia SR (2013) Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. Appl Microbiol Biotechnol 97:6189–6199. https://doi.org/10.1007/s00253-013-4908-8

Zotta T, Solieri L, Iacumin L, Picozzi C, Gullo M (2020) Valorization of cheese whey using microbial fermentations. Appl Microbiol Biotechnol 104:2749–2764. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10408-2

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

6. P. Zikmanis, S. Kolesovs, P. Semjonovs (2020), Production of biodegradable microbial polymers from whey (*SCOPUS*). Bioresour. Bioprocess, 7:36. https://doi.org/10.1186/s40643-020-00326-6.

Zikmanis *et al. Bioresour. Bioprocess.* (2020) 7:36
https://doi.org/10.1186/s40643-020-00326-6

Bioresources and Bioprocessing

REVIEW Open Access

Production of biodegradable microbial polymers from whey

Peteris Zikmanis, Sergejs Kolesovs and Pavels Semjonovs*

Abstract

Current research in industrial microbiology and biotechnology focuses on the production of biodegradable microbial polymers as an environmentally friendly alternative to still dominant fossil-based plastics. Microbial polymers have an extensive biotechnological potential and are already widely used in a variety of fields ranging from medicine to technology. However, their increase in production and wider use is hampered by the high cost of raw materials and therefore requires a focus on cheaper inputs, including dairy by-products and waste such as cheese whey (CW). This is an environmentally unfriendly by-product of milk processing and reducing it would also reduce the risk of environmental pollution. This review summarises current knowledge on the use of CW and derived products to obtain commercially important microbial polymers, including information about producer cultures, fermentation techniques and methods used, composition of culture medium, cultivation conditions and productivity of bioprocesses. The main methods and applications of cheese whey pre-treatment are also summarised.

Keywords: Biopolymers, Bacterial exopolysaccharides, Polyhydroxyalkanoates, Whey

Introduction

Current topical research in biotechnology is increasingly focused on the development of biodegradable polymers as an alternative to the still dominant petrochemical plastics (Siracusa et al. 2008; Gopi et al. 2016; Narancic and O'Connor 2019). There are several reasons for this, first of all, the urgent need to face up to the challenges posed by global environmental pollution in every possible way (Pandey and Singh 2018; Sadh et al. 2018; Narancic and O'Connor 2019). Therefore, the increased use of renewable resources (i.e. raw materials) and biodegradable polymers of microbial origin obtained therefrom (Rehm 2010; Freitas et al. 2011; Kreyenschulte et al. 2012; Shanmugam et al. 2019) could become particularly important in this context. All the more so, because microbial polymers such as polyhydroxyalkanoates (PHAs) and exopolysaccharides (EPS) may also possess the desirable characteristics of fossil-based plastics (Van de Velde and Kiekens 2002; Babu et al. 2013). Especially so when used in the form of bio-based microbial polymer composites that could get more versatility and functionality over their components (Chen et al. 2014; Ul-Islam et al. 2015; Sirvio et al. 2018). As a result, microbial polymers also possess extensive biotechnological potential and there are already a great variety of promising applications ranging from medical to technological domains (Rehm 2010; Kreyenshulte et al. 2012; Shanmugam et al. 2019). Focusing on renewable resources as nutrients for microbial growth and polymer synthesis, it is important to expand the use of agricultural by-products and waste (Arancon et al. 2013; Sadh et al. 2018; Tsang et al. 2019), including those from dairy industry such as whey—a main product of cheese and casein production (Prazeres et al. 2012; Lappa et al. 2019), especially since it is not only an environmentally unfriendly product, but also actually a threat to it (Colombo et al. 2016). Thus, the increased use of a renewable feedstock like cheese whey (CW) not only has environmental benefits, but also facilitates the industrial production and application of biopolymers through a significant reduction in the cost of microbial nutrient

*Correspondence: pavels.semjonovs@lu.lv
Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology, University of Latvia, Miera iela 3, Salaspils LV-2169, Latvia

Springer Open

© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

media which is a prerequisite for the overall economic efficiency of their biosynthesis (Gahlavat and Srivastava 2017). The use of whey or its derivatives for the production of microbial polymers is mentioned in a few specialised reviews on the valorisation potential of CW or dairy waste, including on the properties of individual polymers, but is limited to a narrow range of these compounds such as PHAs (Mollea et al. 2013; Koller et al. 2016; Ryan and Walsh 2016; Amaro et al. 2019; Tsang et al. 2019) and xanthan (Mollea et al. 2013; Özcan and Öner 2015) or bacterial cellulose (BC) (Lappa et al. 2019). Besides, these reviews have employed a relatively limited data volume, and production efficiency, even for such individual polymers, has not been actually compared. This paper provides a brief overview on current approaches to obtain a broader range of commercially viable microbial polymers from whey and whey-derived products.

Microbial polymers: structural features, properties and applications

Microbial polymers represent a diverse range of macromolecules that include four major classes of which bacterial polysaccharides and polyesters have the widest application and commercial potential compared to polyamides and inorganic anhydrides (polyphosphates) (Rehm 2010). During past decades, microbial polymers, polysaccharides and polyesters have offered a variety of novel applications and retain the potential to replace common, but less favourable materials (Kreyenschulte et al. 2012). In particular, the substitution of non-degradable fossil-based plastics is of considerable and growing interest as it allows for the environmentally and economically beneficial disposal of major waste streams (Luckahan and Pilla 2011; Iram et al. 2019; Narancic and O'Connor 2019). In turn, polysaccharides produced by microorganisms can be classified (Donot et al. 2012) into three main groups based on their cellular location: (a) cytosolic polysaccharides which are the carbon and energy source for cells, (b) polysaccharides such as lipopolysaccharides, peptidoglycans and teichoic acids, which form the cell wall, (c) extracellular polysaccharides exuded out of cells in the form of capsules or biofilms, known as EPS. EPS can also be divided into two groups known as homopolysaccharides (HoPS) which contain only one type of monosaccharide (e.g. glucose or fructose) and heteropolysaccharides (HePS), which are composed of repeating units containing different monosaccharides and non-sugar molecules (Lo et al. 2007). Unlike polysaccharides, microbial polyesters (PHAs) are intracellular polymers and due to their composition (varied (*R*)-3-hydroxy acids) should be qualified as heteropolymers (Koller et al. 2016). Most microbial EPS are linear HePS consisting of three to seven different monosaccharides arranged in groups to form repeating units. The monomers may be pentoses, hexoses, amino sugars or uronic acids, etc. (Freitas et al. 2011; Rehm 2010; Shanmugam et al. 2019). As a result, microbial EPS may be ionic or non-ionic and represent primarily linear molecules with side chains of varying length and complexity being attached at regular intervals (Shanmugam et al. 2019). In general, EPS biosynthesis can be divided into three main steps: (a) assimilation of carbon substrate, (b) intracellular synthesis of polysaccharide, (c) exudation of polymer out of cell (Becker 2015; Donot et al. 2012). It is carried out on EPS by many cultures of Gram-negative and Gram-positive bacteria, which produce EPS of varying molecular weight and composition, hence of different physico-chemical and functional properties (Lo et al. 2007). Although many producer cultures are available, and therefore, also EPS and PHAs synthesised, only a few of them are characterised by sufficient productivity, and hence commercial potential. The most relevant properties, structural features and applications of such microbial polymers are summarised in Table 1. This demonstrates that the structure and properties of microbial EPS and PHAs are quite diverse and the ability to produce them is relatively widespread amongst bacteria. Accordingly, the actual and even more potential applications of these polymers are also very comprehensive, especially in the food industry, medical and pharmaceutical fields, electronics, etc. (Table 1), which, in turn, stimulate demand and boost their production. However, at the same time, as the annual world production volumes for microbial polymers are growing and already exceed 100,000 metric tonnes, they still represent a very small share of the current polymer market, even compared to some other bio-based plastics (Rehm 2010; Colombo et al. 2016; Revin et al. 2016; Bustamente et al. 2019). Thus, microbial polymers are mainly used in high-value market niches such as biomedicine, pharmaceuticals and cosmetics where they better meet the quality and functional requirements compared to "traditional" ones (Poli et al. 2011). This situation is undesirable as the use of microbial polymers is still inadequate in other important fields; especially with regard to packaging materials where plastics consumption has reached to 40% of the total annual world production (more than 300 million tonnes) (Colombo et al. 2016; Luzi et al. 2019). As these, mainly fossil-based materials, are not biodegradable and currently only partly recycled it leads to the accumulation of wastes that remain in the environment for hundreds of years and pose a serious threat to it (Colombo et al. 2016). Therefore, the use of biodegradable microbial polymers such as PHAs, EPS and their composites with properties that meet the requirements for packaging materials could substantially contribute in this respect

Table 1 Commercially important microbial polymers: the most relevant properties and applications[a]

Polymer class	Producer	Monomers	Characteristics of primary structure	Properties	Applications
Xanthan	*Xanthomonas* spp., mainly *X. campestris*	Glucose, mannose and glucuronate	β-(1,4)-linked repeating extracellular heteropolymer consisting of pentasaccharide units	Hydrocolloid —High viscosity yield at low shear rates even at low concentrations; —Stability over wide temperature, pH and salt concentrations ranges	Foods, petroleum, industry pharmaceuticals, cosmetics and personal care products, agriculture
Alginate	*Pseudomonas* spp. and *Azotobacter* spp.	Mannuronic acid and guluronic acid	β-(1,4)-linked non-repeating non-repeating extracellular heteropolymer	Hydrocolloid Gelling capacity Film-forming	Food hydrocolloid Medicine Surgical dressings Wound management Controlled drug release
Gellan	*Sphingomonas* spp.	Glucose, rhamnose and glucuronate	β-(1,3)-linked repeating extracellular heteropolymer consisting of tetrasaccharide units	Hydrocolloid -Stability over wide pH range Gelling capacity Thermoreversible gels	Foods Pet food Pharmaceuticals Research: agar substitute and gel electrophoresis
Curdlan	*Agrobacterium* spp., *Rhizobium* spp. and *Cellulomonas* spp.	Glucose	β-(1,3)-linked extracellular homopolymer	Gel-forming ability Water insolubility Edible and non-toxic Biological activity	Foods Pharmaceutical industry Heavy metal removal Concrete additive
Dextran	*Leuconostoc* spp. and *Streptococcus* spp.	Glucose	α-(1,2)/α-(1,3)/ α-(1,4)-branched α-(1,6)-linked extracellular homopolymer	Non-ionic Good stability Newtonian fluid behaviour	Foods Pharmaceutical industry: Blood volume expander Chromatographic media
Levan	*Bacillus spp., Erwinia spp., Halomonas spp.,Zymomonas mobilis*	Fructose	β-(2,6)-linked, β-(2,1)-branched extracellular homopolymer	Low viscosity, high water solubility, Anti-tumour activity Anti-inflammatory. Adhesive strength, Film-forming capacity	Food (prebiotic), Feed, Medicines, Cosmetics Industry
Pullulan	*Aureobasidium pullulans Cytaria* spp.	Glucose	α-(1,6)-linked maltotriose (α-(1,4)-linked glucose) units extracellular homopolymer	Easily water soluble, high adhesion, sticking, lubrication, and film forming abilities, biocompatible	Food packaging edible coatings (food, pharmacy tablets), Cosmetics, Paper coating, Flocculating agent
Cellulose	Gluconacetobacter spp. (mainly G. xylinus), Komagataeibacter spp., Agrobacterium spp., Alcaligenes spp., Rhizobium spp., Sarcina spp., Azotobacter spp.	Glucose	β-(1,4)-linked extracellular homopolymer	High crystallinity Insolubility in most solvents High tensile strength Moldability	Foods (indigestible fibre) Biomedical Wound healing Tissue engineered blood vessels Audio transducers diaphragm
Polyhydroxyalkanoates (PHA) (polyesters)	*Azotobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Cupriavidus* spp., *Haloferax* spp., *Pseudomonas* spp.;	(*R*)-3-hydroxy fatty acids	Intracellular heteropolymer	Thermoplastic or elastomeric materials, with melting points ranging from 40 to 180 °C, resistance to moisture, aroma barrier, UV stable, soluble in halogenated solvents	Biodegradable plastics Drug delivery Tissue engineering Food packaging biomaterial and matrices for displaying or binding proteins

[a] Data summarised in several previous reviews (Shanmugam et al. 2019; Freitas et al. 2011; Rehm 2010; Kreyenschulte et al. 2012)

(Siracusa et al. 2008; Azeredo et al. 2016; Popovic et al. 2018; Luzi et al. 2019). However, it should be emphasised that regardless of their excellent features and environmental advantages, more extensive use of microbial polymers in any field is still hampered by high production costs (Rehm 2010; Kreyenschulte et al. 2012; Amaro et al. 2019). In fact, the main factors responsible for the higher production expenses are the high costs of substrate and downstream processing, especially the former, since the cost of raw materials accounts for at least 40–50% of total production costs, wherein a carbon source contributes to 70–80% of total expenditures (Gahlawat and Srivastava 2017). As a result, growing attention is being paid to various by-products and wastes, mainly from the agricultural and food industries (Arancon et al. 2013; Sadh et al. 2018; Tsang et al. 2019) as potential alternative low-cost carbon and/or nitrogen sources that would be suitable for both microbial growth and polymer production. The use of sugar cane and sugar beet molasses, by-products and wastes from oleochemical (glycerol), dairy (cheese whey), distillery (dregs, thin stillage) industries, extracts and hydrolysates of various organic crops, etc. has been proposed and proven to be appropriate for this purpose (Freitas et al. 2011; Özcan and Öner 2015; Revin et al. 2018; Tsang et al. 2019). As a cheap, carbon-rich raw material available in huge, virtually unlimited quantities, cheese whey is of interest in this respect (Prazeres et al. 2012; Koller et al. 2016; Lappa et al. 2019).

Whey characteristics and pre-treatment modes to perform microbial fermentations

Whey is the major by-product of the cheese or casein manufacture accounting for 80% to 90% of the processed milk and containing about 55% of milk nutrients. CW is rich in fermentable nutrients and contains (% w/v) lactose (4.5–5), soluble proteins (0.6–0.8), lipids (0.4–0.5) as well as mineral salts (0.5–0.7) and minor constituents such as lactic and citric acids, B group vitamins, etc. (Pescuma et al. 2015; Macwan et al. 2016; Ryan and Walsh 2016). CW composition may somewhat vary depending on type, sweet (obtained when adding rennet, pH 6–7) or acid (as a result of acidic fermentation, pH < 5) whey. Acid whey, also known as salty, has higher salt and lower protein content than sweet whey and also has less lactose (3.8–4.3% against 4.5–5% in sweet whey) (Pescuma et al. 2015; Macwan et al. 2016). Due to the high salinity, salty whey is more difficult to process as well as has higher disposal costs than sweet whey (Blaschek et al. 2007). Annually the world dairy industry produces more than 140 million tonnes of whey (Niknezhad et al. 2015) characterised by very high Biological Oxygen Demand (BOD) and Chemical Oxygen Demand (COD) levels, ranging from 27 to 60 kg/m^3 and 50 to 102 kg/m^3, respectively. It is determined by the high organic load of CW, especially of lactose (39–60 kg/m^3) which is hard to dispose of and thus poses serious problems for the dairy industry and the environment (Güven et al. 2008; Prazares et al. 2012; Niknezhad et al. 2015). To prevent and overcome these problems, various technologies for CW valorisation have been developed and applied (Arancon et al. 2013; Mollea et al. 2013; Macwan et al. 2016; Chanfrau et al. 2017; Lappa et al. 2019; Tsang et al. 2019). Two different approaches are currently used for this purpose (Mollea et al. 2012). The first one is based on the application of technologies to recover valuable compounds of whey such as proteins (individual or concentrate) and lactose or produce powdered CW. The second approach relies on the application of bioconversion, i.e. microbial fermentation to obtain a variety of value-added products, including single-cell proteins and oils, organic acids (e.g. lactic, succinic, propionic), bacteriocins and biopolymers (enzymes, PHAs, EPS) (Mollea et al. 2013; Chanfrau et al. 2017; Lappa et al. 2019). Although, in principle, CW is a suitable raw material for microbial fermentations, the main disadvantage is that its sole carbon source, lactose, cannot be fermented by certain industrially relevant microorganisms such as non-lactic bacteria, etc. (Pescuma et al. 2015). In addition, a whole whey can be characterised by relatively low carbon-to-nitrogen ratio (C/N) which adversely affects the production of biopolymers (Bosco and Champio 2010; Koller et al. 2019). Therefore, some pre-treatment of CW is required to overcome such limitations, especially with regard to the production of PHAs and EPS (Amaro et al. 2019; Koller et al. 2019). Moreover, whey is a complex, unsterile and often variable by-product, and thus, its direct application in both lab-scale and industrial fermentations might result in some difficulties and uncertainties. Therefore, several whey derivatives that have undergone a series of pre-treatments are often used instead of whey itself. One of these derivatives is whey powder, normally produced by spray-drying, which is diluted in water prior to fermentation and makes it possible to obtain a specific lactose concentration, longer storage of whey as well as avoiding seasonal variations of this by-product (Pisecky 2005; Chegini and Tacheri 2013; Amaro et al. 2019). Another type of pre-treatment regardless of whether CW is a liquid or powder is the removal of the majority of its proteins and other solids by ultrafiltration to create a whey permeate, that retains most of the whey lactose (Koller et al. 2007; Mollea et al. 2013). This protein removal is also commonly obtained by the heat treatment of acidified (pH close to 4) CW followed by filtration and centrifugation to get a so-called whey supernatant (Pantazaki et al. 2009). CW permeates or supernatants are easier to work as they represent sterile, homogenous and clear

solutions which may also be obtained and stored in the form of spray-dried powders (Pisecky 2005). In cases where the producer strains are unable or only partially able to use lactose as the sole carbon source, transformation needs to be performed either using β-galactosidase enzymes (Marangoni et al. 2002; Torres et al. 2010; Semjonovs et al. 2015) or by much less expensive lactose hydrolysis to the equimolar glucose/galactose mixture using mineral acids (Lin and Nickerson 1977; Kucera et al. 2018). Besides, protease-hydrolysed whey or its (hydrolysed/non-hydrolysed) protein fraction (so-called retentate), retained after permeate separation, can be used as an efficient complex nitrogen source (alone or in combination with permeate) to perform microbial fermentations (Obruca et al. 2014; Koller et al. 2019).

Production of microbial polymers from whey and whey-derived products

Polyhydroxyalkanoates

PHAs are polyesters of microbial origin synthesised by a wide range of bacteria (Table 1) from a variety of substrates (sugars, lipids, renewable substrates of various origins, etc.). They represent an energy-rich storage material that accumulates in cells in the form of granules under stressful conditions, nutrient (such as oxygen, nitrogen or phosphorus) limitations, etc. in the presence of excess carbon source and the biosynthesis proceeds by PHA synthase (PhaC, EC 2.3.1) from (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA as precursors (https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.3.1.B2), whereby the different PhaC types (B2-B4) are determined by the *R*-chain length (Rehm 2010; Amaro et al. 2019; Koller et al. 2016). PHAs are considered to be a particularly attractive and effective alternative to conventional plastics due to the mechanical properties similar to fossil-derived polymers (such as polypropylene), biocompatibility and complete biodegradability (Nath et al. 2008; Koller et al. 2016; Gahlawat and Srivastava 2017). The valuable properties of PHAs determine their widespread application in a wide variety of fields (Table 1), as well as promote their more cost effective production, including the extensive use of renewable resources (Arancon et al. 2013; Özcan and Öner 2015; Sadh et al. 2018; Koller and Braunegg 2018; Tsang et al. 2019). In this context, relatively extensive research has been also conducted on the use of CW and its derivatives for microbial production of PHAs, including a number of EU-funded projects (WHEYPOL, LIFE + WHEYPACK, etc.) carried out by collaborative consortia of academic and industrial partners (Koller et al. 2007; Koller et al. 2012; Koller and Braunegg 2018; Alborch 2014). Although many attempts to find more efficient producer strains, optimum nutrient combinations, and cultivation conditions have only resulted in moderate or fairly low productivity, a number of results have also been obtained which demonstrate that the use of CW or derivatives for the production of PHAs can be both industrially and commercially viable. These data are summarised and represented in Table 2. This demonstrates that higher productivity of PHAs synthesis compared to pure cultures can be achieved using mixed microbial cultures (MMCs) and especially when engineered, i.e. recombinant cultures are used as producers. In addition, good productivity is achieved both when lactose-degrading genes are introduced into a culture that is able to synthesise polyhydroxybutyrate (PHB) by *Cupravidus necator* (Povolo et al. 2010) and when genes synthesising PHB are introduced into the *Escherichia coli* strain (Ahn et al. 2000) that is already able to hydrolyse lactose. This second possibility has proved to be particularly effective since such a recombinant (*Escherichia coli* CGSC 4401) has achieved very high (1.35–4.60 g/L/h) volumetric productivity, which also depends on the type of fermentation and culture conditions (Ahn et al. 2000; Ahn et al. 2001; Park et al. 2002). The data indicate (Table 2) that the most efficient way to produce PHAs is by the fed-batch fermentations in bioreactor, irrespective of the culture method used (pure cultures, MMC or engineered strains). If the fed-batch process is improved, an excellent, still unbeatable, level of volumetric productivity (4.60 g/L/h) is also achieved by the employed cell-recycle system to overcome the problems arising from the continuous addition of feedstock to fed-batch cultures, i.e. to prevent the effect of a rapidly growing fermentation broth volume in the bioreactor (Ahn et al. 2001; Koller et al. 2016). Reasonably good PHA productivity is also achieved by Mixed Microbial Cultures (MMC) using a three-stage process comprising (1) acidogenic fermentation of carbon source to produce volatile fatty acids (VFAs) as the precursors for PHA biosynthesis, (2) culture selection stage, where microorganisms are selected based on PHA storage ability, (3) PHA production stage where the selected microorganisms are fed with the VFA produced in the 1st stage (Duque et al. 2014; Colombo et al. 2016). This method has certain advantages as it does not require strict sterile conditions, makes better use of complex substrates like industrial wastes or by-products and makes it possible to modify the structure of PHAs according to the composition of VHAs in the fermentation medium (Table 2).

Xanthan

The industrially most important biopolymers also include xanthan (Table 1), which is produced by the phytopathogenic, Gram-negative bacterium of the genus *Xanthomonas* (mainly *X. campestris* pv. *campestris)* and, unlike PHAs, represents an extracellular polysaccharide. It is composed of polymerised

pentasaccharide repeating units which are assembled by the sequential addition of glucose-1-phosphate, glucose, mannose, glucuronic acid, and mannose on a polyprenol phosphate carrier provided by a set of enzyme reactions involving multiple monosaccharide-specific glycosyltransferases, acetyltransferases and ketal pyruvate transferase from nucleotidyl (UDP, GDP) derivative precursors (Katzen et al. 1998; Rehm 2010; Freitas et al. 2011). Xanthan gum is rightly considered to be the first industrially produced biopolymer and also as the most extensively studied and widely accepted commercial EPS (Rossalam and England 2006; Rottava et al. 2009; Freitas et al. 2011). It has a very broad range of applications in various fields (Table 1), largely due to its excellent rheological properties (Rottava et al. 2009). CW and derivatives have also been mentioned as potential carbon sources (Mollea et al. 2013; Özcan and Öner 2015) in the relatively large number of studies focusing on the use of various renewable resources for microbial production of xanthan. In comparative terms, such studies are not very numerous, but they do confirm that these carbon sources are also quite promising. Thus, relatively high productivity was achieved using the lactose-utilising *X. campestris* C7L isolate and different whey-based media (Nitsche et al. 2001). A two-stage fermentation strategy, combining unfiltered whey (0.35% protein) and filtered whey (0.18% protein), was proposed. The first stage, using unfiltered whey medium, showed a xanthan production of 12 g/L (0.40 g/L/h) and a 45% yield, following by the second stage, with filtered whey addition, which produced a final xanthan concentration of 28 g/L (0.58 g/L/h) and a 75% yield.

The final broth viscosity reached 18,000 cP and the polymer produced in this combining system showed typical pseudoplastic and thixotropic behaviour (Nitsche et al. 2001). Slightly lower productivity was achieved using two different strains of *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 and *X. campestris pv manihotis* 1182 (Silva et al. 2009). Maximum xanthan production was approximately 25 g/L (0.35 g/L/h), for both strains using Mozzarella cheese whey as the sole carbon source at the shake flask cultivation for 72 h. Noticeably higher productivity (35 g/L, 0.49 g/L/h) was obtained (Mesomo et al. 2009) using a related producer strain *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 also using the Mozzarella CW (lactose 44.8 g/kG) as the sole carbon source at the batch cultivation in bioreactor. In turn, cultivation of *X. campestris* ATCC 13,951 in shake flasks using deproteinised CW as the sole carbon source showed relatively lower productivity (20.3 g/L, 0.28 g/L/h) (Sobenes and Alegre 2015). Optimisation experiments were performed in shake flasks using *X. campestris* PTCC1473 and *X. pelargonii* PTCC1474 producer strains for concentrations of carbon (deproteinised CW), phosphorus (KH_2SO_4) and magnesium ($MgSO_4$) in the culture medium (Niknezhad et al. 2015). *X. campestris* PTCC1473 was found to be characterised by higher xanthan formation productivity (16.65 g/L, 0.35 g/L/h) compared to *X. campestris* PTCC1474 (12.28 g/L, 0.26 g/L/h), and with higher polymer yields (0.42 g/g lactose and 0.27 g/g lactose, respectively). In addition, in the first case, the optimal CW concentration (62.5 g/L, 39.1 g/L lactose, respectively) was lower than the required 79 g/L (42.4 g/L lactose) for *X. pelargonii*. Relatively good productivity was achieved using deproteinised whey, i.e. CW permeate hydrolysed to an equimolar glucose/galactose mixture. Thus, using *X. campestris* ATCC13951 and hydrolysed CW permeate medium (glucose/galactose 43 g/L for both), a xanthan concentration of 28 g/L was achieved with a volumetric productivity of 0.29 g/L/h (Savvides et al. 2012). Older studies show relatively modest results. For example, cultivation of *X. campestris* NRRL B-1459 in deproteinised and hydrolysed CW (El-Sawah and Ashour 1999) gave 12.99 g/L xanthan (0.18 g/L/h). In addition, when non-hydrolysed whey is used, the concentration of xanthan is very low (0.4 g/L), indicating low β-galactosidase activity in this producer. Not only CW but also hydrolysed milk permeate (Abd El-Gawad et al. 2001) can be used as a carbon source for the production of xanthan by X. *campestris* LIS3, yielding 26.8 g/L (0.28 g/L/h). Furthermore, enrichment of the medium with lactose (e.g. an initial concentration of 10%) can yield xanthan up to 43.9 g/L (0.46 g/L/h). To ensure an efficient hydrolysis of lactose, the expression of β-galactosidase in *X. campestris* was promoted when the *lac* genes from *E.coli* were inserted into *X. campestris* to get the recombinant strain *X. campestris* 17 (pKMφLT), which was able to reach 3.60 g/L and 4.24 g/L of xanthan in the medium with 0.4% lactose and 10% whey, respectively. For the same purpose, several strains of *X. campestris* were genetically modified to get a number of transconjugants (plasmid SUP5011 from *E. coli* to *X. campestris*) and UV mutants with significantly higher β-galactosidase expression and abilities to produce xanthan about 10 g/L (Ghazal et al. 2011). Similar approaches have been used and comparable results obtained in previous studies of genetically modified producer strains *X. campestris* B1459 (Pollock and Thorne 1994) and *X. campestris* ATCC55096 with the ability to produce xanthan up to 20 g/L (San Bias et al. 1991).

Alginates

Alginates also represent (Table 1) extracellular heteropolysaccharides (HePS) which are composed of mannuronic and guluronic acids that form block structures of poly-mannuronic acid sequences, poly-guluronic acid

Table 2 Comparatively efficient microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from whey and whey-derived products [a)]

Substrate	Type of cultures/producing strain	Culture method	Type of PHA	Volumetric productivity, g/L/h	References
Lactose (Equimolar mixtures of glucose and galactose)	Pure culture/*Pseudomonas cepacia* ATCC 17759	Shaking flask	PHB	0.18	Young et al. 1994
Lactose whey supernatant	Pure culture/*Methylobacterium* sp. ZP24	Shaking flask, Bioreactor, Fed-Batch	PHB	0.08 0.09	Yellore and Desai 1998; Nath et al. 2008
Dairy waste	Pure culture/*Bacillus megaterium* SRKP-3	Bioreactor, Fed-Batch	PHB	0.31	Ram Kumar Pandian et al. 2010
Enzymatically hydrolysed whey permeate + 3HV[b] and 4HB[c] precursors	Pure culture/*Haloferax mediterranei* DSM 1411	Bioreactor, Fed-Batch	P-(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB)	0.14	Koller et al. 2007, Koller et al. 2012
Whey powder supernatant + additives	Pure culture/*Alcaligenes latus* ATCC 29714	Shaking flask, Bioreactor, Batch	PHB	0.11	Berwig et al. 2016
Hydrolysed whey permeate + additives	Pure culture/*Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha DSM 545*)	Bioreactor, Fed-Batch	P-(3HB-*co*-3HV)	0.17	Marangoni et al. 2002
Hydrolysed whey powder supernatant + additives	Pure culture/*Haloferax mediterranei* ATCC 33500	Bioreactor, Batch	P-(3HB-*co*-3HV)	0.16	Pais et al. 2016
Fermented whey powder permeate	MMC [d]/Undefined	Bioreactor, Fed-Batch	P-3(HB-*co*-HV)	0.56	Duque et al. 2014
Fermented whey supernatant	MMC/Undefined	Bioreactor, Fed-Batch	PHB/P-3(HB-co-HV)	0.45	Colombo et al. 2016
Processed whey powder solution	Engineered culture/*rec. Escherichia coli* CGSC 4401, harbouring pJC4 (*Alcaligenes latus* PHA biosynthesis genes)	Bioreactor, Fed-Batch	PHB	1.42 2.57 4.60 1.35	Ahn et al. 2000a, Ahn et al. 2001, Park et al. 2002
Hydrolysed whey permeate + additives	Engineered culture/*rec. Cupriavidus necator* mRePT (*E. coli* lactose degradation genes)	Bioreactor, Batch	PHB	0.70	Povolo et al. 2010

[a] Data summarised in recent specialised reviews (Amaro et al. 2019; Koller, 2016)

[b, c] [c]P3-Hydroxyvalerate (HV) and 4-hydroxybutyrate (HB), precursors pentanoic acid and γ-butyrlactone, respectively

[d] Mixed microbial cultures, including consortia of activated sludge to produce volatile fatty acids, the precursors for PHAs' biosynthesis

sequences and mixed sequences, secreted by bacteria from the genera *Azotobater* and *Pseudomonas* (Freitas et al. 2010; Rehm 2010). Most important in alginate biosynthesis is alginate synthase (EC 2.4.1.33), i.e. mannouronate transferase (https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.33), which catalyses the polymerisation of beta-D-mannuronate residues (nucleotide-derived GDP-D-mannuronate) into a mannuronan polymer, an intermediate in the biosynthesis of alginate. The industrial importance of alginates is determined by their ability to modify the rheological properties of various aqueous systems, which, in turn, are highly dependent on polymer composition. They are widely used in the medical, pharmaceutical and food industries as a stabiliser, viscosifier and gelling agent (Khanafari et al. 2007; Rehm 2010; Trujillo-Roldán et al. 2015; Urtuvia et al. 2017). Whilst most alginates are still derived from seaweed and algae, there is an increasing focus on their microbiological production, including the use of renewable resources (Urtuvia et al. 2017). However, currently only a few studies have evaluated the use of CW and its derivatives for microbiological production of alginates (Khanafari et al. 2007 Trujillo-Roldán et al. 2015; Hendawy et al. 2019). Thus, the producer strain *Azotobacter chrococcum* NCBI MH249629 using the culture medium with deproteinised sweet whey (lactose 45 g/L) in shake flasks and under optimised conditions (concentration of lactose and nitrogen sources, pH, T^0, agitation speed, cultivation time) achieved the alginate concentration of 5.65 g/L (0.08 g/L/h) (Hendawy et al. 2019), which is

commensurate with the capacities of other *Azotobacter* spp. and carbon sources (Urtuvia et al. 2017). Similar results were obtained using a related producer strain *A. chrococcum* DSM1723 and CW containing (lactose 49.1 g/L) medium. Under optimised conditions (pH, salt concentrations, T^0) alginate concentrations above 5 g/L (0.05 g/L/h) were achieved, albeit with longer cultivation times and at a higher (35 °C) temperature. The aforementioned results indicate that both *A. chrococcum* producer strains have sufficient β-galactosidase activity, as non-hydrolysed CW is well-utilised for alginate synthesis (Hendawy et al. 2019; Khanafari et al. 2007). In contrast, another producer, *Azotobacter vinelandii* ATCC9046, was able to use only hydrolysed and deproteinised CW as the carbon source (reducing sugars 20 g/L), and only part of the galactose was utilised from hydrolysed lactose (Trujillo-Roldán et al. 2015). The resultant concentrations of alginates were also significantly lower (2.4 g/L, 0.024 g/L/h), but the use of CW significantly affected the properties of the polymer, including increased viscosifying power (medium viscosity/g of alginate) already at 40–50 h of cultivation (Trujillo-Roldán et al. 2015). It is noteworthy that *A. vinelandii* is mentioned as an ideal candidate to produce alginates (Urtuvia et al. 2017), which however does not confirm whether or not CW-derived carbon sources are used.

Gellan

The group of HePS also includes gellan, which is a linear anionic EPS based on a tetrasaccharide repeat unit composed of two molecules of D-glucose, one of D-glucuronic acid and one of L-rhamnose. The native gellan is partially esterified with acyl substituents (1 mol of glycerate and 0.5 mol of acetate) per repeat unit. This multifunctional gelling agent is produced by the non-pathogenic Gram-negative bacteria of *Spinghomonas* genus, most commonly using the strain *S. paucimobilis* ATTC 31461, and its synthesis is a growth-associated process (Fialho et al. 1999; Rehm 2010; Freitas et al. 2011). Moreover, its biosynthetic pathway is quite complex in which the synthesis of the sugar precursors (UDP-glucose, dTDP-rhamnose and UDP-glucuronate) is followed by the formation of the repeat unit by sequential transfer of the sugar donors to an activated lipid carrier by committed glycosyltransferases and by gellan polymerisation and export. This multi-step process is catalysed by a set of enzymes encoded by the gel clusters of at least 22 genes (Fialho et al. 2008). As with xanthan and alginate, a wide range of gellan applications in the food, pharmaceutical, biomedical and other sectors are determined by its valuable rheological properties (Rehm 2010; Fialho et al. 2008). Although there are few studies on the use of lactose or CW in gellan microbial synthesis, they already confirm the relatively high productivity of this process. Thus, producer *S. paucimobilis* ATCC31461, using 2% lactose as the sole carbon source (yeast extract and peptone as nitrogen sources), in shake flasks (180 rpm), reached gellan concentrations of about 16 g/L (0.33 g/L/h) exceeding those obtained from sucrose or glucose (14 g/L, 0.29 g/L/h), but significantly below that of 4% soluble starch (43.6 g/L, 0.91 g/L) (Bajaj et al. 2006). In an earlier study with the same producer strain (Fialho et al. 1999) in shaking flasks (30 °C, 250 rpm) with 2% lactose, a lower gellan concentration (9 g/L, 0.19 g/L/h) was achieved, but the level of medium viscosity at this concentration was higher as compared to gellan (14 g/L) obtained with 2% glucose. It was also shown that as the sole carbon source, when tested undiluted, sweet CW (lactose 52 g/L) showed a drastic inhibition of gellan synthesis. However, when diluted (1:4 to 1:5), gellan concentrations of 7.2–7.9 g/L (0.15–0.16 g/L/h) are achieved. It was also confirmed that the use of CW significantly affects glycerate and acetate levels in gellan, and its higher viscosity is determined by a higher glycerate content (Fialho et al. 1999). In a recent study, the use of CW for gellan production by *S. paucimobilis* was evaluated in the 3-L bioreactor using various fermentation techniques (batch, fed-batch and continuous) (Gamal et al. 2018). During bath fermentation (28 °C, 250 rpm) of 40% sweet CW (1.84% sugar), a gellan concentration of 7.36 g/L (0.102 g/L/h) was obtained. The continuous feeding at 1.53 g/L/h in the fed-batch fermentation was found to be more favourable than pulsed feeding for gellan production 10.87 g/L (0.226 g/L/h). However, maximum gellan productivity was obtained using a continuous culture technique at 0.055 h^{-1} dilution rate producing 8.08 g/L (0.337 g/L/h) (Gamal et al. 2018). Most recently, a new, previously untold, producer culture *Sphingomonas azotofigens* GL-1 (Wang et al. 2020) with a very significant gellan biosynthesis capacity has been revealed. Cultivation in shake flasks (pH 6.5, 30 °C) using a molasses or cheese whey-based medium whose compositions was optimised by response surface methodology. The optimum cheese whey-based medium consisted of cheese whey 68.3 g/L, Na_2HPO_4 14.6 g/L and KH_2PO_4 7.7 g/L, and maximum gellan production using this medium was 33.75 g/L (0.70 g/L/h). In turn, 14.75 gellan gum was obtained with an optimised molasses medium, which consisted of molasses 50 g/L, Na_2HPO_4 9.7 g/L and KH_2PO_4 5.9 g/L. The cheese whey-derived gellan showed a higher rhamnose, lower glucuronic acid and higher glycerate content together with a somewhat higher molecular weight compared to the molasses-derived polymer (Wang et al. 2020).

Hyaluronic acid

Extracellular heteropolysaccharides also include hyaluronic acid (HA), which is a linear anionic polymer of repeating disaccharide units that are composed of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine and produced by several bacterial strains (e.g. *Streptococcus* spp., *Pasteurella multocida*). Reflecting its variety of natural functions in tissues of higher organisms, HA has found several applications in medicine, cosmetics and speciality foods (Chong et al. 2004; Rehm 2010; Freitas et al. 2011), making it a commercially valuable medical biopolymer. Its synthesis from the precursors (UDP-D-glucuronate and UDP-N-acetylglucosamine) is catalysed by the hyaluronan synthase (HasA) (EC 2.4.1.212) (Chong et al. 2004; Rehm 2010). Although HA is increasingly produced by microbial fermentation (Brown et al. 2008), renewable resources, including CW, are still little used and currently limited to a few studies (Amado et al. 2016; Mohan et al. 2016). Thus, the producer strain *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 35246 was cultivated in several culture media using CW or the concentrated cheese whey protein (WPC) fraction after 10 kDa ultrafiltration of CW. The initial W composition was 5.9 g/L protein and 38.1 g/L reducing sugars; WPC had a protein content of 38.6 g/L and 13.1 g/L reducing sugars. Both CW and WPC were hydrolysed using protease, fractions (WPC) and whey protein hydrolysate (WPH) supplemented with lactose (up to 50 g/L) and fractions W and WH with both lactose and glucose at the same concentration and used for batch fermentations in 0.75-L bioreactors (37 °C, aeration of 1 vvm, agitation of 500 rpm, pH 6.7). Moderate HA concentrations of 2.14 g/L (0.20 g/L/h) and 2.38 g/L (0.43 g/L/h) were achieved in the presence of W and WH fractions, respectively, unlike for WPH with much lower (0.85 g/L, 0.12 g/L/h), even undetectable (WPC) concentration. If a tenfold scale-up in 5-L bioreactors was carried out in W and WH, using glucose instead of lactose as the carbon source due to the rather low its consumption observed in 0.5-L bioreactor cultures, much higher HA concentrations 4.02 g/L (0.58 g/L/h) and 3.19 g/L (0.46 g/L/h) were achieved, respectively. It is noteworthy that significantly cheaper (2.5–3 times) cultivation media were used, as both the W and WH fractions were able to completely replace the more expensive yeast extract and peptone required in standard media (Amado et al. 2016). Another producer strain *Streptococcus thermophilus* NCIM 2904 (Mohan et al. 2016) was also used to obtain HA by including both whey permeate (WP) and whey protein hydrolysate (WPH) in the nutrient medium supplemented with mineral salts. Cultivations were performed in 250-mL shake flasks at 37 °C and 150 rpm for 24 h. Under optimised (WP and WPH concentrations, initial pH, inoculum size) HA achieved as if low 0.343 g/L (0.014 g/L/h) concentration. However, a further increase in upscaling this process at pilot- or industrial-scale level could be expected. In addition, the observed consistent production of ultralow-molecular weight (9.22–9.46 kDa) HA by such a microbial fermentation would be of high commercial significance over the conventional fragmentation processes for high-molecular weight HA (Mohan et al. 2016).

Bacterial cellulose

Along with extracellular heteropolysaccharides, glucans, including BC, constitute a significant part amongst other bacterial EPS. This homopolysaccharide is a polymer of D-glucose formed primarily by β-(1,4) glycosidic links from precursors (UDP-D-glucose) by the membrane-embedded glycosyltransferase (cellulose synthase BcsA) (EC 2.4.1.29) (Gorgieva and Trček 2019). BC possesses exclusive structural, mechanical and functional properties and has therefore acquired a wide range of technical, and in particular, biomedical applications (Table 1) (Rehm 2010; Semjonovs et al. 2017 Gorgieva and Trček 2019; Salari et al. 2019). In addition, the extensive use of BC in biocomposites is of particular importance and good prospects (Sirviö et al. 2018). The capacity of BC production is widespread amongst bacteria (Table 1), but the most important and well-known producers are the strains of acetic acid bacteria (AAB) *Komagataeibacter xylinus* (Rehm 2010; Kreyenschulte et al, 2012; Amaro et al. 2019; Gorgieva and Trček 2019). As with other EPS, microbial synthesis of BC is very expensive and alternatives to get cheaper cultivation media formulations are being sought (Rehm 2010; Kreyenschulte et al. 2012; Amaro et al. 2019; Gorgieva and Trček 2019). However, the use of CW as an alternative C and N source remains limited in this respect. Most likely, this is because AAB possesses very low levels, if any, of β-galactosidase activity, with which to obtain glucose from CW lactose for BC synthesis (Pescuma et al. 2015; Lappa et al. 2019). Therefore, either enzymatic (or chemical) hydrolysis (Marangoni et al. 2002; Torres et al. 2010; Kucera et al. 2018) of CW (or CW permeate) or recombinant strains of producers with the inserted gene of β-galactosidase (Battad-Bernardo et al. 2004) are used for this purpose. Thus, the insertion of *lacZ* gene into the wild-type strain of *Acetobacter xylinus* by random transposon mutagenesis, generated the lactose-utilising and cellulose-producing mutant strain *A. xylinum* ITz3. The modified strain produced, on average, a 28-fold increase in cellulose production and a 160-fold increase in β-galactosidase activity when grown in lactose medium. β-Galactosidase activity is present in either lactose or sucrose medium indicating that the gene is constitutively expressed. During static

batch cultivation in the whey (lactose 20 g/L) containing the medium (yeast extract and peptone as the N-sources), 1.82 g/L of BC was obtained (0.019 g/L/h) (Battad-Bernardo et al. 2004). Several studies have confirmed that AABs, which are capable of producing BC, have a very poor ability to use lactose for this purpose. For instance, *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973, although it achieved 1.6–1.7 g/L BC, did so over a very long time and with low productivity (0.0044–0.0047 g/L/h) (Tsouko et al. 2015). Likewise, using the producer strains *A. xylinum* ATCC10821 and *A. xylinum* ATCC23770 on diluted CW permeate (lactose 1.3% w/v) (Thomson and Hamilton 2001), where almost negligible BC amounts (0.041 and 0.176 g/L, respectively) were obtained during 12 days of fermentation. Moreover, *Gluconoacetobacter sacchari* isolated from Kombucha tea reached only 0.31 g/L BC (0.0032 g/L/h) on lactose (20 g/L) and negligible (0.08 g/L) or a very small amount (0.15 g/L) on undiluted or diluted (1:50) CW powder-based culture medium (Carreira et al. 2011). Similarly, negligible BC concentrations (0.09-0.10 g/L) were obtained by cultivation of *A. xylinum* ATCC 10821 in the Hestrin–Schramm (HS) medium during 96 h on galactose as the sole carbon source (Mikkelsen et al. 2009). Slightly higher, but nevertheless very modest, results were obtained with *Gluconoacetobacter* sp. isolated from fruit in the HS medium on lactose or galactose (both 2%) as the only carbon sources with BC concentrations of 0.65 g/L (0.0039 g/L/h) and 0.50 g/L (0.0030 g/L/H) (Jahan et al. 2011). It has also been found that *A. xylinum* ATCC10245 can use galactose (20 g/L) relatively well as the sole carbon source in the GAM cultivation medium with the yield of BC 2.56 g/L (0.015 g/L/h) (Abdelhady et al. 2015). Higher BC concentrations and productivity are achieved using CW after hydrolysis with β-galactosidase to an equimolar glucose/galactose mixture. Thus, the producer strain *Gluconacetobacter xylinus* PTCC 1734 in the medium containing CW hydrolyzate (reducing sugars 30 g/L) without any additional supplementation (150 ml medium in 300-mL flasks, 28 °C, static) reached 3.5 g/L BC (0.0104 g/L/h) within 14 days (Salari et al. 2018). However, significantly higher BC productivity was achieved with the production strain *Komagataeibacter rhaeticus* P 1463 using a modified HS medium with CW hydrolysate (reducing sugars 20 g/L) as the sole carbon source (Semjonovs et al. 2017). Under similar culture conditions (50 ml medium in 300-ml flasks or 300 ml medium in 3000-ml jars, 28 °C, static, 5 or 14 days, respectively), bacterial cellulose was obtained at 2.90 g/L (0.024 g/L/h) and 6.55 g/L (0.019 g/L/h) concentrations, respectively (Semjonovs et al. 2017). However, very promising results were obtained when non-hydrolysed milk whey was used in combination with other renewable resources such as rotten fruit extracts (Jozala et al. 2015). Thus, during cultivation of the producer strain *G. xylinus* ATCC 53582, a significant amount of BC (about 50 mg/mL, 0.52 mg/mL/h) was observed in 24-well microplates (30 °C) in the medium consisting of 30% whey and 50% rotten fruit extract (C/N ratio 27.5) (Jozala et al. 2015). Significant amounts of BC (5.45 g/L, 0.076 g/L/h) were also obtained using the producer culture *Gluconacetobacter sucrofermentans* B-11267 in non-hydrolysed CW medium (250-ml shake flasks, 28 °C, 250 rpm) (Revin et al. 2018). Besides, the use of CW also affects the BC micromorphological properties including the reduction of crystallinity index (Revin et al. 2018). Recently, the very promising use of CW permeate as a supplemental nutritional, probably nitrogen source for BC microbial production, has been reported (Bekatorou et al. 2019), which makes it possible to reduce the amount of yeast extract in the medium. Using the mixture of Corinthian currant grapes (CFS) extract (sugars 20 g/L), CW (50.4%) and yeast extract (1.7%), the producer *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 achieved 8.4 g/L of BC (0.05 g/L/h) in this relatively low-cost cultivation medium (Bekatorou et al. 2019).

Curdlan and pullulan

Both curdlan and pullulan are also glucose-derived extracellular homopolysaccharides which, however, have different producers, structural and physico-chemical properties (Table 1). Pullulan is a water-soluble neutral α-glucan, which consists of linear chains of D-glucopyranosyl units that alternate regularly between one (1,6)-α-D and two (1,4)-α-D linkages, or a linear polymer of maltotriosyl units connected by (1,6)-α-D linkages. The mechanism of its biosynthesis from precursors (UDP-D-glucose) by transglycosylation of oligosaccharides is not completely understood (Cheng et al. 2011). In turn, curdlan represents a water-insoluble β-glucan-type polysaccharide composed exclusively of β-1,3-linked glucose residues that have a complex tertiary structure (Eweda et al. 2015; Liu et al. 2015). It is also formed from UDP-D-glucose as a precursor and polymerised by curdlan (1,3-β-glucan) synthase (EC 2.4.1.34) (https://www.brendaenzymes.org/enzyme.php? ecno=2.4.1.34). Differences in structure and properties of these both polymers, in particular their water solubility, also influence their applications which are quite versatile and significant (Table 2) (Abdel-Hafez et al. 2007; Liu et al. 2015). Although it is possible to use various renewable resources for microbiological synthesis of curdlan and pullulan, the use of cheese whey and related products has been the subject of very few studies (Roukas 1999; Abdel-Hafez et al. 2007; Eweda et al. 2015 Liu et al. 2015). It has been shown that yeast-like fungi *Aureobasidium pullulans*

ATCC42023 can use media containing hydrolysed sweet CW (5% lactose, 0.8% to 1% protein) to produce (shake flasks, 200 rpm, 28 °C) pullulan. In addition, the concentration of pullulan obtained with acid hydrolysed CW was 7.6 g/L (0.063 g/L/h). In contrast, it increased with enzyme hydrolysed whey (10.16 g/L, 0.084 g/L/h) and could reach 12.4 g/L (0.103 g/L/h) using additives (0.05% glutamic acid, 0.30% KH_2PO_4) in the medium (Abdel-Hafez et al. 2007). These data are consistent with the previous study (Roukas 1999), using *Aureobasidium pullulans* P56 and deproteinised whey (5% lactose) hydrolysed with acid or enzymatically. In shake flasks (200 rpm, 30 °C), the use of enzyme hydrolysed CW (lactose 25 g/L or 50 g/L) resulted in slightly higher polymer concentrations (6.0 g/L, 0.025 g/L/h) compared to acid hydrolysed (5.0 g/L,0.021 g/L/h) whey. Maximum concentrations of pullulan were obtained (11.0 g/L, 0.046 g/L/h) when enzymatically hydrolysed lactose (25 g/L) was supplemented with 1% glutamic acid, 0.5% K_2HPO_4, 2.5% olive oil and 0.5% Tween80 (Roukas 1999). Unlike the pullulan production, the use of CW for the microbial synthesis of curdlan has still not been reported, except for a couple of studies on the utilisation of lactose for this purpose as the sole carbon source (Eweda et al. 2015; Liu et al. 2015). Thus, *Agrobacterium* strain HX1126 produced 21.4 g/L of curdlan (0.25 g/L/h) using lactose (50 g/L) in shake flasks (180 rpm, 30 °C) (Liu et al. 2015). This has also been demonstrated by several strains of rhizosphere isolates (Eweda et al. 2015). For example, the isolate K17 in the yeast-peptone (YP) medium (lactose 10%) in shake flasks (150 rpm, 28 °C) achieved the curdlan concentration of 5.2 g/L (0.072 g/L/h). The productivity already achieved on lactose in these studies suggests that cheese whey itself could also be used for a further microbial production of curdlan.

Dextran and levan

Like pullulan, dextran is also an extracellular water-soluble neutral α-glucan, which consists of linear chains of D-glucopyranosyl units with predominantly α-(1,6) linkages in the main chain and a variable amount of α-(1,2), α-(1,3) and α-(1,4) branched linkages. Dextrans are synthesised from sucrose by dextransucrase (EC 2.4.1.5) (https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.5) which is an extracellular glucosyltransferase that catalyses the gradual transfer of D-glucopyranosyl residues from sucrose to dextran and the release of fructose residues. As one that of the predominant members of lactic acid bacteria (LAB) group, *Leuconostocs* spp. is not only important in food fermentations, but also is a prominent producer culture for commercial production of dextran, where various strains of *L. mesenteroides* are used predominantly (Table 1) (Rehm 2010). As a biodegradable, biocompatible and easily soluble polymer, dextran is widely used in the food and pharmaceutical industries, medicine (blood volume expander) and biochemistry (chromatographic media), etc. (Santos et al. 2005; Lule et al. 2015; Lule et al. 2016). As with other biopolymers, a greater use of renewable and less expensive resources is important for the microbial production of dextran. Sugar beet or sugar cane molasses are most widely used in dextran production, because the main sugar beet or cane molasses are the most widely used renewable sources of sucrose for dextran production. However, there are opportunities to use also other renewable nutrients, including CW. In this regard, the ability of *L. mesenteroides* to produce dextran in combined sucrose–whey culture media has been proven for a long time (Schwarz and Bodie 1984). Thus, the cultivation (shake flasks, 150 rpm, 25–27 °C) of *L. mesenteroides* ATCC14935 in combined medium containing the sweet CW powder (4%) and sucrose (10%) and additives (0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4), resulted in substantially increased medium viscosity (greater than 500 cps within 46 h). The product properties were dextran-compatible and 95% sucrose and 40% lactose were consumed (Schwartz and Bodie 1984). The producer strain *L. mesenteroides* NRRL B512F in the broth consisting of Carob (*Ceratonia siliqua*) pod extract (CPE, sucrose 20 g/L) and percentage of deproteinised CW to obtain 5% of lactose in the medium during batch cultivation (5-L bioreactor, aeration 0.05 vvm, 35 °C, pH 6.7) achieved dextran concentration of 7.23 g/L (0.52 g/L/h) that was somewhat higher than when using lactose (5%) alone instead of CW (6.88 g/L, 0.49 g/L/h) (Santos et al. 2005). In a later study using the same strain *L. mesenteroides* NRRL B512F (PTCC 1591) and the medium containing molasses (Brix 40) as the carbon source and CW powder (2–10%) as the nitrogen source in shaking flasks (150 rpm, 30 °C, pH 6.8), concentrations of dextran reached 8.95 g/L (0.19 g/L/h) and 12.68 g/L (0.26 g/L/h) at 6% and 10% concentrations of CW, respectively (Moosavi-Nasab et al. 2010). Using other producers *L. mesenteroides* NCDC 744 and *L. mesenteroides* NCDC 745, 12.7 g/L (0.79 g/L/h) and 10.51 g/L (0.66 g/L/h) of dextran were obtained respectively in partially deproteinised paneer whey medium with 10% sucrose, 0.1% yeast extract and 0.1% K_2HPO_4 (Lule et al. 2015). Increased concentration of dextran (17.25 g/L) was observed under optimised (15% sucrose, 25 °C) conditions using the strain *L. mesenteroides* NCDC 7459 (BA08) (Lule et al. 2016). Recently, quite good results have been achieved with the use of producer strains *L. mesenteroides* NRRL B512F, NCIB 8023 and NRRL B12, to obtain 16.35 g/L (0.68 g/L/h),15.89 g/L (0.66 g/L/h) and 16.28 g/L/h (0.68 g/L/h) respectively in batch fermentation (30 °C) and the medium containing a

milk whey permeate (15 g/L), sucrose 20 g/L and yeast extract (15 g/L (Esmaeilnejad-Moghadam et al. 2019). There are still few, if any, reports on the use of whey for the microbial production of levan which is a β-fructan, a homopolysaccharide of fructose, which is of practical importance and with a widespread application (Table 1). Levan is formed by polymerisation of D-fructosyl units by β-2.6-linkages in linear chains with β-2,1 linkages for branching points which is carried out by levansucrase (EC 2.4.10), an extracellular fryctosyltransferase (https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.10) that catalyses the transfer of fructosyl residues from sucrose to levan and the release of glucose residues. The producer *Azotobacter vinelandii* D-08 has been reported to produce 14 g/L (0.58 g/L/h) in the medium consisting of molasses, distillery dregs and milk whey permeate (in proportion 5:3:2, respectively) in shake flasks (250 rpm, 28 °C) (Revin et al. 2016). It should be noted that dextran from whey can also be produced by culture from another genus. For instance, *Weissella cibaria* NCIHB42196 (Cinti 2015) in the medium containing lactose (10%) and sucrose (5%) reached the levan concentration of 31 g/L. It is noteworthy that the potential for the simultaneous formation of levan and dextran by *L. mesenteroides* KIBGE-IB22 has been strongly confirmed by NMR analysis (Siddiqui et al. 2014), which indicates the presence and function of both dextransucrase and levansucrase for this strain. This is in good agreement with previous data (Kang et al. 2005) and it is expected that the simultaneous formation of dextran and levan by *L. mesenteroides* spp. could also occur in the presence of CW or lactose.

Conclusions

Cheese whey (CW) and its derivatives can be used as the renewable carbon and/or nitrogen sources for the production of microbial polymers such as exopolysaccharides (EPS) and polyhydroxyalkanoates (PHAs).

In many cases, the use of CW and their derivatives makes it possible to achieve high productivity, in particular for the fed-batch cultivation in bioreactors, which could improve the overall economic efficiency of microbial polymer production as well as promote the development of more environmentally friendly technologies and wider use of biodegradable and biocompatible materials.

The effectiveness of whey product application for microbial fermentation is largely dependent on the ability of the producer cultures to hydrolyse lactose.

In cases where the cultures of the producers are not capable of directly utilising lactose, the enzyme hydrolysis with β-galactosidase is preferred for the pre-treatment of whey.

To provide a higher carbon/nitrogen (C/N) ratio that is more favourable to microbial polymer biosynthesis, CW permeate, i.e. the fraction with wholly or partially separated proteins, has certain benefits.

Abbreviations

AAB: Acetic acid bacteria; AT: Acetyltransferases; BC: Bacterial cellulose; BOD: Biological oxygen demand; C: Carbon; N: Nitrogen; CW: Cheese whey; COD: Chemical oxygen demand; CFS: Corinthian currant grapes; EPS: Exopolysaccharides; GT: Glycosyltransferases; HePS: Heteropolysaccharides; HoPS: Homopolysaccharides; HasA: Hyaluronan synthase; HA: Hyaluronic acid; KPT: Ketal pyruvate transferase; MMC: Mixed microbial cultures; PHA: Polyhydroxyalkanoates; PHB: Polyhydroxybutyrate; GAM: Glucose–ethanol acetic acid medium; VFAs: Volatile fatty acids; WP: Whey permeate; WPC: Concentrated whey protein; WPH: Whey protein hydrolyzate; YP: Yeast peptone.

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

General writing of the manuscript, investigation, data collection and analysis—PZ; data search, editing and design—SK; conceptualisation, critical revision and supervision—PS. All authors contributed to the study conception and design, read and approved the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by the Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia (Grant number 19-00-A01612-000004). The funders had no role in study design, data collection and interpretation or the decision to submit the work for publication.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the first author on reasonable request and/or are freely accessible via the Internet.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 30 March 2020 Accepted: 23 June 2020
Published online: 01 July 2020

References

Abd El-Gawad IA, Murad HA, El-Sayed EM, Salah SH (2001) Optimum conditions for the production of xanthan gum from hydrolysed UF-milk permeate by locally isolated *Xanthomonas campestris*. Egypt J Dairy Sci 29:37–51

Abdel Hafez AM, Abdelhady HM, Sharaf MS, El-Tayeb TS (2007) Bioconversion of various industrial by-products and agricultural wastes into pullulan. J Appl Sci Res 3(11):1416–1425

Abdelhady HM, Enas AH, Sohir SA, Sara MA (2015) Bacterial cellulose production as affected by bacterial strains and some fermentation conditions. Nat Sci 13(3):30–40

Ahn WS, Park SJ, Lee SY (2000) Production of poly (3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. Appl Environ Microbiol 66:3624–3627. https://doi.org/10.1128/aem.66.8.3624-3627.2000

Ahn WS, Park SJ, Lee SY (2001) Production of poly (3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant

Escherichia coli. Biotechnol Lett 23:235–240. https://doi.org/10.1128/aem.66.8.3624-3627.2000
Alborch M (2014) LIFE+ WHEYPACK - Reduction of CO2 emissions by the PHB use obtained from whey : demonstration in dairy products packaging. LIFE 13 ENV/ES/000608. https://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=search.dspPage&n proj id=5084#PD
Amado IR, Vázquez JA, Pastrana L, Teixeira JA (2016) Cheese whey: a cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. Food Chem 198:54–61. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.062
Amaro TMMM, Rosa F, Comi G, Iacumin L (2019) Prospects for the use of whey for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. Front Microbiol 10:992. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00992
Arancon RAD, Lin CSK, Chan KM, Kwan TH, Luque R (2013) Advances on waste valorization: new horizons for a more sustainable society. Ener Sci Engin 1(2):53–71. https://doi.org/10.1002/ese3.9
Babu RP, O'Connor K, Seeram R (2013) Current progress on bio-based polymers and their future trends. Prog Biomat 2(8):1–16
Bajaj IB, Saudagar PS, Singhal RS, Pandey A (2006) Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. J Biosci Bioeng 102(3):150–156. https://doi.org/10.1263/jbb.102.150
Battad-Bernardo E, McCrindle SL, Couperwhite I, Neilan BA (2004) Insertion of an *E. coli lacZ* gene in *Acetobacter xylinus* for the production of cellulose in whey. FEMS Microbiol Lett. 231(2):253–260. https://doi.org/10.1016/s0378-1097(04)00007-2
Becker A. (2015). Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. Front Microbiol. 6:687. doi: 10.3389/fmicb.2015.00687
Bekatorou A, Plioni I, Sparou K, Tsafrakidou RMP, Petsi T, Kordouli E (2019) Bacterial cellulose production using the corinthian currant finishing side-stream and cheese whey: process optimization and textural characterization. Foods 8:193–207. https://doi.org/10.3390/foods8060193
Berwig KH, Baldasso C, Dettmer A (2016) Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) generated by *Alcaligenes latus* using lactose and whey after acid protein precipitation process. Bioresour Technol 218:31–37. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.067
Brown S, Purnmill P (2008) Recombinant production of hyaluronic acid. Cur Pharmac Biotechnol 9(4):239–241. https://doi.org/10.2174/138920108785161488
Bustamante D, Segarra S, Tortajada M, Ramón D, del Cerro C, Prieto A, Rojas A (2019) In silico prospection of microorganisms to produce polyhydroxyalkanoate from whey: *Caulobacter segnis* DSM 29236 as a suitable industrial strain. Microbial Biotechnol. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13371
Carreira P, Mendes JAS, Trovatti E, Serafim LS, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP (2011) Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. Biores Techn 102(15):7354–7360. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.081
Chanfrau JMP, Pérez JN, Fiallos MVL, Rivera L, Abril VH, Guerrero MJC, Toledo LET (2017) Milk whey—from a problematic byproduct to a source of valuable products for health and industry: an overview from biotechnology. Prensa Med Argent 103(4):1–11. https://doi.org/10.4172/lpma.1000254
Chegini G, Taheri M (2013) Whey powder: process technology and physical properties: a review. J Middle East Sci Res 13:1377–1387. https://doi.org/10.5829/idosi.mesjr.2013.13.10.1239
Chen X, Gao H, Ploehn HJ (2014) Montmorillonite-levan nanocomposites with improved thermal and mechanical properties. Carbohyd Polym 101:565–573. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.073
Cheng KC, Demirci A, Catchmark JM (2011) Pullulan: biosynthesis, production, and applications. Appl Microbiol and Biotechnol 92(1):29–44. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3477-y
Chong BF, Blank LM, Mclaughlin R, Nielsen LK (2004) Microbial hyaluronic acid production. Appl Microbiol and Biotechnol 66(4):341–351. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1774-4
Cinti G (2015) Method for the production of dextran. International Patent WO 2015/117624 A1, 13 Aug 2015
Colombo B, Pepè Sciarria T, Reis M, Scaglia B, Adani F (2016) Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. Biores Technol 218(692):699. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.024
Donot F, Fontana A, Baccou JC, Schorr-Galindo S (2012) Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohyd Polym 87(2):951–962. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083
Duque AF, Oliveira CSS, Carmo ITD, Gouveia AR, Pardelha F, Ramos AM, Reis MAM (2014) Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition. New Biotechnol 31(4):276–288. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.010
El-Sawah MMA, Ashour EH (1999) Xanthan production from whey treated with lactase. Pakistan J Biol Sci 2(4):1240–1244
Esmaeilnejad-Moghadam B, Mokarram RR, Hejazi MA, Khiyabani MS, Keivaninahr F (2019) Low molecular weight dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* strains: optimization of a new culture medium and the rheological assessments. Bioact Carbohydr Diet Fibre. https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2019.100181
Eweda WE, Sharaf MS, El Sayed AM (2015) Production of curdlan by some bacteria isolated from Egyptian soils. Middle East J App. Sci 1:102–118
Fialho AM, Martins LO, Donval ML, Leitao JH, Ridout MJ, Jay AJ, Morris VJ, Sá-Correia I (1999) Structures and properties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from lactose compared with those produced from glucose and from cheese whey. Appl Environ Microbiol 65:2485–2491
Fialho AM, Moreira LM, Granja AT, Popescu AO, Hoffmann K, Sá-Correia I (2008) Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 79(6):889–900. https://doi.org/10.1007/s00253-008-1496-0
Freitas F, Alves VD, Reis MAM (2011) Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends Biotechnol 29(8):388–398. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008
Gahlawat G, Srivastava AK (2017) Model-based nutrient feeding strategies for the increased production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus*. Appl Biochem Biotechnol 183(2):530–542. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2482-8
Gamal FG, Abdel-hady HM, Amin SA, Ali SK (2018) Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* on crude sweet whey using different bioreactor feeding strategies. South Asian J Res in Microbiol 1(4):1–12. https://doi.org/10.9734/sajrm/2018/v1i4815
Ghazal SMA, Elsayed WS, Badr UM, Gebreel HM, Khalil KMA (2011) Genetically modified strains of *Xanthomonas campestris* higher xanthan producer and capable to utilize whey. Cur Res in Bacteriol 4:44–62. https://doi.org/10.3923/crb.2011.44.62
Gopi S, Anitha A, Thomas S (2016) Biodegradable Green Composites (ed) Biodegradable Green Composites, 1E. Wiley & Sons Inc, USA pp 1-17
Gorgieva S, Trček J (2019) Bacterial cellulose: production, modification and perspectives in biomedical applications. Nanomaterials 9(10):1352. https://doi.org/10.3390/nano9101352
Güven G, Perendeci A, Tanyolaç A (2008) Electrochemical treatment of deproteinated whey wastewater and optimization of treatment conditions with response surface methodology. J of Haz Mater 157(1):69–78. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.082
Hendawy WS, El Kanani YM, El Batawy OI, El Mongy TM (2019) Optimization the alginate production conditions in sweet whey medium by *Azotobacter chrococcum*. AUJAS Egypt Spec Issue 27(4):479–489
Kang HK, Seo MY, Seo ES, Kim D, Chung SY, Kimura A, Robyt JF (2005) Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Acta 1727(1):5–15. https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.10.012
Katzen F, Ferreiro DU, Oddo CG (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. J Bacteriol 180(7):1607–1617
Khanafari A, Sepahei A (2007) Alginate biopolymer production by *Azotobacter chroococcum* from whey degradation. Int J Environ Sci Tech 4(4):427–432
Koller M, Braunegg G (2018) Advanced approaches to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable and economic fashion. EuroBiotech J. https://doi.org/10.2478/ebtj2018-0013
Koller M, Hesse PJ, Bona R, Kutschera C, Atlic A, Braunegg G (2007) Biosynthesis of high quality polyhydroxyalkanoate co- and terpolyesters for

potential medical application by the archaeon *Haloferax mediterranei*. Macromol Symp 253:33–39. https://doi.org/10.1002/masy.200750704
Koller M, Salerno A, Muhr A et al (2012) Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers and plastics from renewable resources. Mater Technol 46:23–30
Kreyenschulte D, Krull R, Margariti A (2012) Recent advances in microbial biopolymer production and purification. Crit Rev Biotechnol. https://doi.org/10.3109/07388551.2012.743501
Kucera D, Pernicová I, Kovalcik A, Koller M, Mullerova L, Sedlacek P (2018) Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. Bioresour Technol 256:552–556. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.06
Lappa IK, Papadaki A, Kachrimanidou V, Terpou A, Koulougliotis D, Eriotou E, Kopsahelis N (2019) Cheese whey processing: integrated biorefinery concepts and emerging food applications. Foods 8(8):347. https://doi.org/10.3390/foods8080347
Lin AY, Nickerson TA (1977) Acid hydrolysis of lactose in whey versus aqueous solutions. J Dair Sci 60(1):34–39
Liu Y, Gu Q, Ofosu FK, Yu X (2015) Isolation and characterization of curdlan produced by *Agrobacterium* HX1126 using α-lactose as substrate. Inter J Biol Macromol 81:498–503. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.04
Lo YM, Sanem AS, Hsu CH (2007) Bioconversion of whey lactose into microbial exopolysaccharides. In: Yang ST (ed) Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Elsevier Science, Netherlands
Luckachan GE, Pillai CKS (2011) Biodegradable Polymers—a review on recent trends and emerging perspectives. J Polym Environ 19:637–676. https://doi.org/10.1007/s10924-011-03
Lule V, Singh R, Behare P, Tomar SK (2015) Comparison of exopolysaccharide production by indigenous *Leuconostoc mesenteroides* strains in whey medium. Asian J Dairy Food Res. https://doi.org/10.5958/0976-0563.2015.00002.0
Lule VK, Singh R, Pophaly SD, Poonam SK, Tomar SK (2016) Production and structural characterisation of dextran from an indigenous strain of *Leuconostoc mesenteroides* BA08 in whey. Inter J Dairy Tech 69(4):520–531. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12271
Marangoni C, Furigo A, De Aragão GMF (2002) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. Proc Biochem 38:137–141. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.056
Mesomo M, Silva MF, Boni G, Padilha FF, Mazutti M, Mossi A, Treichel H (2009) Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestrisfrom* cheese whey: production optimisation and rheological characterisation. J Scien Food Agricult 89(14):2440–2445. https://doi.org/10.1002/jsfa.3743
Mikkelsen D, Flanagan BM, Dykes GA, Gidley MJ (2009) Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinusstrain* ATCC 53524. J Appl Microbiol 107(2):576–583. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x
Mohan N, Balakrishnan R, Sivaprakasam S (2016) Optimization and effect of dairy industrial waste as media components in the production of hyaluronic acid by *Streptococcus thermophilus*. Prepar Biochem Biotechnol 46(6):628–638. https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1128446
Mollea C, Marmo L, Bosco F (2013) Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. Food Ind. https://doi.org/10.5772/53159
Narancic T, O'Connor KE (2019) Plastic waste as a global challenge: are biodegradable plastics the answer to the plastic waste problem? Microbiol 165:129–137. https://doi.org/10.1099/mic.0.000749
Nath A, Dixit M, Bandiya A, Chavda S, Desai AJ (2008) Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch cultures of *Methylobacterium* sp ZP24. Biores Techn. 99(13):5749–5755. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.017
Niknezhad SV, Asadollahi MA, Zamani A, Biria D, Doostmohammadi M (2015) Optimization of xanthan gum production using cheese whey and response surface methodology. Food Sci Biotech 24(2):453–460. https://doi.org/10.1007/s10068-015-0060-9
Nitschke M, Rodrigues V, Schinatto LF (2001) Formulacao de meios de cultivo a base de soro de leite para a producao de goma xantana por *X. campestris* C7L. Cienc Tecnol Alim 21:82–85. https://doi.org/10.1590/S0101-20612001000100018
Özcan E, Öner ET (2015) Microbial Production of Extracellular Polysaccharides from Biomass Sources. Polysacch. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_51
Pais J, Serafim LS, Freitas F, Reis MAM (2016) Conversion of cheese whey into poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. N Biotechnol 33(1):224–230. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.06.001
Pantazaki AA, Papaneophytou CP, Pritsa AG, Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA (2009) Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. Proc Biochem 44(8):847–853. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.002
Park SJ, Park JP, Lee SY (2002) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* in a pilot-scale fermenter. Appl Environ Microbiol 63:4795–4796. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11350.x
Pescuma M, de Valdez GF, Mozzi F (2015) Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 99(15):6183–6196. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6766-z
Poli A, Di Donato P, Abbamondi GR, Nicolaus B (2011) Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. Archaea. https://doi.org/10.1155/2011/693253
Pollock and Thorne (1994) *Xanthomonas campestris* strain for production of xanthan gum. US Patent 5,279,961 18 Jan 1994
Popović SZ, Lazić VL, Hromis NM, Šuput DZ, Bulu SN (2018) Biopolymer packaging materials for food shelf-life prolongation. Biopolymers Food Design. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811449-0.00008-6
Povolo S, Toffano P, Basaglia M, Casella S (2010) Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. Bioresour Technol 101:7902–7907. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.029
Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J (2012) Cheese whey management: a review. J Environ Manag 110:48–68. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018
RamKumar Pandian S, Deepak V, Kalishwaralal K, Rameshkumar N, Jeyaraj M, Gurunathan S (2010) Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. Biores Techn 101(2):705–711. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.040
Rehm BHA (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nat Rev Microbiol 8:578–592. https://doi.org/10.1038/nrmicro2354
Revin VV, Novokuptsev NV, Red'kin NA (2016) Optimization of cultivation conditions for *Azotobacter vinelandii* D-08, producer of the polysaccharide levan, for obtaining biocomposite materials. BioRes. https://doi.org/10.15376/biores.11.4.9661-9675
Revin V, Liyaskina E, Nazarkina M, Bogatyreva A, Shchankin M (2018) Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. Braz J Microb. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.012
Rosalam S, England R (2006) Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. Enz Microbial Technol 39:197–207. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.019
Rottava I, Batesini G, Silva MF, Lerin L, de Oliveira D, Padilha FF, Treichel H (2009) Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. Carbohyd Polym 77(1):65–71. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.001
Roukas T (1999) Pullulan production from deproteinized whey by *Aureobasidium pullulans*. J Industr Microbiol Biotechnol 22:617–621
Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. Bioresour Bioprocess 5:1–15. https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z
Salari M, Khiabani MS, Mokarram RR, Ghanbarzadeh B, Kafil HS (2018) Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. Intern J Bio Macromol. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.136
San Blas F (1991) Xanthomonas campestris mutant that produces xanthan gum upon cultivation on lactose or unhydrolyzed whey. European Patent 0 481 785 A2, 17 Oct 1991
Santos M, Rodrigues A, Teixeira JA (2005) Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides*

NRRL B512(f). Biochem Engin J 25(1):1–6. https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.022
Savvides AL, Katsifas EA, Hatzinikolaou DG, Karagouni AD (2012) Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium. W J Microbiol Biotechnol 28(8):2759–2764. https://doi.org/10.1007/s11274-012-1087-1
Schwartz RD, Bodle EM (1984) Production of viscous dextran-containing whey–sucrose broths by *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 14935. Appl Environ Microbiol 48:678–679
Semjonovs P, Shakirova L, Treimane R, Shvirksts K, Auzina L, Cleenwerck I, Zikmanis P (2015) Production of extracellular fructans by *Gluconobacter nephelii* P1464. Lett Appl Microbiol 62:145–152. https://doi.org/10.1111/lam.12521
Semjonovs P, Rukisha M, Paegle L, Saka M, Treimane R, Skute M, Rozenberga L, Vikele L, Sabovics M, Cleenwerck I (2017) Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. Appl Microbiol Biotechnol 101:1003–1012. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7761-8
Shanmugam M, Abirami RG (2019) Microbial Polysaccharides—Chemistry and Applications. J Bio Active Prod Nat 9:73–78. https://doi.org/10.1080/22311866.2019.1571944
Siddiqui NN, Aman A, Silipo A, Qader SAU, Molinaro A (2014) Structural analysis and characterization of dextran produced by wild and mutant strains of *Leuconostoc mesenteroides*. Carbohyd Polym 99:331338. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.004
Siracusa V, Rocculi P, Romani S, Dalla Rosa M (2008) Biodegradable polymers for food packaging: a review. Trends Food Sci Techn 19:634–643. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003
Sirvio JA, Visanko M, Ukkola J, Liimatainen H (2018) Effect of plasticizers on the mechanical and thermomechanical properties of cellulose-based biocomposite films. Industr Crops Prod 122:513–521. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.039
Sobenes J, Alegre R (2015) Producão de goma xantana por *X Campestris* ATCC 13951 utilizando soro de queijo desproteinado. Rev Ion Invest Optim y Nuev Proce En Ingen 28(2):69–77. https://doi.org/10.18273/revion.v28n2-2015006
Thompson DN, Hamilton MA (2001) Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. Appl Biochem Biotech 91–93(1–9):503–514. https://doi.org/10.1385/abab:91-93:1-9:503
Torres DPM, Gonçalves MPF, Teixeira JA, Rodrigues LR (2010) Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. Compreh Rev Food Sci Food Saf 9(5):438–454. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x
Trujillo-Roldán MA, John FMG, Angélica MCA, Norma AVC (2015) The production, molecular weight and viscosifying power of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* is affected by the carbon source insubmerged cultures. DYNA 82(194):21–26. https://doi.org/10.15446/dyna.v82n194.44201
Tsang YF, Kumar V, Samadar P, Yang Y, Lee J, Ok YS, Song H, Kl-Hyun Kim K-H, Kwon EE, Jae Jeon YJ (2019) Production of bioplastic through food waste valorization. Environ Int 127:625–644. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.076
Tsouko E, Kourmentza C, Ladakis D, Kopsahelis N, Mandala I, Papanikolaou S, Koutinas A (2015) Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. Inter J Molec Sci 16(12):14832–14849. https://doi.org/10.3390/ijms160714832
Ul-Islam M, Khan S, Ullah MW, Park JK (2015) Bacterial cellulose composites: synthetic strategies and multiple applications in bio-medical and electro-conductive fields. Biotechnol J 10:847–1861. https://doi.org/10.1002/biot.201500106
Urtuvia V, Maturana N, Acevedo F, Peña C, Díaz-Barrera A (2017) Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. W J Microbio Biotech. https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x
Van de Velde K, Kiekens P (2002) Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. Polym Test 21(4):433–442. https://doi.org/10.1016/S0142-9418(01)00107-6
Wang D, Kim H, Lee S, Kim DH, Joe MH (2020) Improved gellangum production by a newly-isolated *Sphingomonas azotifigens* GL-1 in a cheese whey and molasses based medium. Proc Biochem. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.020
Yellore V, Desai A (1998) Production of poly-3-hydroxybutyrate from lactose and whey by *Methylobacterium* sp. ZP24. Lett Appl Microbiol 26:391–394
Young FK, Kastner JR, May SW (1994) Microbial production of poly-betahydroxybutyric acid from D-xylose and lactose by *Pseudomonas cepacia*. Appl Environ Microbiol 60(11):4195–4198

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Submit your manuscript to a SpringerOpen journal and benefit from:

- ► Convenient online submission
- ► Rigorous peer review
- ► Open access: articles freely available online
- ► High visibility within the field
- ► Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

2.PIELIKUMS: PROJEKTA IETVAROS SAGATAVOTIE POPULĀRZINĀTNISKIE RAKSTI

1. P. Semjonovs, P. Zikmanis, A. Šilaks, K. Neiberts, S. Kolesovs (2021), No sūkalām līdz bioplastmasai. Saimnieks LV, 6:108–112

Tuvojoties Līgo svētkiem, tā vien jādomā par ikdienas un svētku ēdienreižu tik neatņemamo sastāvdaļu – pienu un sieru. Nav šaubu, ka Jāņu siers tiek celts katra *īsta* latvieša Līgo svētku galdā. Jāņu siers apveltīts ar dziesmām, ticējumiem un tradīcijām, ko no paaudzes paaudzei nodevušas mūsu prasmīgās saimnieces. Mūsdienās tas tiek gatavots jau ievērojami lielākos apjomos, bet pēc tiem pašiem principiem kā sensenos laikos lauku sētās, arī tā tapšanas process nav mainījies. No 2015. gada *Jāņu siers* iekļauts Eiropas Savienības Garantēto tradicionālo īpatnību reģistrā, līdz ar to tā gatavošana tirdzniecībai jāveic, ievērojot noteiktās proporcijas un tehnoloģiju, lai nezaudētu tā tradicionālo garšu.

Piena lopkopība ir nozīmīga lauksaimniecības sastāvdaļa. Kā nekā ceturtā daļa lauksaimniecībā saražotās produkcijas ir tieši piens. Latvijas piena lopkopji govju slaukšanas, turēšanas, ēdināšanas un atražošanas jautājumus jau risina tādā līmenī, ka spēj konkurēt ar kolēģiem citās Eiropas valstīs un piedāvāt augstas kvalitātes produktu patēriņam ne tikai Latvijā, bet arī ārpus tās robežām.

Izrādās, ka pienu varam izmantot ne tikai pārtikā, bet nu jau arī bioplastmasas un citu līdzīgu materiālu ražošanā. Piemēram, Latvijas Universitātē tiek pētīts piena pārstrādes blakusprodukts – sūkalas, meklējot komerciāli izdevīgus risinājumus, lai no tām radītu biopolimēru produktu ar augstu pievienoto vērtību.

Vai nav interesanti, cik šis mūsu *baltais dārgums* var būt daudzpusīgs?

Elīna Tilaka

Elīna Tilaka
Saimnieks LV redaktore

Esi Saimnieks savā zemē!®

Saimnieks LV Izdevniecība
Lauksaimniecības nozares komerčžurnāls

Uz vāka:
ZS *Lācīši* jaunais saimnieks Gints Gžibovskis ar ģimeni – tēvu Staņislavu, mammu Guntu un mīsu Zani.

VĀKA FOTO: **Arnis INDRIKS**

REDAKCIJAS ADRESE
SAIMNIEKS LV, Jūrkalnes iela 15, Rīga, LV–1046

REĢISTRĀCIJAS NUMURS
40003683457

ABONĒŠANAS INDEKSS
2203

E-PASTS
birojs@saimnieks.lv

IZDEVNIECĪBAS DIREKTORS
Dip. agr. Rihards Krastiņš, tālr.: 26128855

REDAKTORE
Elīna Tilaka, redaktors@saimnieks.lv

REKLĀMA
tālr.: 28611555

REALIZĀCIJA
tālr.: 28611555

LASĪTĀJU SERVISS
tālr.: 28611555

Jūsu atsauksmes par žurnālā lasīto, jautājumus un ieteikumus jaunām tēmām gaidīsim e-pastā: redaktors@saimnieks.lv

Par reklāmas materiālu pilnībā atbild reklāmdevējs. Publicētie materiāli ne vienmēr atspoguļo redakcijas viedokli.

Pārpublicējot jebkuru materiālu, nepieciešama SIA Saimnieks LV rakstiska atļauja.

No sūkalām līdz bioplastmasai

Saskaņā ar ES nostādnēm pētījumi rūpnieciskās biotehnoloģijas jomā arvien vairāk tiek pievērsti aprites ekonomikai, kas paredz, ka viena noteikta bioprocesa blakusprodukti vai atkritumvielas var tikt izmantotas kā izejvielas citu produktu iegūšanai, līdz minimumam samazinot atkritumvielu daudzumu.

SAGATAVOJA un FOTO: Pāvels SEMJANOVS, Pēteris ZIKMANIS, Sergejs KOĻESOVS, Artūrs ŠILAKS, Kristaps NEIBERGS, Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta Rūpnieciskās mikrobioloģijas un pārtikas biotehnoloģijas laboratorija

Tas ir īpaši svarīgi gadījumos, kad tehnoloģiskajos procesos veidojas ievērojams daudzums blakusproduktu un/vai atkritumvielu. Piena rūpniecībā nozīmīgs blakusprodukts ir sūkalas, kas veido 80–90 % no izmantotās izejvielas apjoma un satur aptuveni 55 % piena uzturvielu. Izšķir divu veidu sūkalas (1. tabula): saldpiena un skābpiena. Saldpiena sūkalas ar pH 5.6–6.3 rodas siera ražošanas procesā, ja tiek izmantoti piena recināšanas fermenti (himozīns, pepsīns), savukārt skābpiena sūkalas ar pH 4.4–4.6 atdalās skābpiena sieru un biezpiena ražošanā, ja pienu sarecina ar pienskābi, kas veidojas, pienskābes baktērijām pārraudzējot piena cukuru (laktozi). Recināšana panākama, arī pievienojot pienam citas, pārsvarā organiskās skābes (piemēram, citronskābi). Tādējādi līdztekus katram saražotā siera kilogramam veidojas aptuveni 9 L sūkalu.

Skābpiena sūkalām salīdzinājumā ar saldpiena sūkalām ir zemāks olbaltumvielu, augstāks sāļu saturs un nedaudz mazāk laktozes. Augstāka sāļu satura dēļ augstākas ir arī to utilizācijas izmaksas.

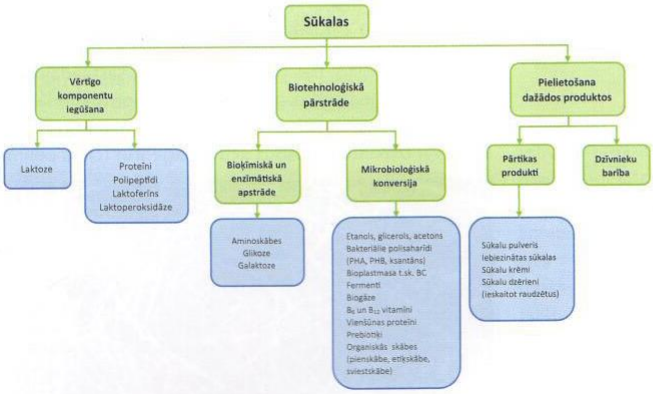
Augot piena rūpniecības apjomiem, ievērojami palielinās

1. tabula. Sūkalu sastāvs [a], g/L

Komponentes	Saldpiena sūkalas	Skābpiena sūkalas
Kopējā sausna	63–70	63–70
Laktoze	46–52	44–46
Proteīni	6–10	6–8
Laktāti	2	6.4
Kalcijs	0.4–0.6	1.2–1.6
Fosfāti	1–3	2–4.5
Hlorīdi	1.1	1.1
pH	6–7	< 5

[a] Izmantoti *Kaur et al.* 2020 dati.

pasaulē saražoto sūkalu apjoms, t.i., vismaz 180–200 milj. t gadā. Šo blakusproduktu raksturo ļoti liels bioķīmiskā skābekļa patēriņš (BSP) un ķīmiskā skābekļa patēriņš (ĶSP) – attiecīgi 27–60 kg/m^3 un 50–102 kg/m^3. Tas liecina par sūkalu visai augstu noturību pret oksidēšanos jeb noārdīšanos bioloģisko vai ķīmisko oksidējošo aģentu (O_2 – ekvivalenti) iedarbībā. To nosaka lielā organisko vielu, īpaši laktozes (39–60 kg/m^3) koncentrācija, kuras noārdīšanās ir apgrūtināta, tādējādi radot nopietnas problēmas gan piena rūpniecībai, gan ārējai videi. Tādēļ nav pieļaujama sūkalu tieša un nekontrolēta ievadīšana augsnē un/vai ūdenstilpnēs, kas radītu nopietnu kaitējumu šo ekosistēmu noturībai, dzīvotspējai un līdz ar to videi kopumā.



1. attēls. Sūkalu pārstrādes iespējas augstas pievienotās vērtības produktu ieguvei.

Kā tiek izmantotas sūkalas?

Lietderīgai sūkalu izmantošanai ir izstrādātas un piemērotas dažādas tehnoloģijas (1. attēls). Šim nolūkam izmanto divas atšķirīgas pieejas. Pirmā pieeja – sūkalas sadalīt, izmantojot dažādus tehnoloģiskos paņēmienus un iegūstot komerciāli nozīmīgus produktus, piemēram, individuālus proteīnus vai to koncentrātus, deproteinizētas sūkalas (t.s. sūkalu permeātu), laktozi, glikozes-galaktozes sīrupu u.c. (1. attēls). Otrā pieeja – sūkalu biokonversija mikrobiālās fermentācijas procesos, izmantojot laktozi kā oglekļa avotu daudzveidīgu augstas pievienotās vērtības produktu ieguvei. To vidū minami spirti (etanols, butanols), organiskās skābes (pienskābe, dzintarskābe, propionskābe), bakteriocīni, biopolimēri (fermenti, polihidroksibutirāts, ksantāns u.c.), vienšūnas organismu proteīni un eļļas.

Lai gan sūkalas ir piemērota izejviela mikrobiālās fermentācijas nodrošināšanai, daudzas rūpnieciski nozīmīgas mikroorganismu kultūras, izņemot pienskābes baktērijas, nespēj izmantot laktozi kā vienīgo oglekļa avotu. Sūkalām ir arī salīdzinoši zema oglekļa un slāpekļa (C/N) attiecība, kas negatīvi ietekmē vairāku produktu, tostarp biopolimēru, biosintēzi.

Lai sūkalas efektīvāk izmantotu rūpnieciskajā fermentācijā, nepieciešams veikt to priekšapstrādi un/vai izmantot sūkalu atvasinājumus, piemēram sūkalu pulveri, šādi fermentācijas vidē nodrošinot noteiktu laktozes koncentrāciju, izvairoties no sūkalu sastāva sezonālām svārstībām un pagarinot to uzglabāšanas laiku.

Tomēr jāatzīst, ka sūkalu komerciālais

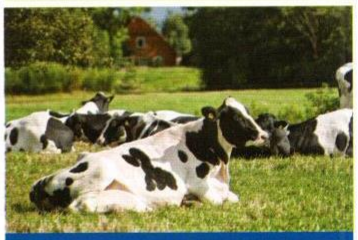
Vilomix
Cultivating Value

Saņem svētku atlaides
Vilomix ražotajai minerālbarībai

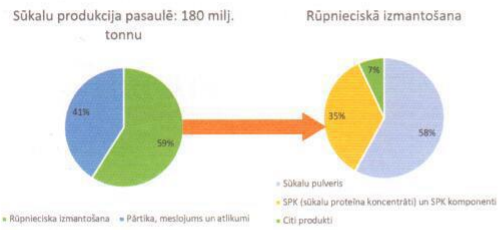
Akcijas periods:
1.06.2021–30.06.2021

Jauka bija Jāņu diena
Par visām dieniņām:
Līgo saule, līgo bite,
Līgo visa radībiņa

Priecīgus Līgo svētkus!



Vilomix Baltic SIA
Tālr. 29353520, 63181127
vilomix@vilomix.lv, www.vilomix.lv



2. attēls. Sūkalu produkcijas apjoms un to patēriņa sadalījums dažādās nozarēs.

pielietojums pa nozarēm (2. attēls) joprojām ir nevienmērīgs, daudzējādā ziņā ierobežots un nepietiekams, īpaši attiecībā uz to produktiem ar augstu pievienoto vērtību (1. attēls). To vidū īpaši atzīmējami mikroorganismu sintezētie biopolimēri, to skaitā ārpusšūnu polisaharīdi (EPS), kuru ieguvei tiek pievērsta arvien lielāka uzmanība, arī LU Bioloģijas institūta Rūpnieciskās mikrobioloģijas un biotehnoloģijas laboratorijā.

Ļoti daudz no fosilām izejvielām iegūtās plastmasas atkritumu (*vienreizlietojamie* trauki, iepakojumi u.tml.) nonāk vidē no dažādiem avotiem gan uz sauszemes, gan jūrā, radot būtisku kaitējumu ekonomikai un videi. Bioloģiski nesadalāmu materiālu, arī tradicionālo polimēru (plastmasu) plašā un pat pieaugošā izmantošana rada bažas par vides piesārņojumu un motivē meklēt videi draudzīgākus risinājumus.

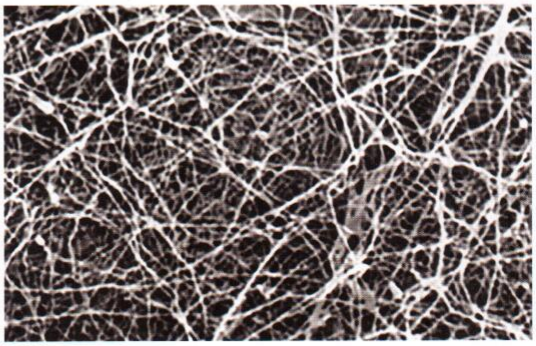
No sūkalām līdz bioplastmasai

Bioplastmasa ir bioloģiskas izcelsmes vai/un bioloģiski noārdāms polimēra materiāls. Termins *bioloģiskas izcelsmes* nozīmē, ka materiāls vai produkts ir iegūts no atjaunojamiem resursiem. Šiem nosacījumiem pilnībā atbilst mikrobiālās izcelsmes polimēri, kuru biosintēzei tiek izmantotas sūkalas un/vai to atvasinājumi, jo veicina videi draudzīgāku un ekonomiski efektīvāku tehnoloģiju attīstību, tātad arī bioloģiski noārdāmu un bioloģiski saderīgu materiālu plašāku izmantošanu. Turklāt mikrobiālās izcelsmes polimēri ne tikai neatpaliek no fosilās izcelsmes polimēriem, bet daudzējādā ziņā pat pārspēj tos, īpaši tad, ja tiek izmantoti funkcionāli daudzveidīgu kompozītu veidā. Bioplastmasai ir ievērojams komerciālais potenciāls un daudzsološas pielietojuma iespējas pārtikas rūpniecībā, biomedicīnā, elektronikā u.c. jomās, kur tiek izmantotas fosilās izcelsmes plastmasas.

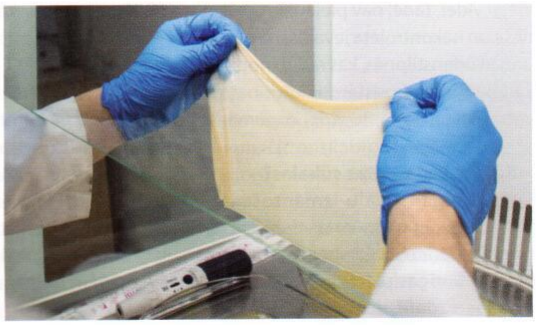
Šajā ziņā īpaša uzmanība jāpievērš bakteriālās celulozes (BC) ieguvei, kā izejvielu izmantojot sūkalas, un šī polimēra tehnoloģiskajām iespējām. BC ir D-glikozes polimērs, kas veido nanošķiedras ar unikālu 3D – tīklveida struktūru (3A. attēls). BC raksturo unikālu īpašību kombinācija, piemēram, augsts kristāliskums un polimerizācijas pakāpe, liels virsmas laukums, augsta elastība, stiepes izturība un ūdens noturēšanas spēja. Tā nesatur lignīnu, hemicelulozi, pektīnu, tādēļ ir augstvērtīgs un bioloģiski labi savietojams materiāls. Tas ir īpaši svarīgi BC biomedicīniskajiem pielietojumiem produktos ar augstu pievienoto vērtību (augstas stiprības biopolimēri, iepakošanas materiāli, brūču funkcionalizētie pārsēji, audus aizvietojošie materiāli, farmaceitisko preparātu pārneses aģenti, biosensoru elementi u.c.). Kā viena no unikālām BC īpašībām ir jāizceļ tās mehāniskā izturība, kas vismaz divas reizes pārsniedz augu (koksnes) izcelsmes celulozes rādītājus. Pateicoties savām unikālajām struktūras un mehāniskajām īpašībām salīdzinājumā ar augu izcelsmes celulozi, BC varētu kļūt par plašāk pieejamu un industriāli daudzpusīgi izmantojamu izejmateriālu.

***Aktīvais iepakojums* pārtikai**

Pārtikas biotehnoloģiju nozarē aktuāla ir tādu nekaitīgu un bioloģiski noārdāmu pārklājumu un iepakojuma materiālu izveide, kas būtiski palielina produktu uzglabāšanas laiku. Īpaši svarīgi tas ir ātri bojājošos produktu (gaļas izstrādājumi, augļi, ogas, dārzeņi) drošai un ilgstošai kvalitātes saglabāšanai. Mikrobiālās izcelsmes polimēri ir potenciāli nozīmīgi šādu materiālu izveidei. BC kompozītu raksturlielumi atbilst vispārējām prasībām, kas izvirzāmas iepakošanas materiāliem, lai pārtikas produktu uzglabāšanas laikā nodrošinātu to īpašību stabilitāti, tātad arī nepieciešamo kvalitāti un drošību. Šādas prasības un nosacījumi atbilst inovatīvai *aktīvā iepakojuma* koncepcijai, kas paredz plašāku *aktīvo materiālu un izstrādājumu* izmantošanu, lai paildzināt iepakotu pārtikas produktu uzglabāšanas laiku, saglabājot to sākotnējo kvalitāti. Šeit īpaši nozīmīgas ir ne tikai izmantojamo materiālu mehāniskās (stiepes izturība, plastiskums u.c.), bet arī specifiskās īpašības, kas nodrošina to barjerfunkciju (produktu/ārvides gāzu un ūdens tvaiku apmaiņa, noturība pret mitrumu, mikrobioloģisko piesārņojumu utt.). Šādos pārklājumos un bioplēvēs ir vairākas sastāvdaļas ar atšķirīgām taču savstarpēji komplementārām īpašībām. Tādējādi tiek panākta atsevišķo sastāvdaļu īpašību sinerģiska mijiedarbība, un veidojas kompozītmateriāli. Aktīvo iepakojumu veidojošā kompozītmateriāla vēlamo īpašību iegūšanai var izmantot dažādus aktīvos aģentus (citus polimērus,

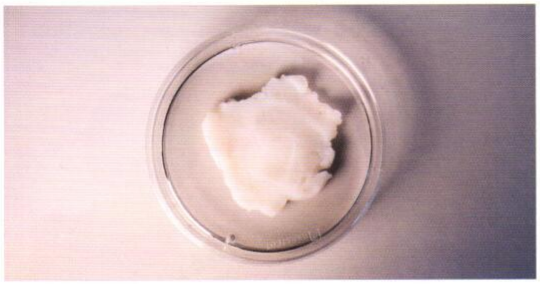


3A attēls. BC bioplēves ultrastruktūra skenējošā elektronu mikroskopā (SEM mikrogrāfija).



3B attēls. Fermentācijas gaitā iegūta BC bioplēves loksne.

Turpinājums 112. lpp.



3D attēls. Attīrītas un homogenizētas BC mikroškiedru frakcija biokompozītu iegūšanai.

3E attēls BC ieguve statiskās fermentācijas gaitā optimizētajos sūkalu barotnes virsmas/tilpuma apstākļos.

baktericīdos un fungicīdos savienojumus, antioksidantus, brīvo radikāļu savācējus, dabiskās krāsvielas, minerālvielas utt.).

Bioloģiskās celulozes rūpnieciska ražošana

Mikroorganismu spēja sintezēt BC rūpnieciski perspektīvā daudzumā ir samērā maz izplatīta. Nozīmīgākās un rūpnieciski izmantojamās BC ražojošās kultūras pieder pie *Komagataeibacter* etiķskābes baktēriju ģints, kuras atsevišķi celmi spēj izmantot plašu oglekļa avotu klāstu, tostarp sūkalas, ar katram baktēriju celmam specifisku aktivitāti. Šādus BC ražotājus pētījumu gaitā ir izdevies izolēt un patentēt arī LU Bioloģijas institūta mikrobiologiem (3C. attēls)

Ražojošo kultūru statisko audzēšanu (3E. attēls) platēs ar pietiekamu gaisa/šķidruma saskares laukumu var izmantot augstas pievienotās vērtības BC produktu ieguvei (iepakošanas materiāli, biomedicīna, kosmētika, elektronika), īpaši tad, ja tiem nepieciešama noteikta struktūra un īpašības (polimerizācijas pakāpe, kristāliskums, elastība). Tomēr, lai gan vienkārši pielietojama, šī metode ir salīdzinoši darbietilpīga un laikietilpīga, kas ierobežo polimēra ieguves apjomu, tātad arī BC plašāku rūpniecisko/komerciālo pielietojumu.

Alternatīva un jau aprobēta metode ir producentu audzēšana dažādu konstrukciju bioreaktoros, nodrošinot fermentācijas vides gaisa un masas apmaiņu, kas palielina BC ražību, taču līdztekus var mainīt arī tās struktūru un īpašības, tā sašaurinot tālāko pielietojumu iespējas. Tomēr ir pamats uzskatīt, ka bioreaktoru turpmākie konstruktīvie uzlabojumi, barotņu sastāva un aerobās kultivācijas režīmu optimizācija u.c. efektivitātes uzlabojumi spēs nodrošināt ekonomiski rentablas tehnoloģijas augstvērtīgas BC iegūšanai rūpnieciskā mērogā.

Jāuzsver, ka neatkarīgi no tā, vai konkrētās producentu kultūras spēj izmantot sūkalas tieši vai arī ir nepieciešama to hidrolītiska priekšapstrāde, tālākajos vielmaiņas procesos, tostarp BC sintēzē, etiķskābes baktērijas izmanto vienīgi glikozi un galaktozi, līdz ar to sūkalu lielākā daļa saglabājas kultivācijas vidē. Šāds pārpalikums ir nevēlams, jo joprojām spēj veidot bioloģiski noturīgu notekūdeņu piesārņojumu. Tas ir novēršams, ja BC tehnoloģiskajam ciklam piesaista mikrobioloģiskos procesus, kuros galaktoze tiek izmantota kā oglekļa avots. Atšķirībā no baktērijām eikariotisko vienšūnas organismu (raugi un mikroskopiskās aļģes) vielmaiņas tīklos ir pārstāvētas reakcijas galaktozes enzimātiskai transformācijai glikozē, kas ir viegli izmantojams substrāts dažādu produktu tālākai mikrobioloģiskajai sintēzei. Daži mikroorganismi, tostarp raugu un cianobaktēriju celmi, spēj šādā veidā efektīvi izmantot gan laktozi, gan galaktozi, sintezējot un uzkrājot šūnās visai lielus (40–80 % no sausnas) olbaltumvielu daudzumus un citus vērtīgus produktus – kad atūdeņotas biomasas veidā izmantojami kā pārtikas un/vai lopbarības piedevas ar augstu uzturvērtību.

Tādējādi jāsecina, ka atbilstoši aprites ekonomikas pamatprincipiem vienšūnu proteīnu, kā arī citu vērtīgu metabolītu mikrobioloģiskā sintēze, izmantojot sūkalas un BC ieguves blakusproduktus, ļautu sasniegt ekonomiski efektīvus, videi draudzīgus un bezatlikumu ražošanas ciklam maksimāli tuvus risinājumus.

Publikācija sagatavota projekta *Bionoārdāmo polimēru iegūšana no atjaunojamiem resursiem augļu aizsargplēvju un iepakojuma materiālu izstrādei* (LAD projekta Nr.19-00-A01612-000004) ietvaros, kas, sadarbojoties zinātniekiem, lauksaimniekiem un ražošanas uzņēmumiem, paredz biopolimēru pārklājumu un iepakošanas materiālu iegūšanu, izmantojot lauksaimnieciskās un pārtikas pārstrādes ražošanas blakusproduktus, optimizējot kultivācijas vides sastāvu un tehnoloģiskos režīmus.

Literatūras saraksts

- Circular economy: definition, importance and benefits. Pieejams tīmekļvietnē: https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/economy/20151201STO05603/circular-economy-definition-importance-and-benefits
- Chanfrau J.M.P., Pérez J.N., Fiallos M.V.L., Rivera L, Abril V.H., et al. (2017) Milk Whey - From a Problematic Byproduct to a Source of Valuable Products for Health and Industry: An Overview from Biotechnology. Prensa Med Argent 103:4. doi: 10.4172/lpma.1000254
- Kaur, R., Panwar D., Panesar P.S. (2020). Biotechnological approach for valorization of whey for value-added products.In: Kosseva M.R., Webb C. (Eds) Food Industry Wastes. Academic Press pp. 275–302. doi:10.1016/B978-0-12-817121-9.00013-9
- Kolesovs S., Semjonovs P. (2020). Production of bacterial cellulose from whey-current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol. 104: 7723-7730. doi: 10.1007/s00253-020-10803-9
- Zhong C. (2020). Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. Front Bioeng Biotechnol, 8 doi:10.3389/fbioe.2020.605374
- Zikmanis P., Kolesovs S., Semjonovs P. (2020). Production of biodegradable microbial polymers from whey. Bioresour Bioprocess, 7: 36. doi:10.1186/s40643-020-00326-6
- Zikmanis P., Brants K., Kolesovs S. Semjonovs P. (2020) Extracellular polysaccharides produced by bacteria of the Leuconostoc genus. World J Microbiol Biotechnol 36: 161 doi:10.1007/s11274-020-02937-9

2. P. Semjonovs, P. Zikmanis, S. Kolesovs (2021) Sūkalu pārstrāde augstas pievienotās vērtības produktos: problēmas un biotehnoloģiskie risinājumi. Saimnieks LV Portals, https://saimnieks.lv/raksts/sukalu-parstrade-augstas-pievienotas-vertibas-produktos-problemas-un-biotehnologiskie-risinajumi# 8/

Ceturtdiena, 10. jūnijs 23.4°C Rīga Vārda dienu svin: Malva, Anatols, Anatolijs

Saimnieks LV PORTĀLS

Abonēt Žurnālu

Lauksaimniecība

Sūkalu pārstrāde augstas pievienotās vērtības produktos: problēmas un biotehnoloģiskie risinājumi

Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta Rūpnieciskās mikrobioloģijas un pārtikas biotehnoloģijas laboratorija , 07-06-2021

SAGATAVOJA: Pāvels SEMJONOVS, Pēteris ZIKMANIS, Sergejs KOĻESOVS
FOTO: Kristaps Neibergs

Saskaņā ar ES nostādnēm pētījumi rūpnieciskās biotehnoloģijas jomā arvien vairāk tiek pievērsti aprites ekonomikai, kas paredz, ka viena noteikta bioprocesa blakusprodukti vai atkritumvielas var tikt izmantotas kā izejvielas citu produktu iegūšanai, līdz minimumam samazinot atkritumvielu daudzumu.

Tas ir īpaši svarīgi gadījumos, kad tehnoloģiskajos procesos veidojas ievērojams daudzums blakusproduktu un/vai atkritumvielu. Piena rūpniecībā nozīmīgs blakusprodukts ir sūkalas, kas veido 80–90 % no izmantotās izejvielas apjoma un joprojām satur aptuveni 55 % piena uzturvielu. Izšķir divu veidu sūkalas (1. tabula): saldpiena un skābpiena. Saldpiena sūkalas ar pH 5,6–6,3 rodas siera ražošanas procesā, ja tiek izmantoti piena recināšanas fermenti (himozīns, pepsīns), savukārt skābpiena sūkalas ar pH 4,4–4,6 atdalās skābpiena sieru un biezpiena ražošanā, ja pienu sarecina ar pienskābi, kas veidojas, pienskābes baktērijām pārraudzējot piena cukuru (laktozi). Recināšana panākama, arī pievienojot pienam citas, pārsvarā organiskās skābes (piemēram, citronskābi). Tādējādi līdztekus katram saražotā siera vai biezpiena kilogramam veidojas aptuveni 9 L sūkalu.

1.tabula. Sūkalu sastāvs *, g/L

Komponentes	Saldpiena sūkalas	Skābpiena sūkalas
Kopējā sausna	63–70	63–70
Laktoze	46–52	44–46
Proteīni	6–10	6–8
Laktāti	2	6.4
Kalcijs	0,4–0,6	1,2–1,6
Fosfāti	1–3	2–4.5
Hlorīdi	1,1	1,1
pH	6–7	< 5

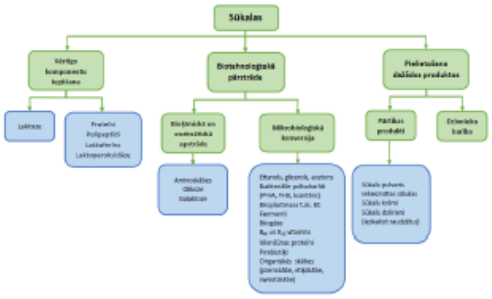
[a] Izmantoti *Kaur et al.*, 2020 dati.

Skābpiena sūkalām salīdzinājumā ar saldpiena sūkalām ir zemāks olbaltumvielu, augstāks sāļu saturs un nedaudz mazāk laktozes. Augstāka sāļu satura dēļ augstākas ir arī to utilizācijas izmaksas.

Augot piena rūpniecības apjomiem, ievērojami palielinās pasaulē saražoto sūkalu apjoms, t.i., sasniedzot vismaz 180–200 milj. t gadā. Šo blakusproduktu raksturo ļoti liels bioķīmiskā skābekļa patēriņš (BSP) un ķīmiskā skābekļa patēriņš (KSP) – attiecīgi 27–60 kg/m^3 un 50–102 kg/m^3. Tas liecina par sūkalu visai augstu noturību pret oksidēšanos jeb noārdīšanos bioloģisko vai ķīmisko oksidējošo aģentu (O_2 – ekvivalenti) iedarbībā. To nosaka lielā organisko vielu, īpaši laktozes (39–60 kg/m^3) koncentrācija, kuru noārdīšanās ir sarežģīta, tādējādi radot nopietnas problēmas gan piena rūpniecībai, gan ārējai videi. Tādēļ nav pieļaujama sūkalu tieša un nekontrolēta ievadīšana augsnē un/vai ūdenstilpnēs, kas radītu nopietnu kaitējumu šo ekosistēmu noturībai, dzīvotspējai un līdz ar to videi kopumā.

Kā tiek izmantotas sūkalas?

Lietderīgai sūkalu izmantošanai ir izstrādātas un piemērotas dažādas tehnoloģijas (1. attēls). Šim nolūkam izmanto divas atšķirīgas pieejas. Pirmā pieeja – sūkalas sadalīt, izmantojot dažādus tehnoloģiskos paņēmienus un iegūstot komerciāli nozīmīgus produktus, piemēram, individuālus proteīnus vai to koncentrātus, deproteinizētas sūkalas (t.s. sūkalu permeātu), laktozi, glikozes-galaktozes sīrupu u.c. (1. attēls). Otrā pieeja – sūkalu biokonversija mikrobiālās fermentācijas procesos, izmantojot laktozi kā oglekļa avotu daudzveidīgu augstas pievienotās vērtības produktu ieguvei. To vidū minami spirti (etanols, butanols), organiskās skābes (pienskābe, dzintarskābe, propionskābe), bakteriocīni, biopolimēri (fermenti, dekstrāns, ksantāns u.c.), mikroorganismu proteīni un ellas



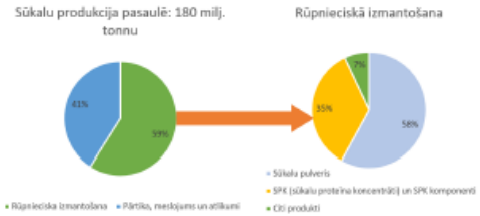
1. attēls. Sūkalu pārstrādes iespējas augstas pievienotās vērtības produktu ieguvei.

Lai gan sūkalas ir piemērota izejviela mikrobiālās fermentācijas nodrošināšanai, daudzas rūpnieciski nozīmīgas mikroorganismu kultūras, izņemot pienskābes baktērijas, nespēj izmantot laktozi kā vienīgo ogleķļa avotu. Neapstrādātām sūkalām ir arī salīdzinoši zema ogleķļa un slāpekļa (C/N) attiecība, kas negatīvi ietekmē vairāku produktu, tostarp biopolimēru, sintēzi.

Lai sūkalas efektīvāk izmantotu rūpnieciskajā fermentācijā, parasti ir nepieciešams veikt to priekšapstrādi un/vai izmantot sūkalu atvasinājumus, piemēram sūkalu pulveri, šādi fermentācijas vidē nodrošinot noteiktu laktozes koncentrāciju, izvairoties no sūkalu sastāva sezonālām svārstībām un pagarinot to uzglabāšanas laiku.

Tomēr jāatzīst, ka sūkalu komerciālais pielietojums pa nozarēm (2. attēls) joprojām ir nevienmērīgs, daudzējādā ziņā ierobežots un nepietiekams, īpaši attiecībā uz to produktiem ar augstu pievienoto vērtību (1. attēls). To vidū īpaši atzīmējami mikroorganismu sintezētie biopolimēri. , kuru ieguvei tiek pievērsta arvien lielāka uzmanība, arī LU Bioloģijas institūta Rūpnieciskās mikrobioloģijas un pārtikas biotehnoloģijas laboratorijā.

Ļoti daudz no fosilām izejvielām iegūtās plastmasas atkritumu (vienreizlietojamie trauki, iepakojumi u.tml.) nonāk vidē no dažādiem avotiem gan uz sauszemes, gan jūrā, radot būtisku kaitējumu ekonomikai un videi. Bioloģiski nesadalāmu materiālu, arī tradicionālo polimēru (plastmasu) plašā un pat pieaugošā izmantošana rada bažas par vides piesārņojumu un motivē meklēt videi draudzīgākus risinājumus.



2. attēls. Sūkalu produkcijas apjoms un to patēriņa sadalījums dažādās nozarēs.

No sūkalām līdz bioplastmasai

Bioplastmasa ir bioloģiskas izcelsmes vai/un bioloģiski noārdāms polimēra materiāls. Termins bioloģiskas izcelsmes nozīmē, ka materiāls vai produkts ir iegūts no atjaunojamiem resursiem. Šiem nosacījumiem pilnībā atbilst mikrobiālās izcelsmes polimēri, kuru biosintēzei tiek izmantotas sūkalas un/vai to atvasinājumi, jo tas veicina videi draudzīgāku un ekonomiski efektīvāku tehnoloģiju attīstību, tātad arī bioloģiski noārdāmu un ilgtspējīgu materiālu plašāku izmantošanu. Turklāt mikrobiālās izcelsmes polimēri pēc savām īpašībām ne tikai neatpaliek no fosilās izcelsmes polimēriem, bet daudzējādā ziņā pat pārspēj tos, īpaši tad, ja tiek izmantoti funkcionāli daudzveidīgu kompozītu veidā. Bioplastmasai ir ievērojams komerciālais potenciāls un daudzsološas pielietojuma iespējas pārtikas rūpniecībā, biomedicīnā, elektronikā u.c. jomās, kur tiek izmantotas fosilās izcelsmes plastmasas.

Šajā ziņā īpaša uzmanība jāpievērš bakteriālās celulozes (BC) ieguvei, kā izejvielu izmantojot sūkalas, un šī polimēra tehnoloģiskajām iespējām. BC ir D-glikozes polimērs, kas veido nanošķiedras ar unikālu 3D – tīklveida struktūru (3A. attēls). BC raksturo unikālu īpašību kombinācija, piemēram, augsts kristāliskums un polimerizācijas pakāpe, liels virsmas laukums, augsta elastība, stiepes izturība un ūdens noturēšanas spēja. Tā nesatur lignīnu un hemicelulozi, tādēļ ir tehnoloģiski augstvērtīgs un videi draudzīgs, bioloģiski saderīgs materiāls. Tas ir īpaši svarīgi BC biomedicīniskajiem pielietojumiem, izstrādājumos ar augstu pievienoto vērtību (augstas stiprības biopolimēri, iepakošanas materiāli, brūču pārsēji, audus aizvietojošie materiāli, farmaceitisko preparātu nesējvielas, biosensoru elementi u.c.). Kā viena no unikālām BC īpašībām ir jāizceļ tās mehāniskā izturība, kas vismaz divas reizes pārsniedz augu (koksnes) izcelsmes celulozes rādītājus. Pateicoties savām unikālajām struktūras un mehāniskajām īpašībām salīdzinājumā ar augu izcelsmes celulozi, BC varētu kļūt par plašāk pieejamu un industriāli daudzpusīgi izmantojamu izejmateriālu.

Aktīvais iepakojums pārtikai

Pārtikas biotehnoloģiju nozarē aktuāla ir tādu nekaitīgu un bioloģiski noārdāmu pārklājumu un iepakojuma materiālu izveide, kas būtiski palielina produktu uzglabāšanas laiku. Īpaši svarīgi tas ir ātri bojājošos produktu (gaļas izstrādājumi, augļi, ogas, dārzeņi) drošai un ilgstošai kvalitātes saglabāšanai. Mikrobiālās izcelsmes polimēri ir potenciāli nozīmīgi šādu materiālu izveidei. BC kompozītu raksturlielumi atbilst vispārējām prasībām, kas izvirzāmas iepakošanas materiāliem, lai pārtikas produktu uzglabāšanas laikā nodrošinātu to īpašību stabilitāti, tātad arī nepieciešamo kvalitāti un drošību. Šādas prasības un nosacījumi atbilst inovatīvai aktīvā iepakojuma koncepcijai, kas paredz plašāku aktīvo materiālu un izstrādājumu izmantošanu, lai paildzinātu pārtikas produktu uzglabāšanas laiku, saglabājot to sākotnējo kvalitāti. Šeit īpaši nozīmīgas ir ne tikai izmantojamo materiālu mehāniskās (stiepes izturība, plastiskums u.c.), bet arī specifiskās īpašības, kas nodrošina to barjerfunkciju (produktu/šķīvides gāzu un ūdens tvaiku apmaiņa, noturība pret mitrumu, mikrobioloģisko piesārņojumu utt.). Šādos pārklājumos un bioplēvēs ir vairākas sastāvdaļas ar atšķirīgām taču savstarpēji komplementārām īpašībām. Tādējādi tiek panākta atsevišķo sastāvdaļu īpašību sinerģiska mijiedarbība, un veidojas kompozītmateriāli. Aktīvo iepakojumu veidojošā kompozītmateriāla vēlamo īpašību iegūšanai var izmantot dažādus aktīvas vielas (citus polimērus, baktericīdos un fungicīdos savienojumus, antioksidantus, brīvo radikāļu neitralizētājus , dabiskās krāsvielas, minerālvielas utt.).

Bioloģiskās celulozes rūpnieciska ražošana

Mikroorganismu spēja sintezēt BC rūpnieciski perspektīvā daudzumā ir samērā maz izpētīta. Nozīmīgākās un rūpnieciski izmantojamās BC ražojošās kultūras pieder pie Komagataeibacter etiķskābes baktēriju ģints, kuras atsevišķi celmi spēj izmantot plašu oglekļa avotu klāstu, tostarp sūkalas, ar katram baktēriju celmam specifisku aktivitāti. Šādus BC ražotājus pētījumu gaitā ir izdevies izolēt un patentēt arī LU Bioloģijas institūta mikrobiologiem (3C. attēls).

Ražojošo kultūru statisko audzēšanu (3E. attēls) platēs ar pietiekamu gaisa/šķidruma saskares laukumu var izmantot augstas pievienotās vērtības BC produktu ieguvei (iepakošanas materiāli, biomedicīna, kosmētika, elektronika), īpaši tad, ja tiem nepieciešama noteikta struktūra un īpašības (polimerizācijas pakāpe, kristāliskums, elastība). Tomēr, lai gan vienkāršāk pielietojama, šī metode ir salīdzinoši darbietilpīga un laikietilpīga, kas ierobežo polimēra ieguves apjomu, tātad arī BC plašāku rūpniecisko/komerciālo pielietojumu.

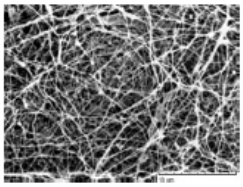
Alternatīva un jau aprobēta metode ir producentu audzēšana dažādu konstrukciju bioreaktoros, nodrošinot fermentācijas vides gaisa un masas apmaiņu, kas palielina BC ražību, taču līdztekus var mainīt arī tās struktūru un īpašības, tā sašaurinot tālāko pielietojumu iespējas. Tomēr ir pamats uzskatīt, ka bioreaktoru turpmākie konstruktīvie uzlabojumi, barotņu sastāva un aerobās kultivācijas režīmu optimizācija spēs nodrošināt ekonomiski rentablas tehnoloģijas augstvērtīgas BC iegūšanai rūpnieciskā mērogā.

Jāuzsver, ka neatkarīgi no tā, vai konkrētās producentu kultūras spēj izmantot sūkalas tieši vai arī ir nepieciešama priekšapstrāde, tālākajos vielmaiņas procesos, tostarp BC sintēzē, etiķskābes baktērijas izmanto galvenokārt glikozi un galaktozi, līdz ar to laktozes ievērojama daļa saglabājas kultivācijas vidē. Šāds pārpalikums ir izaicinājums, jo joprojām spēj veidot bioloģiski noturīgu notekūdeņu piesārņojumu. Tas ir novēršams, ja BC tehnoloģiskajam ciklam piesaista mikrobioloģiskos procesus, kuros tiek patērēti pāri palikušie ogleķa avoti. Atšķirībā no daudzām baktērijām eikariotisko mikroorganismu (raugi un mikroskopiskās sēnes) vielmaiņas procesi nodrošina galaktozes enzimātisku transformāciju glikozē, kas ir viegli izmantojama dažādu produktu tālākai mikrobioloģiskajai sintēzei. Dažu raugu un cianobaktēriju celmi, spēj šādā veidā efektīvi izmantot gan laktozi, gan galaktozi, sintezējot un uzkrājot šūnās visai lielus (40–80 % no sausnas) olbaltumvielu daudzumus un citus vērtīgus produktus – kuri atūdeņotās biomasas veidā izmantojami kā pārtikas un/vai lopbarības piedevas ar augstu uzturvērtību.

Tādējādi jāsecina, ka, atbilstoši aprites ekonomikas pamatprincipiem, industriāli vērtīgu produktu mikrobioloģiskā sintēze, izmantojot sūkalas un BC ieguves blakusproduktus, ļautu sasniegt ekonomiski efektīvus, videi draudzīgus un bezatlikumu ražošanas ciklam maksimāli tuvus risinājumus.

3. attēls. Bakteriālās celulozes (BC) iegūšana:

3A attēls. BC bioplēves ultrastruktūra skenējošā elektronu mikroskopā (SEM mikrogrāfija).



3B un 3C attēls. Fermentācijas gaitā iegūta BC bioplēves lokšņe.

3D attēls. Attīrītas un homogenizētas BC mikrošķiedras biokompozītu iegūšanai.

3E attēls. BC ieguve statiskās fermentācijas gaitā optimizētajos sūkalu barotnes virsmas/tilpuma apstākļos.

Publikācija sagatavota projekta *Bionoārdāmo polimēru iegūšana no atjaunojamiem resursiem augju aizsargplēvju un iepakojuma materiālu izstrādei* (projekta Nr.19-00-A01612-000004) ietvaros, kas, sadarbojoties zinātniekiem, lauksaimniekiem un ražošanas uzņēmumiem, paredz biopolimēru pārklājumu un iepakošanas materiālu iegūšanu, izmantojot lauksaimnieciskās un pārtikas pārstrādes ražošanas blakusproduktus, optimizējot kultivācijas vides sastāvu un tehnoloģiskos režīmus.

Projekts tiek īstenots Latvijas Lauku attīstības programmas 2014.-2020. gadam atbalsta pasākuma Nr. 16 *Sadarbība* 16.1 apakšpasākuma *Atbalsts Eiropas Inovāciju partnerības lauksaimniecības ražīgumam un ilgtspējai lauksaimniecības ražīguma un ilgtspējas darba grupu projektu īstenošanai* ietvaros.

Literatūras saraksts

Circular economy: definition, importance and benefits. Pieejams tīmekļvietnē: https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/economy/20151201STO05603/circular-economy-definition-importance-and-benefits

Chanfrau J.M.F., Pérez J.N., Flallos M.V.L., Rivera I., Abril V.H., et al. (2017) Milk Whey - From a Problematic Byproduct to a Source of Valuable Products for Health and Industry: An Overview from Biotechnology. Prensa Med Argent 103:4. doi: 10.4172/pma.1000254

Kaur, R., Panwar D., Panwar P.S. (2020). Biotechnological approach for valorization of whey for value-added products.In: Kosseva M.R., Webb C. (Eds) Food Industry Wastes. Academic Press pp. 275–302. doi:10.1016/B978-0-12-817121-9.00013-9

Kolesova S., Semjonova P. (2020). Production of bacterial cellulose from whey-current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol. 104: 7723-7730. doi: 10.1007/s00253-020-10803-9

Zhong C. (2020). Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. Front Bioeng Biotechnol, 8 doi:10.3389/fbioe.2020.605374

Zikmanis P., Kolesova S., Semjonova P. (2020). Production of biodegradable microbial polymers from whey. Bioresour Bioprocess, 7: 36. doi:10.1186/s40643-020-00326-6

Zikmanis P., Brants K., Kolesova S. Semjonova P. (2020) Extracellular polysaccharides produced by bacteria of the Leuconostoc genus. World J Microbiol Biotechnol 36: 161 doi:10.1007/s11274-020-02937-9

AgroCredit Finansējums lauksaimniekiem

Komentāri

Jūsu komentārs

Vārds*

Komentārs...

Pievienot

Iesakām izlasīt Skatīt vairāk

Lauksaimniecība

Latvijā ir sākta kūdraugsnes izplatības precizēšana lauka apstākļos

Šogad Mārupes, Olaines, Ķekavas, Ropažu, Ādažu, Ogres, Siguldas, Limbažu, V...

Lauksaimniecība

Atvieglojot prasības, turpmāk vaisliniekus un to materiālu vaislai sertificēs tikai pēc audzēšanas programmā noteiktajiem kritērijiem

Valdība otrdien, 1. jūnijā, apstiprinājusi Zemkopības ministrijas sagatavot...

Lauksaimniecība

Pārliekais mitrums ietekmēs vasarājus, ziemājiem prognozes cerīgas

Ziemāju stāvoklis Latvijā kopumā vērtējams kā labs. Savukārt vasarāji rada ...

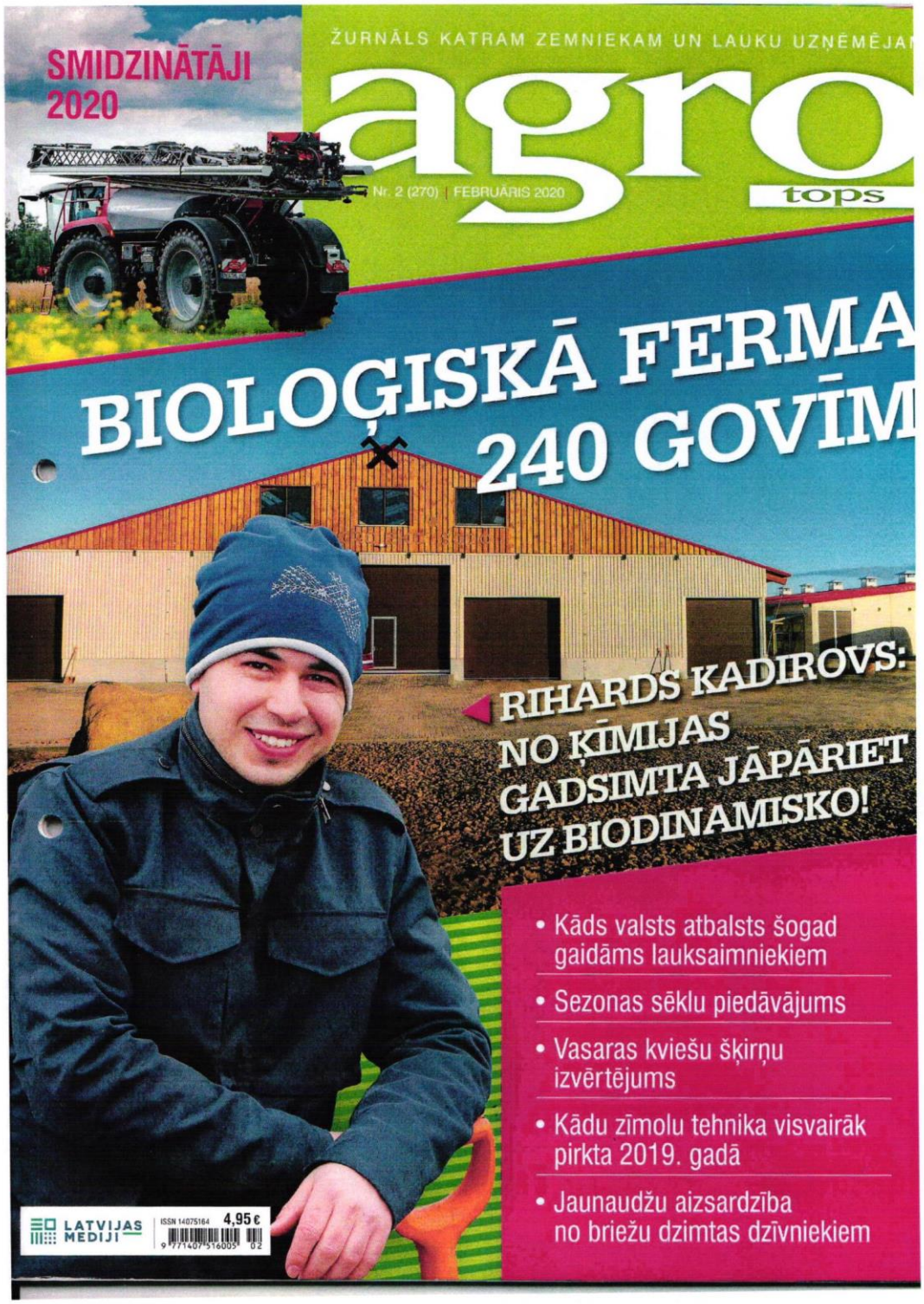
Lauksaimniecība

Sezonas laukstrādnieku nodokļu likme

Lauksaimniekiem no 1. aprīļa līdz 30. novembrim atkal ir iespējams sezonas ...

Izdevniecība Žurnāli

3. Karina Juhņeviča-Radenkova, Inese Drudze, Pāvels Semjonovs, Ēdamie pārklājumi ogām – perspektīvs un videi draudzīgs uzglabāšanas risinājums, Agro Tops, 2020. gada marts.



KAS IR JAUKTIE STĀDĪJUMI?

Nu jau vairākus gadus, runājot par audzēšanas tehnoloģijām, dzirdams termins – jauktie stādījumi, sējumi. Šāda audzēšanas tehnoloģija ir zināma jau sen. Kā jau pats vārdu salikums liecina, jauktie stādījumi ir audzēšanas metode, kur augi tiek jaukti. Mums populārākais un pazīstamākais veids ir graudaugu mistri.

SANDRA DANE,
Dārzkopības institūts

Laukkopībā jauktie sējumi ir sastopami krietni biežāk. Šajā kategorijā ietilpst jebkādu augu kombinācijas, kur katrs augs pilda kādu noteiktu funkciju. Tie ir gan graudi ar pasēju, gan zaļmēslojuma augi augļu dārzu rindstarpās, gan ķiploki, kas sastādīti pa vidu dārza zemenēm. Augu kombināciju variantu ir bezgala daudz, tomēr ir pietiekami daudz ierobežojošo faktoru. Augi var savstarpēji nomākt cits citu gan saules gaismas daudzuma ziņā, gan barības vielu un ūdens nodrošinājuma ziņā. Šāda audzēšanas tehnoloģija var sarežģīt stādījumu ierīkošanu un kopšanu, kā arī pašu ražas vākšanu. Tādēļ ir rūpīgi jāpārdomā, kādu augu kombinācijas būs iespējams kopt saimniecībā un kāds ir šo kombināciju mērķis. Piemēram, ražas bagātināšana ar proteīniem (graudaugu un tauriņziežu mistri), pamatkultūras pilnīga vai daļēja nodrošināšana ar slāpekli (pamatkultūra kopā ar tauriņziedi), divu dažādu ražu ieguve no vienas lauka vienības vienā veģetācijas sezonā (redīsi un salāti, zemenes un pupas, kāposti un pupas), augsnes nosegšana ar augu masu dikstāves laikā (ziemāji–lopbarības redīss–auzas).

Tā kā starptautiskā lauksaimniecības politika ir vērsta uz videi draudzīgāku saimniekošanu, optimizējot minerālmēslu lietošanu, optimālu augsnes un ūdens resursu izmantošanu, saglabājot ražu un tās kvalitāti, tika iesniegts un izstrādāts FP7 ietvara projekts *Ilgtspējīgu tehnoloģiju izstrāde pākšaugu audzēšanai un to izmantošanas veicināšana proteīna nodrošināšanai Eiropā pārtikas un lopbarības ražošanai* (*Enhancing of legumes growing in Europe through sustainable cropping for protein supply for food and feed – EUROLEGUME*).

Ekstra šķiras ogas, šķirne 'Polka'.

Izmēģinājuma lauks, 2. veģetācijas gads.

Cūku pupas + zemenes.

Zemenes un tauriņzieži

Kā viens no veiktajiem pētījumiem bija zemeņu audzēšana jauktajos stādījumos ar tauriņziežiem. Ir plaši zināma tauriņziežu spēja piesaistīt atmosfēras slāpekli ar gumiņbaktēriju palīdzību un pārveidot to augiem uzņemamā formā. Tādēļ kā viens no šā pētījuma mērķiem bija izpētīt, vai, audzējot zemenes kopā ar tauriņziežiem, tās tiek nodrošinātas ar nepieciešamo slāpekļa daudzumu optimālas un kvalitatīvas ražas iegūšanai. Audzējot zemenes atklātā laukā, salīdzinoši liela augsnes virskārta ir brīva no augiem un ir potenciāli liels avots CO_2 izdalei, tādēļ papildus slāpekļa nodrošinājumam ieguvām arī lielāku nosegtās augsnes daļu, kas palielina lauksaimniecības zemju produktivitāti.

Izmēģinājumā tika iekļauta zemeņu šķirne 'Polka', kombinējot ar vairākiem tauriņziežu variantiem – bastarda āboliņš, divas dažādas cūku pupas, zaļie zirņiši, cukurzirņi. Iegūtie dati salīdzināti ar standarta variantu, kur izmantots minerālais slāpekļa mēslojums, un variantu, kur nav lietots slāpekļa mēslojums. Ar šā pētījuma palīdzību gribējām noskaidrot, vai tiešām tauriņzieži spēj nodrošināt blakus augu ar nepieciešamo slāpekli, vai zemenes un tauriņzieži ir labi blakusaugi (vai nav nekādu antagonisku *jūtu*), vai ir iespējams iegūt divu dažādu augu kvalitatīvu un optimālu ražu.

Izmēģinājumā tika ierīkoti trīs lauki, katrs no tiem stādīts trīs secīgos gados: 2014., 2015. un 2016. gadā. Tie uzturēti trīs gadus. Pirmajā gadā zemenēm izkniebti ziedneši. Katrā otrajā rindstarpā sēti tauriņzieži. Sākoties ziedēšanai, ieklāta salmu mulča.

Galvenie pētījuma secinājumi

- Zemenes nav vēlams audzēt kopā ar āboliņu. Šī kombinācija veicina baltplankumainības attīstību zemenēm. Arī raža tika iegūta būtiski zemāka nekā kontroles variantā, izmantojot slāpekļa minerālmēslus.
- Zemenes labi aug kopā ar cūku pupām un zirņiem, ja tiek nodrošināti optimāli mitruma apstākļi.
- Tauriņzieži neveicināja pelēkās puves izplatību zemenēs.
- Nodrošinot optimālu mitrumu, zemeņu un tauriņziežu jauktajos stādījumos var iegūt līdzvērtīgu kvalitatīvu ogu ražu, kā lietojot slāpekļa minerālmēslus.
- Ievācot cūku pupas un zirņus piengatavības fāzē, tos ir iespējams tirgot svaigam patēriņam, kas dažādo tirgus piedāvājumu. Kā arī pirmajā stādījumu ierīkošanas gadā, ja zemenēm tiek izkniebti ziedneši, pākstu raža dod kaut arī nelielus, tomēr ieņēmumus, kas samazina ierīkošanas izmaksu radītos zaudējumus. a

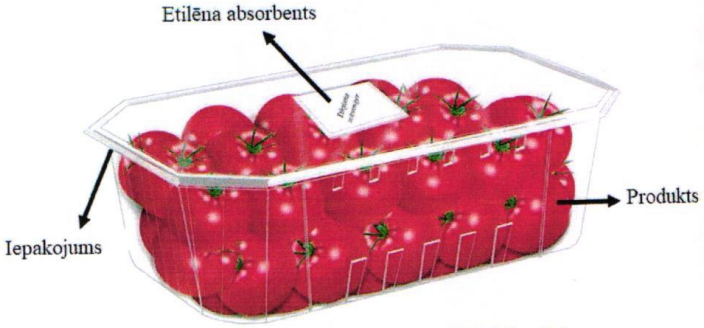
ĒDAMIE PĀRKLĀJUMI OGĀM – PERSPEKTĪVS UN VIDEI DRAUDZĪGS UZGLABĀŠANAS RISINĀJUMS

Pamatojoties uz Pārtikas un lauksaimniecības organizācijas *(Food and Agriculture Organisation/FAO)* statistikas datiem, pasaulē pēdējo piecdesmit gadu laikā ir novērota ogu ražošanas apjoma palielināšanās. Globālais zemeņu tirgus ir būtiski palielinājies no 754 517 tonnām 1961. gadā līdz 9,2 milj. tonnām 2017. gadā. Savukārt aveņēm pieaugums bija no 134 115 tonnām 1961. gadā līdz 812 735 tonnām 2017. gadā.

KARINA JUHŅEVIČA-RADENKOVA,
INESE DRUDZE,
Dārzkopības institūts
PĀVELS SEMJONOVS,
Latvijas Universitāte

Naudas izteiksmē pasaules zemeņu un aveņu tirgus vērtība 2016. gadā tika vērtēta attiecīgi 37 un 8,5 miljardi USD. Pamatojoties uz žurnālā *Agro Tops* (2018. gada jūlija numura) pieejamajiem datiem, tiek prognozēts, ka zemeņu patēriņš turpinās pieaugt un 2025. gadā to apjoms varētu sasniegt 11,5 miljonus tonnu. Līdzīga ražošanas apjoma palielināšanās tendence tiek prognozēta arī aveņēm.

Analizējot datus par ogu ražošanas apjomiem Latvijas tirgū, redzams, ka tas nav stabils. Aveņu kopapjoms 2000. gadā bija 83 tonnas, bet 2018. gadā – 219 tonnas. Tomēr jāatzīmē, ka zemeņu ražošanas apjoms laika posmā no 2000. līdz 2018. gadam ir samazinājies no 4566 tonnām līdz 1257 tonnām.



Aktīvais iepakojums.

Raža ir, bet kā to saglabāt?

Viens no faktoriem, kas ietekmē zemeņu ražošanas apjoma samazināšanos, ir saistīts ar salīdzinoši īsu ogu uzglabāšanas laiku un uzglabāšanas tehnoloģijas nepiemērotību.

Pēdējo desmit gadu laikā pasaulē iedzīvotāju skaits ir būtiski pieaudzis, tādēļ arvien aktuālāks kļūst jautājums par jaunu pārtikas produktu ražošanu un jau esošo kvalitātes uzlabošanu. Starp dzīves ilgumu un veselīgu pārtikas produktu patēriņu pastāv cieša sakarība. Šobrīd veselīgs dzīvesveids un sabalansēts uzturs ir moderna tendence, kam patērētāju pieprasījums stabili paaugstinās. Tādējādi pārtikas produktiem nu jau jāatbilst ne tikai tradicionālajiem kvalitātes (pārtikas nekaitīguma) standartiem, bet tiem būtu jābūt vēl kaut kam vairāk – dabiskiem, ar cilvēku veselībai pozitīvām (funkcionālajām) īpašībām. Augļi un ogas ir viena no vissvarīgākajām šāda veselīga uztura sastāvdaļām.

Zemenēm un aveņēm ir gan izcilas garšas īpašības, kas patīk patērētājiem, gan reizē arī augstvērtīgs uzturvielu sastāvs. Tās satur daudzas bioloģiski aktīvas vielas, piemēram, polifenolus, kas piedalās brīvo radikāļu neitralizēšanā. Klīniskie pētījumi norāda, ka augu polifenolu lietošana uzturā samazina saslimšanas risku ar sirds slimībām. Šie aspekti patērētājam ir būtiski, vietējām aveņēm un zemenēm tirgū ir pieprasījums, diemžēl šīs ogas svaigā veidā ilgi neglabājas.

Gan zemenes, gan arī avenes pie mums ir sezonāls produkts ar salīdzinoši īsu uzglabāšanas laiku (5–7 dienas), tāpēc svaigu ogu pieejamība tirgū ir īslaicīga. Ogu uzglabāšanas ilgums atkarīgs no uzglabāšanas temperatūras, gaisa relatīvā mitruma, elpošanas ātruma, epidermas slāņa biezuma un šķirņu izturības pret mikroorganismiem. Ogu vākšanas laikā tām var rasties mehāniskie bojājumi, kas izraisa fizioloģiskas reakcijas uz stresu. Ja ir stress, tad ogās norit procesi, kas būtiski ietekmē to kvalitāti, paātrinot to bojāšanos uzglabāšanas laikā.

Pēc FAO datiem, ES augļu/ogu un dārzeņu zudumu kopapjoms bojājumu dēļ to glabāšanas laikā sasniedz 45% no kopējās ražas.

4. Karina Juhņeviča-Radenkova, Inese Drudze, "Ēdamie augļu un ogu pārklājumi", Agro Tops" 2021. gada februāris.

Agni Hotra

Ne pārāk sen Vācijā parādījusies kāda pavisam ezoteriska un ļoti īpatnēja dārzkopības metode, kas pārņemta no Indijas senās vēdiskās gudrības. Daži mūsu dārzu mīļotāji ar to jau sāk iepazīties. Šī alternatīvā un ezoteriskā metode ar *Agni Hotras* pelniem it kā nav sarežģīta, bet pilnīgi atšķiras no citām augu kopšanas vai atveseļošanas metodēm. Pelnus iegūst īpašā rituālā, dziedot noteiktas mantras saullēktā un saulrietā un šajā laikā dedzinot gī sviestu kopā ar kaltētiem govs mēsliem, izmantojot šai procesā nelielu piramīdu. Metodes izmantotāji apgalvo, ka tādējādi attīroties atmosfēra ne tikai fiziskajā plānā, bet arī smalkajā, neredzamajā līmenī un svētītās uguns tuvumā iznīkstot liela daļa slimību izraisītāju. Ar nelielu daudzumu pelnu apstrādājot kultūraugus, palielinoties ne tikai to raža, bet arī kvalitāte, ko var izmērīt ar biofotonikas analīzi. Par šo metodi jau iznākušas vairākas grāmatas vācu valodā un arī internetā ir daudzpusīgi skaidrojumi un apraksti (meklējot *Agni Hotra* un *www.homa-hof-heiligenberg.de*).

Latvijā ir pietiekami daudz īpatņu, kuri aizrāvušies ar dažādām Austrumos radītām un, iespējams, tur sekmīgi izmantotām mācībām. Gribas gan teikt, ka Austrumu cilvēku mentalitāte un paradumi ir ļoti atšķirīgi no mūsu mentalitātes. Tāpēc mehāniski pārņemt un pašiem sevi pārliecināt, cik šīs metodes ir brīnišķīgas un dziednieciskas, protams, var, bet uz pozitīviem rezultātiem cerēt ir šaubīgi.

Īss secinājums

Latvijā vēl ilgi valdošā būs konvencionālā lauksaimniecība. Bioloģiskās lauksaimniecības organizācijas vadītājs ir izteicis prognozi, ka pēc 30 gadiem 30% lauksaimniecībā izmantojamās zemes tiks apsaimniekota ar bioloģiskām metodēm.

Latviešu zemnieciskais prāts daudz vairāk nosliecas uz zemes apdomīgu un saimniecisku kopšanu. Varbūt tomēr neesam aizmirsuši, ka zemnieki vismaz sēju aizvien uzskatīja par svētu darbību un arī ar lielu cieņu un bijību attiecās pret izaudzēto maizi un citiem Dieva, dabas un pašu darba dotajiem augļiem.

Katrs cilvēks ir brīvs savā izvēlē, ko un kā darīt. No mums pašiem neatkarīgi apstākļi to var tikai veicināt vai kavēt. Bet ļoti gribu, lai Latvija ar saviem darbīgajiem, radošajiem cilvēkiem, ar laukiem, dārziem, mežiem, upēm un ezeriem varētu kļūt par zemi, kur bioloģiskā lauksaimniecība un man tuvā bioloģiskā dārzkopība būtu vispār saprotama, atzīta un progresējoša. ■

ĒDAMIE AUGĻU UN OGU PĀRKLĀJUMI

Aptuveni trešdaļa ES dalībvalstīs ražotās pārtikas tiek izmesta atkritumos (88 miljoni tonnu 138 miljardu eiro vērtībā). Pasaulē aptuveni 42% pārtikas atkritumu rada mājsaimniecības. Pasaules Pārtikas un lauksaimniecības organizācija (FAO) vēsta, ka pasaulē ik gadu atkritumos izmet 1,3 miljardus tonnu pārtikas. Latvija gada laikā rada aptuveni 80 000 tonnu pārtikas atkritumu, viens cilvēks – vidēji 113 kg. ES valstīs vidējais rādītājs ir 173–180 kg uz cilvēku.

KARINA JUHŅĒVIČA-RADENKOVA,
INESE DRUDZE,
Dārzkopības institūts

Diemžēl joprojām ES valstīm nav izveidota vienota pārtikas atkritumu daudzuma samazināšanas politika. Viens no risinājumiem pārtikas produktu (svaigu un pārstrādātu augļu, ogu, dārzeņu) glabāšanas, lietošanas laika pagarināšanai un kvalitātes saglabāšanai ir apstrāde ar dažādiem bionoārdāmiem polimēru pārklājumiem.

Pētījumi ēdamā iepakojuma jomā ir jāpaplašina un jādažādo. Ēdamais iepakojums pilnībā atbilst mūsdienās populārajai *zaļajai* tendencei, tie ir produkti un tehnoloģijas, kas ir nekaitīgas cilvēkiem un videi. Pašlaik var droši apgalvot, ka ēdamo plēvju un pārklājumu ražošanas uzņēmumi palīdzēs samazināt atkritumu daudzumu un nodrošināt ilglaicīgu pārtikas produktu kvalitātes saglabāšanos, kā arī nodrošinās lielākas ērtības patērētājiem.

Apstrāde ar vasku

Ziemā veikalā nopērkami spīdīgie, labi glabājamie vaskotie importētie āboli un bumbieri. Tie visi gandrīz vienmēr ir apstrādāti ar **šellaka** tipa vaskiem, tāpēc tirdzniecības stendos nevīst, nepūst, ilgāk izskatās pievilcīgi, ilgāk paliek sulīgi, labāk saglabājas augļu stingrība un cietība. Arī šellaka sveķus, ko izdala kukaiņu kāpuri *(Laccifer lacca)*, plaši izmanto augļu pārklājumiem glabāšanas laika pagarināšanai. Bez šellaka (E 904) ir vēl arī citi tradicionāli lietoti vaski – karnaubvasks (E 903) un kandelila vasks (E 902).

Pašlaik pārtikas ražošanā augļu apstrādei arvien vairāk sāk izmantot arī medus bišu dziedzeru izdalīto vasku, ko izkausē no bišu šūnu kārēm pēc medus izsviešanas. Bet, tā kā tīra bišu vaska pārklājums 5% vai lielākā koncentrācijā pēc sacietēšanas nav pietiekami dzidrs un caurspīdīgs, tā izmantošana augļu virsmas apstrādei ir iespējama tikai dažādā kombinācijās ar citiem vaskiem (karnaubas, šellaka, kandelila) vai augu eļļu.

Ne vienmēr augļu vai ogu apstrāde ar vaskiem var dot pozitīvu rezultātu. Iznākums atkarīgs no vairākiem faktoriem: no pareizi izvēlēta vaska un tā koncentrācijas, arī no pašu apstrādājamo augļu un ogu kvalitātes, ķīmiskā sastāva, gatavības pakāpes apstrādes brīdī u. c.

Ir arī vēl citi iespējamie pārklājumu varianti, no kuriem daži ir pilnībā sagremojami un pat garšīgi. Īpaši tad, ja tie pagatavoti no pašu augļu un ogu masas. Arī cietes pārklājumi ar bioloģiski aktīvu vielu piedevām, līdzīgi kā augļu un ogu dabiskais vasks, novērš mitruma zudumus, kontrolē gāzu (skābeklis, oglekļa dioksīds) apmaiņu, nodrošina pārtikas produkta virsmas sterilitāti un arī gaistošo vielu saglabāšanos, kas saglabā pārtikai raksturīgo smaržu un aromātu. Šādas īpašības ir raksturīgas biopolimēriem.

Ar biopolimēru pārklājumu apstrādātas avenes.

Ar biopolimēru pārklājumu apstrādātas zemenes.

Biopolimēru pārklājumi

Šie pārklājumi pēc to ieguves iedalās trijos veidos: augu, dzīvnieku un mikrobioloģiskās izcelsmes. Mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimērus spēj sintezēt baktērijas un mikroskopiskās sēnes. Par dzīvnieku izcelsmes biopolimēru tiek uzskatīts hitozāns. To iegūst no jūras vēžveidīgo pārstrādes blakusproduktiem – čaulām. Bet, piemēram, levānu var iegūt gan no augu izcelsmes produktiem, gan arī mikrobioloģiski sintezēt. Mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimēriem ir izteiktākas polimēra īpašības – pārklājuma/plēvju veidošanas spējas, plēves izturība, elastība, spīdīgums, barjerīpašības u. c. Tādējādi paplašinās biopolimēru iespējamās izmantošanas jomas (piemēram, medicīnā). To ražošana neietek- (nepastiprina) vides piesārņojumu.

Diemžēl pašlaik biopolimēru ražošanas izmaksas vēl joprojām ir relatīvi pārāk augstas, tāpēc to izmantošana pārtikas rūpniecībā ir ierobežota.

Kā substrātu levāna biosintēzei Latvijā var izmantot blakusproduktu – sīrupu, kas veidojas krūmcidoniju sukāžu ražošanā. Pašlaik krūmcidoniju audzētājiem nav problēmu tā realizācijā, taču, ņemot vērā krūmcidoniju stādījumu platības pieaugumu, var paredzēt, ka problēma var rasties. Nerealizēto sīrupu varēs izmantot bioloģiski noārdāmo polimēru ražošanā.

Pašlaik pasaulē daudz pēta dabisku vai sintētisku pārtikas piedevu pievienošanas iespējas polisaharīdu vai olbaltumvielu plēvēs ar mērķi maksimāli samazināt mikroorganismu, piemēram, *Salmonella* sp., *E. coli* baktēriju, augšanu svaigos un pārstrādātos produktos, kas visbiežāk izraisa bīstamu saindēšanos. Pētījumos labi rezultāti tika konstatēti plēvēm no polisaharīda hitozāna. To šķīdumi dod viendabīgas, elastīgas plēves, kurām piemīt dabiskas antibakteriālas īpašības. Pārtikas produktos, kas bijuši pārklāti ar hitozāna plēvēm, mikroorganismi neaug.

Dārzkopības institūtā kopā ar citiem sadarbības partneriem – Latvijas Universitātes Bioloģijas institūtu un ogu audzētājiem – turpinās pētījums ***Bionoārdāmo polimēru iegūšana no atjaunojamiem resursiem augļu aizsargplēvju un iepakojuma materiālu izstrādei*** **(Nr. 19-00-A01612-000004).** Pirmā gada pētījumos iegūtie dati parādīja, ka ar biopolimēriem apstrādātām zemenēm un avenēm laba kvalitāte saglabājas ilgāk. Pētījumi ir jāturpina.

Nākamajā projekta posmā ir paredzēts ne tikai izveidot biopolimēra pārklājumu, ko var uzklāt uz pašām ogām, bet arī izveidot biopolimēra plēvi iepakojumam, kurā tiks glabātas šīs ogas. Pamata plēves tiks iegūtas no levāna un dekstrāna maisījuma. Viena veida ēdamās plēves būs gatavotas no augļu biezeņa – sākumā no āboliem. To pagatavošana ir diezgan viegla, jo pamatsastāvdaļa ir izžāvēts augļu biezenis ar pievienotu plastifikatoru. Šāda veida iepakojumi ir ne tikai veselīgi, bet arī garšīgi. Pētījuma laikā tiks pārbaudīta ne tikai ogu kvalitāte aizsargplēvē, bet arī izveidotās plēves īpašības.

Pirmajā gadā veikto pētījumu rezultāti

Pētījumā tika izmantots 1% levāna šķīdums+1% dekstrāna šķīdums, kā arī 3% levāna šķīdums+2% glicerīna šķīdums. Ar izvēlētajām šķīduma koncentrācijām apstrādātas zemeņu šķirnes *'Malvina'* ogas, kā arī aveņu šķirņu *'Imara'*, *'Polka'*, *'Enrosadira'* ogas.

Katru zemeņu/aveņu apstrādes variantu gatavoja trijos atkārtojumos.

Ogu glabāšanas režīmi **zemenēm:** telpā – 20 ±1 °C temperatūrā 24 stundas; dzesētavā – 4 ±1 °C temperatūrā 72 stundas.

Ogu glabāšanas apstākļi **avenēm:** dzesētavā – 4 ±1 °C temperatūrā 72 stundas.

Ogām tika testēti kvalitātes parametri (fizikāli ķīmiskie rādītāji, mikrobioloģiskie parametri, sensorās īpašības).

Izvērtējot **zemeņu** mikrobioloģisko rādītāju izmaiņas, pārliecinošu secinājumu vēl nebija. Rezultāti ir pretrunīgi un nestabili. Zemeņu stingrība (cietība) glabāšanas laikā ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem nedaudz paaugstinājās, kas skaidrojams ar papildu aizsargslāņa veidošanos uz apstrādātajām ogām. Sausnas daudzums pēc apstrādes ar biopolimēriem nedaudz palielinājās.

Savukārt izvērtējot **aveņu** mikrobioloģisko rādītāju izmaiņas, ir novērota stabila tendence, ka mikroorganismu attīstību samazināja pārklājums ar koncentrāciju 3% levāna šķīdums+2% glicerīna šķīdums. Aveņu virsmas tipiskā dabiskā sarkanā krāsa pēc apstrādes ar biopolimēriem pēc vienas dienas glabāšanas kļuva spilgtāka, tādējādi arī sensorās vērtēšanas rezultāti variantiem ar biopolimēru apstrādi bija labāki.

Izvērtējot aveņu ogu cietības rezultātus glabāšanas beigās, ir labi redzama pārklājuma efektivitāte. Kopējās skābes daudzums bija būtiski mazāk samazinājies, kas var būt skaidrojams ar palēninātu fizioloģisko procesu norisi.

Rezultāti ir interesanti, sevišķi ar avenēm, tomēr arī diezgan variabli, praktiski izmantojamiem tehnoloģiskajiem ieteikumiem pagaidām vēl nepietiekami.

5. Karina Juhņeviča-Radenkova, Vitalijs Radenkovs, Ēdamais iepakojums – var daļēji atrisināt atkritumu problēmu "Saimnieks" 2022. jūlijs.

Ēdamais iepakojums – viens no atkritumu problēmas risinājumiem

Ik gadu planētas iedzīvotāji izlieto triljonu plastmasas maisiņu. Diemžēl to pārstrāde ir tikai daļēja – pārējais nonāk izgāztuvēs, tiek apglabāts poligonos vai nokļūst dabā. Pašlaik piesārņojums ar plastmasas izstrādājumiem ir viens no lielākajiem cilvēka radītajiem draudiem mūsu planētai.

SAGATAVOJA un FOTO: Dr. sc. ing. Karina Juhņeviča-Radenkova, Dr. sc. ing. Vitālijs Radenkovs

Situācija pasaulē

Pēc Pasaules Veselības organizācijas (PVO) 2018. gada datiem, pasaulē gadā tiek saražots aptuveni 275 milj. t (Mt) plastmasas. Kopā ar pārtikas atkritumiem 12 Mt plastmasas nonāk okeānos, radot neatgriezeniskus bojājumus ekosistēmai. Aptuveni 80 % pasaules jūru un okeānu piesārņojuma (atkritumu) ir plastmasa. Ja atkritumu problēma netiks risināta, tad 2050. gadā okeānos būs vairāk plastmasas nekā zivju.

Šī iemesla dēļ Eiropas Savienības dalībvalstis ir ieviesušas stratēģiju ar 2030. gadu izmantot tikai pārstrādājamus plastmasas iepakojumus ekonomiski dzīvotspējīgā veidā (biodegradējamus apkartējā vidē), bet līdz 2025. gadam vismaz 20 % izlietoto iepakojuma materiālu pārstrādāt. Pēdējos gados vienreizlietojamie trauki (glāzītes, salmiņi, šķīvji), kas pirms desmit gadiem tika ražoti no plastmasas, tagad pārsvarā top no kartona, savukārt glāžu vāciņi no bambusa, kukurūzas vai citam šķiedrām. Taču, kā zināms, kartona trauku ražošanai vajadzīgi kokmateriāli, bet šī resursa atjaunošanai – laiks.

Pašlaik tik populārie izlietotās bioplastmasas izstrādājumi ir jāsavāc un jāšķiro, jo apkārtējā vidē tie nesadalās. Piemēram, iepakojumi no polilaktīda (PLA-*Polylactic acid*) sadalās 60 °C, savukārt oksidegradējamie materiāli, kas satur epi piedevu, sadalās sīkās daļiņās, kas apkārtējo vidi piesārņo vēl vairāk nekā parastā plastmasa.

Ļoti laba alternatīva plastikai ir biopolimēru izmantošana iepakojuma materiālu ražošanā, taču tas ir relatīvi dārgi. Tādējādi ir daudz dažādu problēmu, kas jāatrisina, lai Eiropā maksimāli varētu atteikties no plastmasas lietošanas.

Turpinājums 64. lpp.

Pārtikas atkritumi

Diemžēl plastmasa nav vienīgais vides piesārņotājs. Milzīga problēma ir arī pārtikas atkritumi. Pēc Pārtikas un lauksaimniecības organizācijas (*Food and Agriculture Organisation/FAO*) statistikas datiem, pasaulē pēdējos 50 gados palielinājusies ogu ražošana. Globālais zemeņu tirgus no 754 517 t 1961. gadā palielinājies līdz 9.2 milj. t 2017. gadā. Savukārt avenēm pieaugums bija no 134 115 t 1961. gadā līdz 812 735 t 2017. gadā. Prognozēts, ka zemeņu patēriņš turpinās pieaugt un 2025. gadā tas varētu sasniegt 11.5 milj. t. Līdzīga ražošanas apjoma palielināšanās tendence tiek prognozēta arī avenēm.

Pēc *Fruit Logistica* 2020. gada datiem, Eiropas valstīs saražots ~ 44 milj. t augļu/ogu. Savukārt pēc augļu/ogu novākšanas uzglabāšanas laikā tiek zaudēts ~ 61 % no kopējās ražas. Tiesa, atšķirībā no plastmasas augļu/ogu atliekas apkārtējā vidē diezgan viegli sadalās, bet tās veicina siltumnīcefekta gāzu (SEG) emisiju, būtiski ietekmējot klimata pārmaiņas. Saskaņā ar Pasaules Bankas 2018. gada ziņojumu, ja problēmas atkritumu apsaimniekošanas sektorā netiks atrisinātas, 2050. gadā atkritumu apjoms jau būs palielinājies par 70 %.

Risinājumi augļu, ogu derīguma termiņa pagarināšanai

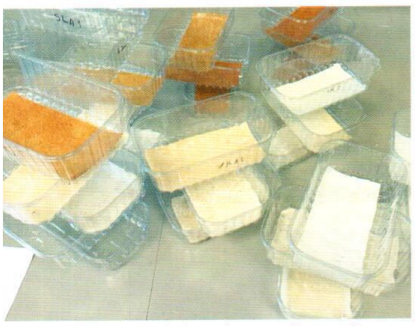
Viens risinājums, kā galu galā *nenoslīkt* atkritumos, ir ieviest jaunas metodes, kas ļautu pagarināt augļu un ogu realizācijas laiku. Tas ir īpaši aktuāli mīkstām ogām ar īsu derīguma termiņu (5–7 dienas), piemēram, zemenēm un avenēm.

Viena no metodēm, kas varētu būtiski pagarināt mīksto ogu derīguma termiņu un risināt atkritumu problēmu, ir ogu apstrāde un/vai uzglabāšana ēdamos bionoārdāmos biopolimēru iepakojumos. Biopolimēru pārklājumi tiek iedalīti augu, dzīvnieku un mikrobioloģiskās izcelsmes pārklājumos. Piemēram, hitozāns pieder pie dzīvnieku izcelsmes biopolimēriem. To iegūst no jūras vēžveidīgo pārstrādes blakusproduktiem – no čaulgliemju cietā ārējā skeleta. Diemžēl to ražošanai ir nepieciešamas spēcīgas skābes un sārmi, kas negatīvi ietekmē apkārtējo vidi. Savukārt, piemēram, levānu var iegūt gan no augu izcelsmes produktiem, gan mikrobioloģiskās sintēzes ceļā. Mikrobioloģiski sintezētiem biopolimēriem piemīt izteiktas polimēru īpašības – lieliska plēves veidošanas spēja, plēves stiprība, elastība, spīdums, labas barjeras īpašības utt. Šo īpašību dēļ mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimēri kļūst arvien populārāki medicīnā, farmācijā, kosmetoloģijā, pārtikas sektorā un iepakojuma industrijā, turklāt to ražošana nepalielina apkārtējās vides piesārņojumu. Ir pierādīts, ka mikrobioloģiskās izcelsmes biopolimēriem ir antimikrobiāla un pretvīrusu iedarbība, tiem piemīt antikoagulantu, pretvēža aktivitāte, kā arī holesterīnu pazeminošas u.c. īpašības.

Kā jau tika minēts, biopolimēru ražošana (sintēze) ir relatīvi dārga. Lai samazinātu mikrobioloģiski sintezēto biopolimēru ražošanas izmaksas, ir nepieciešams izmantot blakusproduktus. Piemēram, kā barotni levāna sintēzei izmantot krūmcidoniju

Zemenes pēc apstrādes ar biopolimēru ēdamo pārklājumu un pirms uzglabāšanas dzesētavā 4 °C.

sīrupu, kas veidojas sukāžu ražošanas procesā. Pašlaik krūmcidoniju ražotājiem sīrupa realizācija nesagādā problēmas, taču, ņemot vērā to, ka pēdējos piecos gados krūmcidoniju stādījumu platības palielinājušās teju vai četras reizes – līdz pat 590 ha, nākotnē tādas var rasties. Nepārdoto sīrupu var izmantot kā barības vielu avotu mikroorganismiem bioloģiski noārdāmu ēdamo polimēru ražošanā. Vēl viens blakusprodukts, kas lieliski piemērots biopolimēru sintēzei (ražošanai), ir piena pārstrādes procesā radušās sūkalas, kas tiek uzskatītas par problemātisku blakusproduktu, jo to utilizācija rada uzņēmumam papildu izmaksas. Sintēzes rezultātā iegūto biopolimēru var izmantot ogu pārklājuma izveidošanai (mērcējot ogas biopolimēra šķīdumā), kā arī plēvju ražošanā. Gan jaunizveidotās plēves, gan pārklājumi varētu ievērojami pagarināt



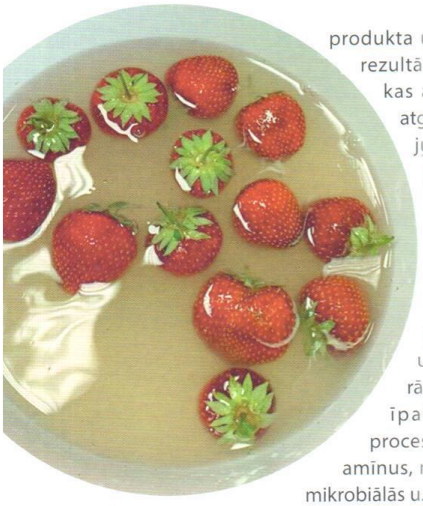
Dažāda veida, biopolimēru ēdamas plēves pirms ogu uzglabāšanas.

Biopolimēru ēdama plēve ar želatīnu pēc žāvēšanas.

Ogu žāvēšana pēc apstrādes ar biopolimēru ēdamo pārklājumu.

Turpinājums 66. lpp.

Zemeņu apstrāde ar biopolimēru ēdamo pārklājumu.



produkta uzglabāšanās laiku, rezultātā samazinot pārtikas atkritumus. Turklāt atgādināsim, ka pārklājumi un biopolimēra plēves ir ēdamas un veselīgas cilvēku organismam, tāpēc izlietojamas kopā ar produktu. Lai paaugstinātu pārklājuma/plēvju uzturvērtību, sensorās un antimikrobiālās īpašības, ražošanas procesā var pievienot vitamīnus, minerālvielas, pretmikrobiālās u.c. sastāvdaļas.

Biopolimēru pētniecība Latvijā

Apzinoties tēmas aktualitāti, Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta un Dārzkopības institūta zinātnieki sadarbībā ar citiem partneriem 2019. gadā uzsāka īstenot projektu *Bionoārdāmo polimēru iegūšana no atjaunojamiem resursiem augļu aizsargplēvju un iepakojuma materiālu izstrādei*, projekta Nr. 19-00-A01612-000004. Galvenais projekta mērķis ir izstrādāt jaunus materiālus augļu, īpaši mīksto ogu (aveņu un zemeņu) apstrādei ar bioloģiski noārdāmiem mikrobiāli sintezētiem polimēra pārklājumiem (ēdamām plēvēm), kas ļautu ilgāk saglabāt ogu kvalitāti un pagarināt to uzglabāšanas laiku, neizmantojot cilvēkam un videi kaitīgas ķīmiskas vielas. Vēlreiz jāuzsver, ka biopolimēri nav toksiski, tos atļauts izmantot pārtikas rūpniecībā un var lietot uzturā arī veģetārieši un diabēta slimnieki. Biopolimēru pārklājumi parasti ir bez garšas un smaržas, tie neietekmē, neizmaina apstrādāto produktu dabiskās sensorās īpašības. No tiem var veidot dabai draudzīgus *zaļos* iepakojumus, tie viegli noārdās, nerada bīstamus sadalīšanās produktus, līdz ar to nepiesārņo apkārtējo vidi.

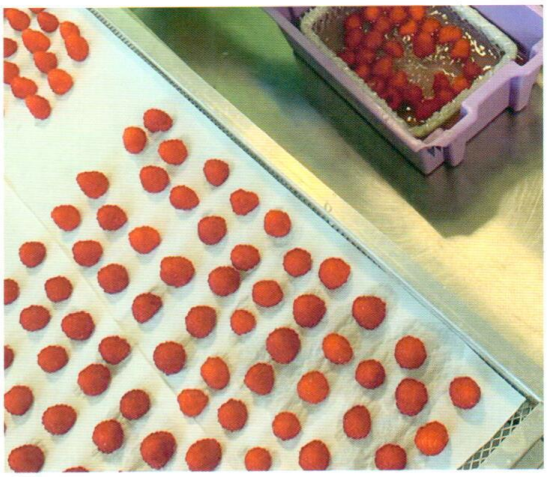
Projektā iegūtie dati liecina, ka, izmantojot piena sūkalas kā barības avotu mikroorganismiem, biopolimēru iznākums ir gandrīz 3x lielāks salīdzinājumā ar standarta barotni, līdzīga tendence saglabājas ar krūmcidoniju sīrupu. Iegūtiem biopolimēriem tika noteikta molekulārā masa, kas ir svarīgs radītājs iepakojuma materiāla ražošanā (jo augstāka molekulārā masa, jo izteiktāka plēves/pārklājuma veidošanas spēja). Piemēram, augu valsts biopolimēriem molekulārā masa svārstās no 5 līdz 15 tūkst. kDa, tie tiek raksturoti kā zemas kvalitātes. Jaunizveidotiem (mikrobioloģiskās izcelsmes) biopolimēriem molekulārā masa bija vidēji 15 milj. Da, kas attiecināts uz ļoti augstas kvalitātes produktu.

Pēc divu gadu ogu uzglabāšanas tika atlasīti labākie ēdamie pārklājumi un trīs ēdamo plēvju receptūras. Iegūtie dati parādīja, ka salīdzinājumā ar kontroles variantiem ogu (zemenes, rudens avenes) uzglabāšana biopolimēru plēvē ar apstrādi vai bez tās būtiski pagarina uzglabāšanas laiku un pozitīvi ietekmē kvalitātes saglabāšanu. Apstrādātiem ogu paraugiem novērota izteiktāka krāsa (noteikts ar krāsas spektrokolorimetru), augstāki bioķīmiskie (šķīstošās sausnas, antociānu, kopējo fenolu saturs) un sensorie radītāji (izskats, krāsa, aromāts, cietība, garša). Jāatzīmē, ka salīdzinājumā ar kontroles variantiem biopolimēru pārklājums un/vai plēve vērā ņemami nomāc mikroorganismu attīstību; uzglabāšanas laikā paraugos novērota nenozīmīga baktēriju, pienskābes baktēriju, raugu un pelējumu attīstība. Lai pilnībā pārliecinātos par biopolimēru efektivitāti ogu uzglabāšanā, pētījums tiks turpināts trešo gadu.

Pēc projekta beigām (30.09.2022.) visi iegūtie dati tiks apkopoti gan zinātniskajā apskatā, gan atskaitē, kas būs pieejama apskatei ieinteresētām personām. Iespējams, tuvākajā nākotnē biopolimēru sintēzes tehnoloģija un pētīto plēvju pārklājumu receptūras tiks komercializētas, līdz ar to kļūs pieejamas plašam cilvēku lokam un uzņēmējiem.

Pateicība Zemkopības ministrijai un Lauku atbalsta dienesta atbalstam par iespēju realizēt šo pētījumu.

Aveņu apstrāde ar biopolimēru ēdamo pārklājumu.



Aveņu ogu žāvēšana pēc apstrādes ar biopolimēru ēdamo pārklājumu.

3. PIELIKUMS: APP DĀRZKOPĪBAS INSTITŪTS – OMNISEC ZIŅOJUMS

Malvern Panalytical
a spectris company

00792312 Dārzkopības institūts OMNISEC ziņojums

Konfidenciāls dokuments

Malvern Panalytical
a spectris company

OMNISEC

MULTIDETE KTORU EKSKLŪZIJAS HROMATOGRĀFIJAS SISTĒMA

Konfidenciāls dokuments

© 2021 MalvernPanalytical 2022. gada 20. jūnijā

Konfidenciāls dokuments

Kas ir GPC/SEC?

GPC → **gelcaurlaidības hromatogrāfija**
SEC → **eksklūzijas hromatogrāfija (pēc lieluma)**
GFC → **gelfiltrācijas hromatogrāfija**

Paraugu maisījums
- Izšķīdināts mobilajā fāzē

Separācija
Stacionārā fāze
Mobilā fāze
- Atdala mērāmo analizējamo vielu no citām maisījumā esošajām molekulām pēc IZMĒRA

Detektori

Rezultāti
Molekulmasa
Lielums
Mūsu makromolekulu struktūra

© 2021 MalvernPanalytical 2022. gada 20. jūnijā
Konfidenciāls dokuments

Konfidenciāls dokuments

OMNISEC APARATŪRAS MODUĻI

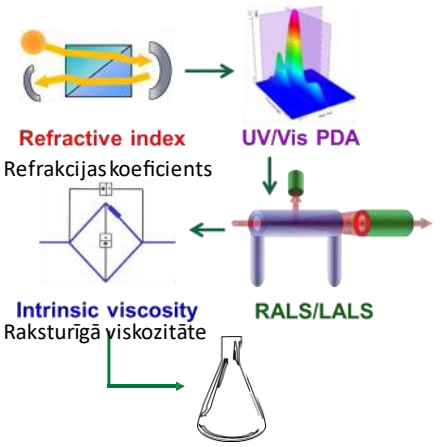
OMNISEC *Resolve* modulis – plūsma, inžekcija, separācija

© 2021 MalvernPanalytical
Konfidenciāls dokuments

Konfidenciāls dokuments

OMNISEC APARATŪRAS MODUĻI

OMNISEC *Reveal* modulis – noteikšana



© 2021 MalvernPanalytical

Konfidenciāls dokuments

OMNISEC multi detektoru sistēma

GPC – gelcaurlaidības hromatogrāfija

- Kolonnu un detektoru nodalīta T kontrole
- Noplūžu un tvaika sensori

- Maza apjoma degazators
- Pašuzsūcošs sūknis
- Apgrieztā blīvējuma skalošanas mehānisms

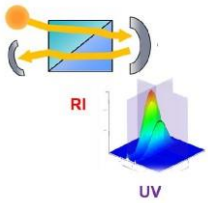
- Automātiska paraugu dozatora T kontrole
- Pudelītes vai 96 iedobju mikrotitrēšanas plates
- 3 inžekciju režīms – vērtīgiem paraugiem pieejams bezatkritumu režīms

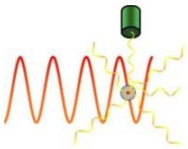
- RI un LS pastiprināta jutība
  - Mēra pat 100 ng
  - Mēra M_w līdz pat 200 g/mol
- PDA UV/Vis spektrometrs
  - Mēra absorbciju jebkurā λ no 190-900 nm
- Viskozimetrs
  - Automātisks pašregulējošais tilts
  - Kapilāri, ko var nomainīt pats lietotājs

© 2021 MalvernPanalytical

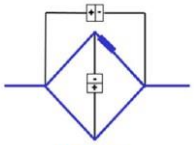
Detektori

OMNISEC *Reveal*





RALS/LALS
MALS



DP/IP

KONCENTRĀCIJAS DETEKTORI

- **Diferenciālais refraktometrs**
- **Diodes matricu UV/Vis spektrometrs**
- RI un UV/Vis reaģē uz parauga koncentrāciju.

GAISMAS IZKLIEDES DETEKTORS

- **RALS 90° leņķis**
- **LALS 7° leņķis**
- **MALS 20 leņķi**
- Reaģē uz paraugamolekulmasu

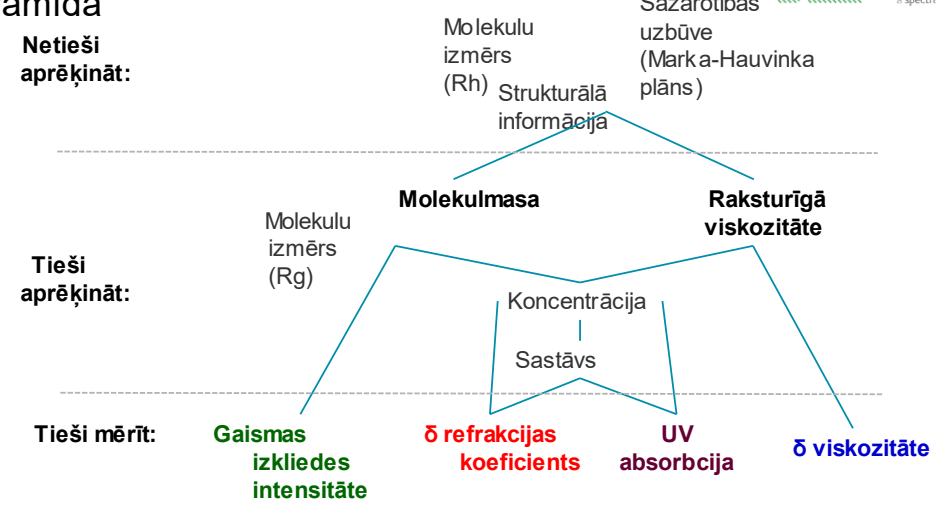
VISKOZIMETRA DETEKTORS

Četru kapilāru Vitstona tilts

- Reaģē uz šķīdumā esošā parauga raksturīgo viskozitāti.

© 2021 MalvernPanalytical

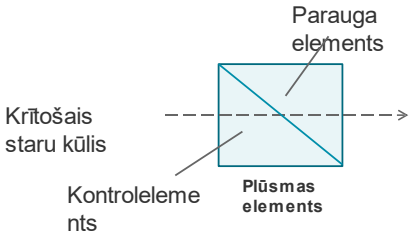
Daudznoteikšanas piramīda



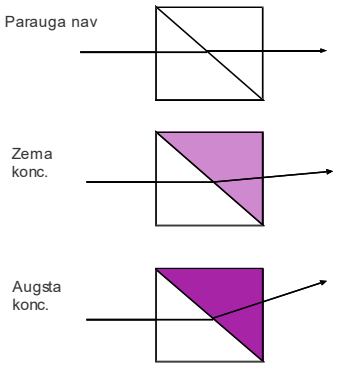
© 2021 MalvernPanalytical

Diferenciālais refraktometrs (RI)

Princips: atšķirīgās vidēs gaisma pārvietojas ar atšķirīgu ātrumu.



- Izšķīdinot vielu šķīdinātājā, gaismas laušanas koeficients mainās pēc šķīduma.
- Staru kūļa novirze atbilst parauga koncentrācijai.

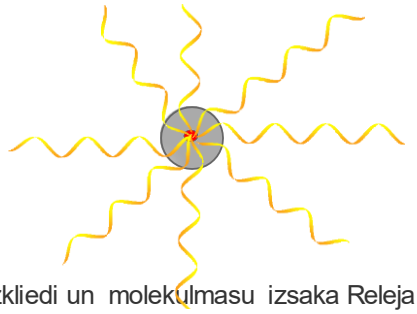


RI rezultāts (mV) = K_{RI} • dn/dc • koncentrācija

© 2021 MalvernPanalytical

Statiskā gaismas izkliede

- Fotonu no krītošā staru kūļa absorbē makromolekula , un tas tiek atkārtoti izstarots visos virzienos.



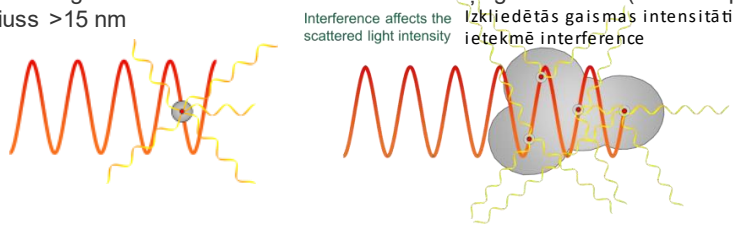
- Attiecību starp gaismas izkliedi un molekulmasu izsaka Releja vienādojums:

$$R_\theta \text{ a } Mw$$

© 2021 MalvernPanalytical

Leņķiskā asimetrija

- Dažādas molekulas izkliedē gaismu dažādos virzienos ar atšķirīgu intensitāti.
  - Mazākas molekulas gaismu izkliedē vienmērīgi visos virzienos (izotropā izkliede), rādiuss <15 nm
  - Lielākas molekulas gaismu izliedē dažādos virzienos ar atšķirīgu intensitāti (anizotropā izkliede), rādiuss >15 nm



- Mums zināmā veidā ir jātiek skaidrībā ar anizotropo izkliedi, lai aprēķinātu pareizu molekulmasu .
  - Balstoties uz Releja vienādojumu, ja θ= 0, tad izkliedētās gaismas intensitāte ir tieši saistīta ar parauga molekulmasu.
  - Mēs nevaram veikt mērījumus ar θ= 0, jo krītošā gaisma ir pārāk spilgta.

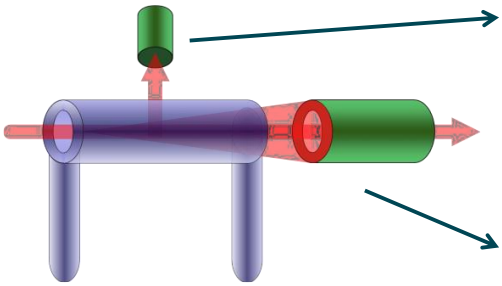
© 2021 MalvernPanalytical

Konfidenciāls dokuments

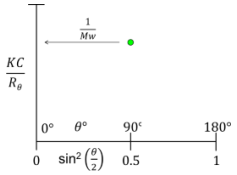
Konfidenciāls dokuments

RALS/LALS

RALS/LALS detektoram ir RALS jutība mazām molekulām, UN tas var izskaidrot anizotropiju lielām molekulām

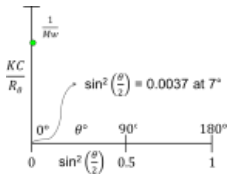


Mazas molekulas



Taisnleņķim ir labākais signāls trokšņu līmeņiem un tādējādi arī labākā jutība

Lielas molekulas

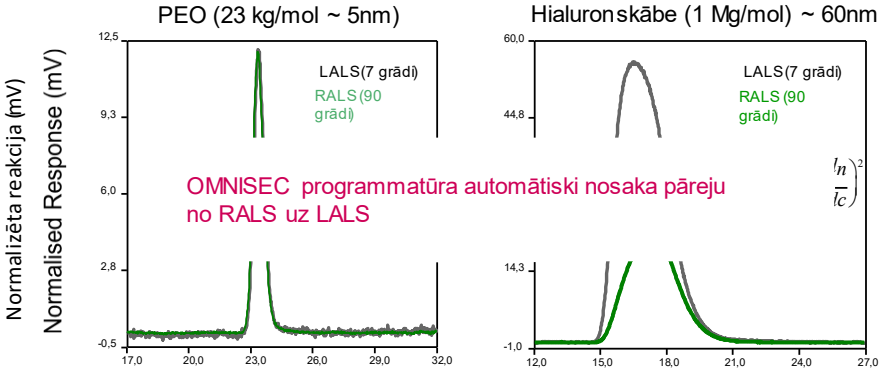


Neticami zems leņķis nozīmē, ka nav nepieciešama datu pielāgošana vai ekstrapolācija un kļūdas ir samazinātas līdz minimumam

© 2021 MalvernPanalytical

Konfidenciāls dokuments

RALS/LALS praksē



Izotropie izkliedētāji
RALS vai LALS sniedz pareizu M_w

Anizotropie izkliedētāji
LALS sniedz pareizu M_w

© 2021 MalvernPanalytical

Raksturīgā viskozitāte

No kā ir atkarīga izturība pret plūsmu?

Raksturīgai viskozitāte ir šādas mērvienības:

$$dL/g$$

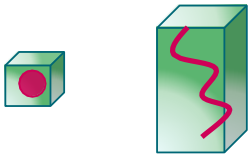
Raksturīgā viskozitāte ir apgriezti proporcionāla molekulas blīvumam :

$$RV \quad \frac{1}{\text{blīvums}}$$

Mēs uz struktūru varam paraudzīties šādi:

$$RV \quad \frac{\text{tilpums}}{\text{masa}}$$

Kurai no šīm divām molekulām ar vienādu masu telpā ir lielāks tilpums?

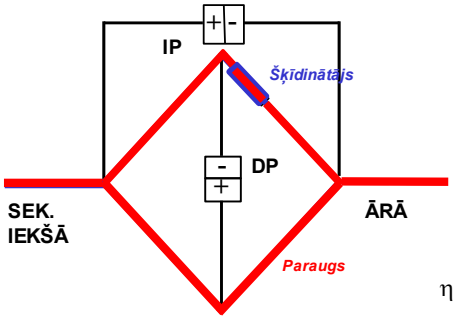


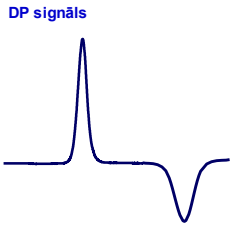
© 2021 MalvernPanalytical

Kā mēs mērām raksturīgo viskozitāti?

Četru kapilāru viskozimetra tilts – Vitstona tilta koncepcija

- Viskozimetrs nosaka izmaiņas spiedienā, paraugam pārvietojoties pa viskozimetru .





$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$$

$$\eta_{sp} = \frac{4\ DP}{IP - 2\ DP} = C \times IV$$

Spiediena devēju rezultāta un īpatnējās viskozitātes attiecība

Īpatnējās viskozitātes un raksturīgās viskozitātes attiecība

© 2021 MalvernPanalytical

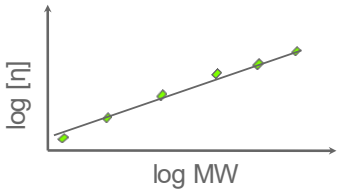
Ko raksturīgā viskozitāte (IV) pastāsta par mūsu paraugu?

Ķēdes garums

Pieaugošs garums → Blīvuma samazinājums → IV pieaugums

Marka-Hauvinka vienādojums izsaka MW pret IV : $[\eta] = k \times MW^a$

$\log [\eta] = \log k + a \times \log MW$



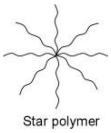
M-H **a** = saistīts ar veidu, kādā ķēdes ir pievienotas polimēra mugurkaulam

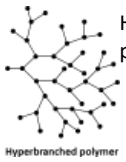
M-H **k** = mugurkaula blīvums

Sazarotība – kompaktāka struktūra par lineāriem polimēriem

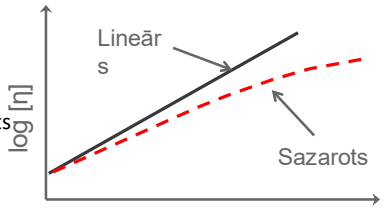
Sazarotība → Blīvuma pieaugums → IV samazinājums

Zvaigžņu polimērs





Hipersazarots polimērs



© 2021 MalvernPanalytical

Konfidenciāls dokuments

Paraugu analīze

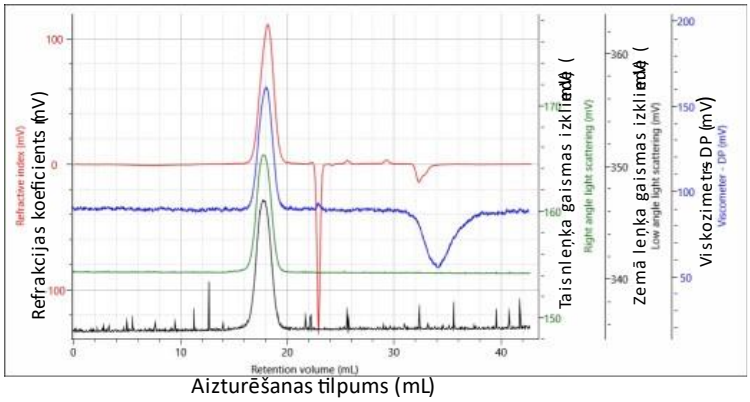
Paraugu sagatavošanas un analīzes nosacījumi

- Kolonnas: Malvern Panalytical GPC analīzei organiskos apstākļos
- Automātiskā paraugu dozatora temperatūra: 25 °C
- Kolonnas/detektora krāsns temperatūra: 50 °C
- Paraugi sagatavoti līdz ~3-6 mg/mL
- Inžekcijas tilpums: 100 µL

Konfidenciāls dokuments
© 2021 Malvern Panalytical

Paraugu analīze

Hromatogramma – verifikācijas standarts



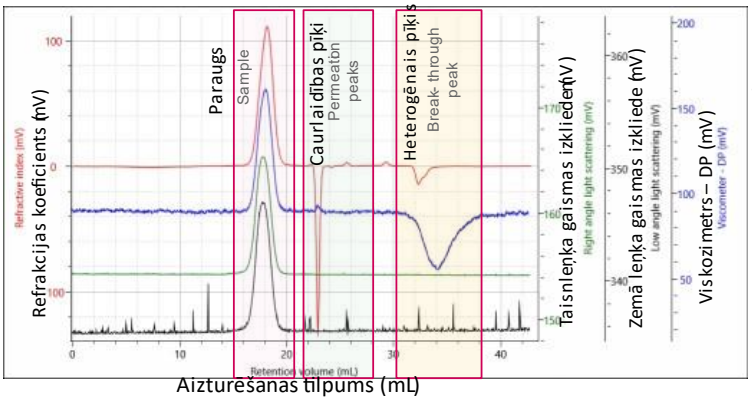
Aizturēšanas tilpums (mL)

- Dekstrāna 72 kg/mol 100 µL inžekcija 2 mg/mL koncentrācijā (konc.).
- Sarkanā krāsā ir reakcija no refrakcijas koeficienta (RI) detektora, kas mēra parauga koncentrāciju.
-
- Zilā krāsā ir reakcija no viskozimetra (visk.), kas mēra parauga raksturīgo viskozitāti.
- Zaļā un melnā krāsā attiecīgi ir reakcijas no taisnleņķa un zemā leņķa gaismas izkliedes (RALS un LALS) detektoriem, kas mēra parauga molekulmasu.

© 2021 Malvern Panalytical

Paraugu analīze

Hromatogramma – verifikācijas standarts



Aizturēšanas tilpums (mL)

- Dekstrāna 72 kDa 100 µL inžekcija 2.4 mg/mL koncentrācijā (konc.).
- Parauga eluācija (rozā zona)
- Caurlaidības pīķis RI. Analizējamās zonas beigas hromatogrammā (zaļā zona).
- Heterogēnais pīķis viskozimetrā (dzeltenā zona).

Caurlaidības pīķis: nelielu atšķirību noteikšana starp eluentu un šķīdinātāju, ko izmanto parauga sagatavošanai, piemēram, izšķīdinātas gāzes. Hromatogrammā šī parādība ir ļoti izplatīta RI detektora jutības dēļ. Pīķis ir zināms kā kopējais caurlaidības pīķis, kas var būt pozitīvs vai negatīvs atkarībā no sastāva atšķirībām, un tajā signālu var ietekmēt atšķaidītāji, piedevas un materiāli ar ļoti mazu molekulmasu.

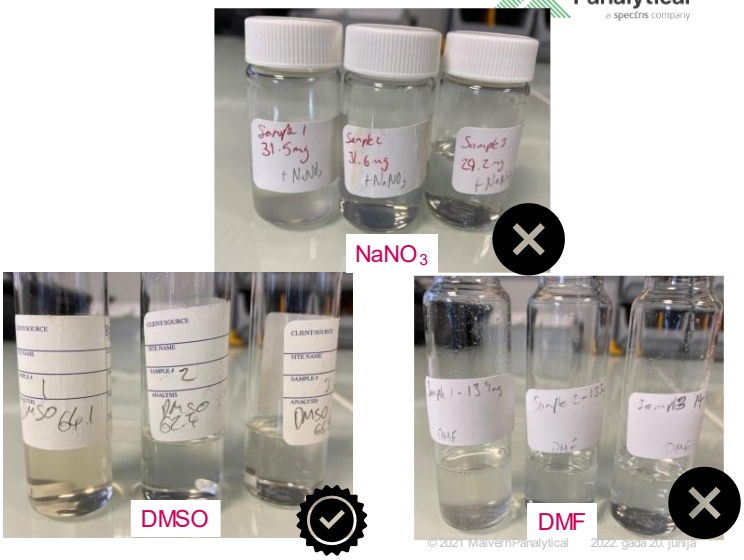
Heterogēnais pīķis parādās, paraugam pametot aizkaves kolonnu Vitstona tilta negatīvajā pusē. Hromatogrammā tā ir normāla

© 2021 MalvernPanalytical

Paraugu analīze

Izšķīdināšana

- Iepriekšējie projekti ar paraugiem uz levāna bāzes tika veikti $NaNO_3$ ūdens šķīdumos, kas līdz ar to bija pirmais testētais šķīdinātājs.
- Izskanēja priekšlikums izmantot DMF un DMSO, un pēc šķīdinātāju saņemšanas tika veikta arī testēšana.
- Testēšana tika veikta ar zemas koncentrācijas LiBr sāli, jo tas ar šiem šķīdinātājiem mēdza slāpēt/izjaukt starpmolekulāras mijiedarbības . Un ar karsēšanu un maisīšanu 80°C.
- 2. un 3. parauga gadījumā šķīduma paraugi izgāja cauri 0,45 um neilona šļirces filtram, bet 1. paraugs filtru aizsprostoja.



© 2021 MalvernPanalytical 2022. gada 20. jūnijā

Paraugu analīze

Rezultātu veidi

Replikāti

Replicates	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	Đ	Rh (nm)	IV (dL/g)	Recovery(%)
i						
ii						
Average						

Atgūstamība

Vidējais

Vidējā masa
Molekulmasa

Skaitlis
Vidējāmolekulmasa

Izkliedētība
M_w / M_n

Hidrodinamiskais rādius

Raksturīgā
viskozitāte

Noteiktā koncentrācija ÷ ieejas koncentrācija

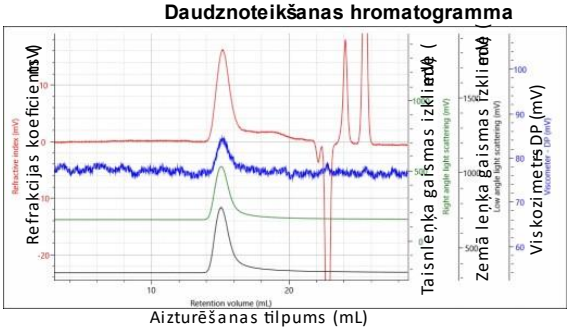
© 2021 MalvernPanalytical 2022. gada 20. jūnijā

Paraugu analīze

2. paraugs - 100µL, 6,2 mg/mL

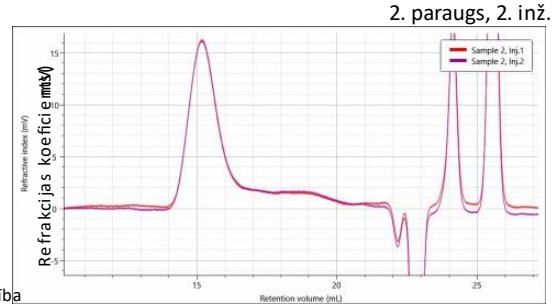
Malvern Panalytical
a spectris company

Daudznoteikšanas hromatogramma



Aizturēšanas tilpums (mL)

2. paraugs, 1. inž.
2. paraugs, 2. inž.



Aizturēšanas tilpums (mL)

	Replicates	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	Đ	Rh (nm)	IV (dL/g)	Recovery (%)
Replikāti	i	15,146,000	14,127,000	1.07	36.3	0.21	54.3
	ii	15,724,000	14,508,000	1.08	35.3	0.19	55.0
Vidējais	Avg.	**15,435,000**	**14,317,500**	**1.08**	**35.8**	**0.20**	**54.7**

Atgūstamība

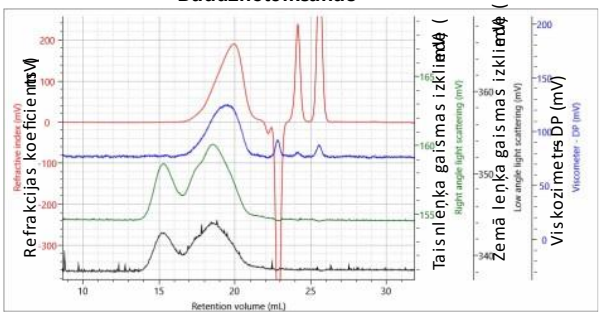
© 2021 MalvernPanalytical 2022. gada 20. jūnijā

Paraugu analīze

3. paraugs - 100µL, 6,6 mg/mL

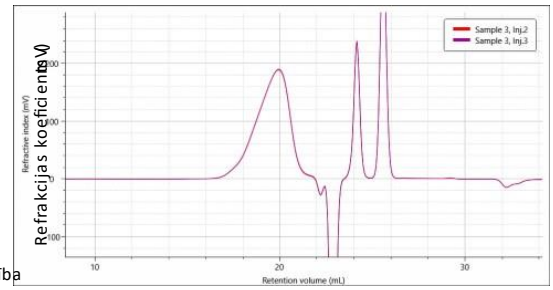
Malvern Panalytical
a spectris company

Daudznoteikšanas



Aizturēšanas tilpums (mL)

3. paraugs, 2. inž.
3. paraugs, 3. inž.



Aizturēšanas tilpums (mL)

	Replicates	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	Đ	Rh (nm)	IV (dL/g)	Recovery (%)
Replikāti	i	26,700	12,500	2.14	3.5	0.14	81.8
	ii	26,400	12,000	2.20	3.5	0.14	80.6
Vidējais	Avg.	**26,600**	**12,300**	**2.17**	**3.5**	**0.14**	**81.2**

Atgūstamība

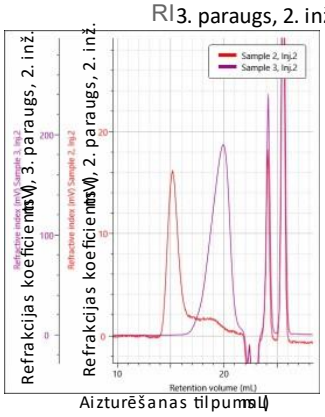
© 2021 MalvernPanalytical 2022. gada 20. jūnijā

Paraugu analīze

Paraugu salīdzinājums

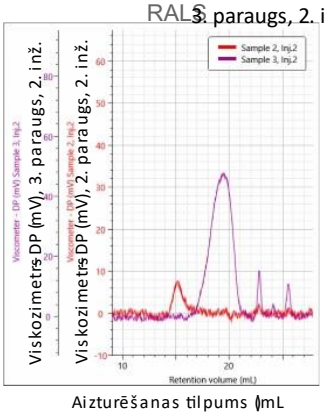
RI

2. paraugs, 2. inž.
3. paraugs, 2. inž.



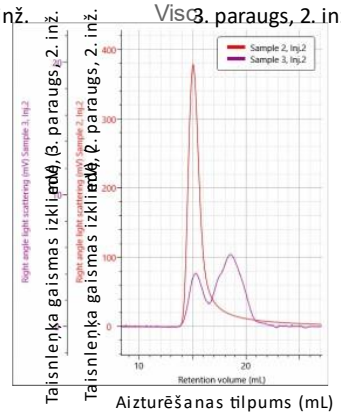
RALS

2. paraugs, 2. inž.
3. paraugs, 2. inž.



Visc

2. paraugs, 2. inž.
3. paraugs, 2. inž.



Parauga Nr.
2. paraugs
3. paraugs

Sample ID	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	Đ	Rh (nm)	IV (dL/g)	Recovery (%)
Sample 2	15,435,000	14,317,500	1.08	35.8	0.20	54.67
Sample 3	26,600	12,300	2.17	3.5	0.14	81.18

Atgūstamība

© 2021 Malvern Panalytical

4. PIELIKUMS: EKSPERIMENTĀLAIS DARBS UN TĀ IZTIRZĀJUMS

BAKTERIĀLAS CELULOZES, KSANTĀNA, DEKSTRĀNA UN LEVĀNA SINTEZĒJUŠO BAKTĒRIJU DZĪVOTSPĒJAS NOVĒRTĒŠANA

Materiāli un metodes

Baktēriju uzglabāšana

Bakteriālo kultūru uzglabāšana pirms eksperimenta: sasaldētas ar 5% glicerīna piedevu tika uzturētas saldētavā –20°C temperatūrā.

1. attēls. Sasaldētas polimēru sintezējošas kultūras pirms eksperimenta sākuma.

Hestrin-Schramm barotne

Bakteriālas celulozes (BC) un levāna sintezējušo baktēriju dzīvotspējas novērtēšanai teika izmantota standarta Hestrin-Schramm (HS) barotne.

1. tabula

HS barotnes sastāvs

Reaģents	Daudzums, g/L
Glikoze	20
Peptons	5
Rauga ekstrakts	5
Na_2HPO_4	2,7
$MgSO_4$,	0,2
$C_6H_8O_7$	1,5

Baktērijas kultivācija

Pēc sasaldēto kultūru atkausēšanas, inokulācijai paredzētās baktērijas tika kultivētas stikla mēģenēs, kas bija pildītas ar 10-ml HS barotni kas satur 20 g/L glikozes. Baktērijas tika inkubētas termostatā 24 stundas +30°C temperatūrā.

Rezultāti

2. attēls. Baktēriju kultivācija termostatā +30°C 24 stundas.

Pēc inkubācijas dzīvotspējīgas kultūras tika atlasītas tālākiem eksperimentiem. Izmantotas kultūras ir apkopotas 2. tabulā.

2. tabula

Dzīvotspējīgas kultūras, to numuri un sintezēti biopolimēri.

Nosaukums	**Numurs**	**Biopolimērs**
Komagatoeibacter hansenii B22	B-22	BC
Gluconabacter nephelii P1464	B-33	Levāns
Gluconacetobacter xylinus ATCC 53582	B-34	BC
Komagataeibacter rhaeticus P1463	B-46	BC
Komagataeibacter xylinus DSM 6513T	B-47	BC
Komagataeibacter hansenii DSM 5602T	B-48	BC
Leuconostoc mesenteroides ssp Cremoris celms LF5	B-49	Levāns
Xanthomonas campestris DSM1526	B-52	Ksantāns
Xanthomonas campestris DSM3586	B-53	Ksantāns
Xanthomonas campestris DSM19000	B-54	Ksantāns
Xanthomonas campestris LMG8031	B-55	Ksantāns

BAKTERIĀLAS CELULOZES SINTEZĒJUŠO BAKTĒRIJAS *GLUCONACETOBACTER XYLINUS* ATCC 53582 CELMU IZMANTOJOT PIENA SŪKALAS

Materiāli un metodes

Izmantotais baktēriju celms: *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582

Inokulāta sagatavošana

G. xylinus ATCC 53582 inokulāts tika pagatavots,100 mL HS barotnei pievienojot 5 mL mikroorganismu kultūras no mēģenes. Kultivēšana notika +30°C temperatūrā 24 h.

Baktēriju kultivācija

Mikroorganismu kultivācija notika 500 mL koniskajās kolbās. Katrā kolbā tika pievienotas 100 mL attiecīgas barotnes un 5mL inokulāta. Kultivācijas laiks – 5 dienas. Atkārtojumu skaits katrai barotnei – 7.

Siera sūkalas

Eksperimentos tika pārbaudītas sūkalas kā alternatīvs un lēts substrāts etiķskābes baktēriju augšanai un to eksopolisaharīdu sintēzei. Siera sūkalas tika saņemtas no A/S Rankas Piens. Eksperimenta laikā kurām netika veikta pirmsapstrāde: netika samazināta proteīnu koncentrācija, ka arī nebija veikta enzīmatiskā un skābes hidrolīze. Sūkalām netika pievienotas piedevas.

3. attēls. Siera sūkalu barotne pēc sterilizācijas. Proteīnu izgulsnēšanās pēc termiskās apstrādes.

BC attīrīšana un masas noteikšana

Sintezētu BC iegremdē 1M NaOH temperatūrā +60°C 90 min, lai attīrītu BC plēvi no šūnām. Vēlāk BC tika mazgāta destilētā ūdenī un žāvēta 24 h +50°C temperatūrā. Pēc žāvēšanas tika noteikta BC plēves sausā masa.

Cukuru daudzuma noteikšana

Cukuru koncentrācijas tika noteiktas, izmantojot komerciāli pieejamus reaģentu komplektus (K-SURFG, K-ACET un Megazyme Co, Wicklow, Īrija), sekojot ražotāja instrukcijām.

pH noteikšana

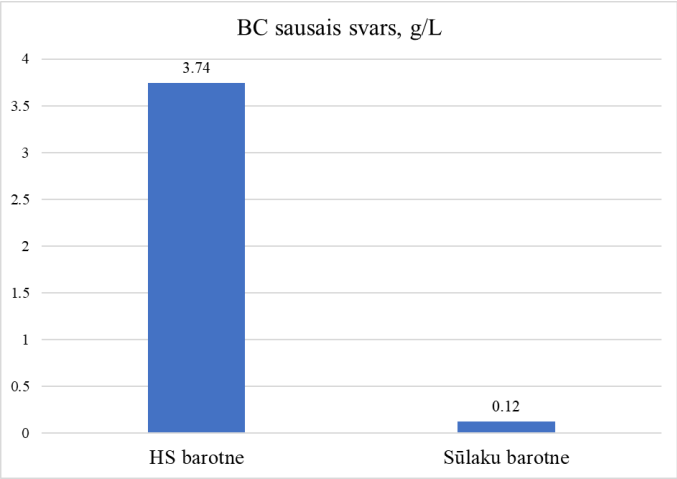
5 – 10 ml vārglāzē ielej 5 ml pētāmā šķidruma un ievieto pH-metra elektrodu, lai tas nepieskartos glāzītes sieniņām. Mērījumus nolasa pēc 10 sekundēm. Pēc katra mēģinājuma elektrodu noskalo ar destilētu ūdeni un nosusina. pH mērīšanu veic ar pH-metru *Microprocessor pH Meter pH211*.

Datu statistiskā analīze

Datu statistiskā analīze (ANOVA metode) tika veikta, izmantojot SPSS (BM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0.) datu analīzes programmas. Darbības veiktas pie būtiskuma līmeņa p = 0,05. Attēlu veidošanai tika izmantots *Microsoft Excel* programma.

Rezultāti

Lai pārbaudītu barotnes ietekmi uz *G. xylinus* augšanu un BC veidošanos, baktērijas tika audzētas standarta HS barotnē un neapstrādātās sūkalās. Iegūtie rezultāti ir attēloti 3. attēlā.



4. attēls. BC sintēze (sausais svars) HS un sūkalu barotnē pēc piecām kultivācijas dienām.

Balsoties uz iegūtiem datiem var redzēt, ka visaugstākā BC sintēze bija novērota uz standarta HS barotnes (3,74 ± 0,02 g/L). Savukārt, uz neapstrādātām sūkalām BC sintēze bija būtiski zemāka ($p < 0,001$). Pēc piecām kultivācijas dienām BC sintēze uz sūkalu barotnes bija 0,12 g/L (sausais svars). Tas var būt saistīts ar to, ka sūkalas netika apstrādātas pirms eksperimenta sākuma.

Svarīgi atzīmēt, ka BC membrānas izmērs ir atkarīgs arī no BC ražošanā izmantotajiem kultūras nesējiem. Iegūti rezultāti liecināja, ka barotne, kas satur sūkalas, radīja BC plēvi, kas bija plānāka par plēvēm, kas izveidojas standartā barotnē, neskatoties uz to, ka eksperiments sākas ar vienādu inokulata izmēru (1 ml).

Salīdzinot ar literatūras avotiem, var secināt, ka daudzi BC ražojušie celmi nav spējīgi efektīvi sintezēt BC, izmantojot piena sūkalas. Piemēram, vienā pētījumā tika atzīmēts, ka Acetobacter xylinum ATCC 10821 un *Acetobacter xylinum* ATCC 23770 nav spējīgas veidot BC plēves, izmantojot piena sūkalas (Thompson and Hamilton 2001). Citā pētījumā arī konstatēja, ka cita BC sintezējoša baktērija (HS barotnē BC daudzums sasniedz 2,7 g/L sausā svara) *Gloconacetobacter sacharii* arī nav spējīgs sintezēt BC no piena sūkalām (0,08 g/L) (Carreira et al. 2011).

Secinājumi

Var secināt, ka neapstrādāta sūkalu barotne nav efektīva alternatīva BC sintēzei ar baktēriju *G. xylinus* ACCT 53582 celmu. Ir nepieciešams meklēt citus BC ražojušos celmus, ka arī novērtēt sūkalu pirmsapstrādes metodes, piemēram, enzimātiskā pirmsapstrāde, lai panāktu efektīvu BC ražību uz piena sūkalām. Līdzīgas metodes tiks apskatītas tālākajos eksperimentos.

Informācijas avoti

Thompson DN, Hamilton MA (2001) Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. Appl Biochem Biotechnol - Part A Enzym Eng Biotechnol 91–93:503–513. https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:503

Carreira P, Mendes JAS, Trovatti E, Serafim LS, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP (2011) Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. Bioresour Technol 102:7354–7360. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.081

BAKTERIĀLAS CELULOZES SINTĒZE AR *KOMAGATOEIBACTER HANSENII* B-22 UN *KOMAGATOEIBACTER RHAETICUS* P 1463 UZ HS BAROTNES

Materiāli un metodes

Izmantotie celmi:

- *Komagatoeibacter hansenii* B-22;
- *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463.

Standarta HS barotne BC sintēzei:

Eksperimenta ietvaros tika pārbaudīta divu celmu spēja sintezēt BC uz standarta HS barotnes un modificētas HS barotnes (glikoze aizstāta ar fruktozi un paaugstināta cukuru koncentrācija).

3. tabula

HS barotnes sastāvs.

Reaģents	Daudzums, g/L
Glikoze	20 vai 40
Peptons	5
Rauga ekstrakts	5
Na_2HPO_4	2,7
$MgSO_4$,	0,2
$C_6H_8O_7$	1,5

Modificēta HS barotne, BC sintēzei:

Fruktoze ir svarīgs monosaharīds, kas ir sastopams alternatīvajās barotnēs, piemēram, melases barotnē vai sulās. Ir nepieciešams pārbaudīt, vai pētāmie celmi ir spējīgi metabolizēt attiecīgu monosaharīdu.

4. tabula

Modificētas HS barotnes sastāvs.

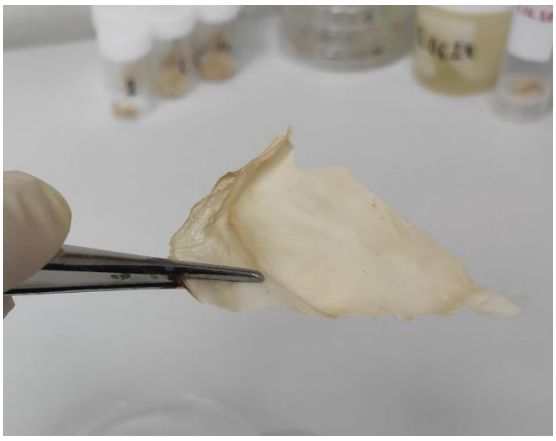
Reaģents	Daudzums, g/L
Fruktoze	20 vai 40
Peptons	5
Rauga ekstrakts	5
Na_2HPO_4	2,7
$MgSO_4$,	0,2
$C_6H_8O_7$	1,5

Inokulāta sagatavošana un kultivācija

Komagatoeibacter hansenii B-22, *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463 inokulāti tika pagatavoti, izmantojot 100 ml HS barotni. Kultivēšana notika +30°C temperatūrā 24 h. Kultivācijas notika 500 ml kolbās ar 250 mL attiecīgās barotnēs. Baktēriju kultivācija notika 5 dienu laikā. Katram pētāmam parametram tika veikti 6 atkārtojumi.

BC attīrīšana un masas noteikšana

Sintezētu BC iegremdē 1 M NaOH temperatūrā 60°C 90 min, lai attīrītu BC plēvi no šūnām un barotnes paliekām. Vēlāk BC tika mazgāta destilētā ūdenī un žāvēta 24 h +50°C temperatūrā. Pēc žāvēšanas tika noteikta BC plēves sausā masa.



5. attēls. Izkaltētais paraugs – BC plēve pēc kultivācijas HS barotnē ar 20 g/L glikozes koncentrāciju.

Cukuru daudzuma noteikšana

Cukuru koncentrācijas tika noteiktas, izmantojot komerciāli pieejamus reaģentu komplektus (*Sucrose, D-fructose and D-glucose assay procedure* K-SUFRG 04/18, Megazyme Co, Wicklow, Īrija), sekojot ražotāja instrukcijām.

pH noteikšana

5 – 10 ml vārglāzē ielej 5 ml pētāmā šķidruma un ievieto pH-metra elektrodu, lai tas nepieskartos glāzītes sieniņām. Mērījumus nolasa pēc 10 sekundēm. Pēc katra mēģinājuma elektrodu noskalo ar destilētu ūdeni un nosusina. pH mērīšanu veic ar pH-metru *Microprocessor pH Meter pH211*. Paraugi tiek ņemti eksperimenta sākumā un beigās.

BC iznākuma no patērēta substrāta noteikšana

Cukuru (S) patēriņš kultivācijas laikā tika aprēķināts kā starpība starp sākotnējo (S_0) un gala cukura koncentrāciju. Izmantojot datus par izmaiņām BC koncentrācijā un ΔS attiecīgajos laika punktos, aprēķināja BC iznākumu no substrāta ($Y_{P/S}$, %). Aprēķini veikti pēc formulas:

$$Y_{P/S} = \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1} \times 100\%$$

kur, $Y_{P/S}$ – iznākums no patērētā substrāta;

P_0 – BC sausais svars (vai skābes koncentrācija) eksperimenta sākumā, g/L (tika pieņemts par 0);

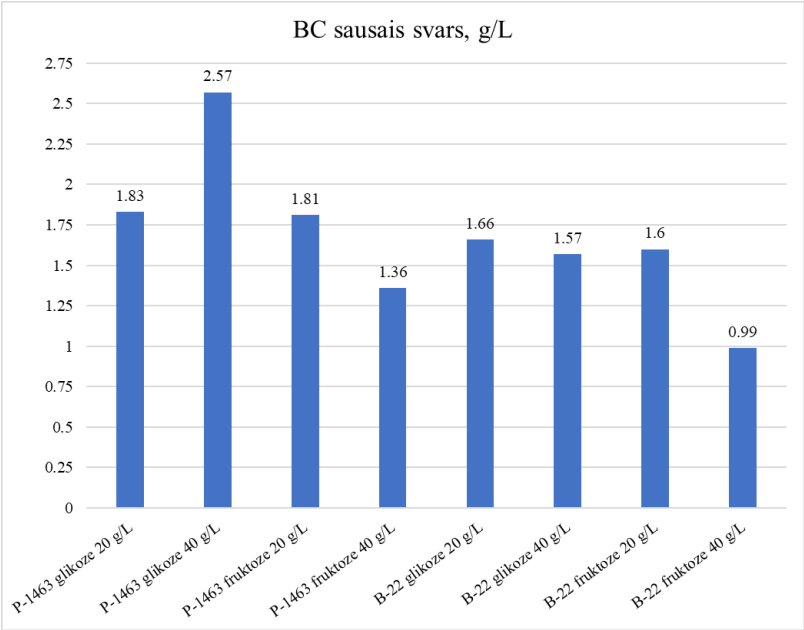
P_1 – BC sausais svars (vai skābes koncentrācija) eksperimenta beigās, g/L;

S_0 – substrāta koncentrācija barotnē eksperimenta sākumā, g/L;

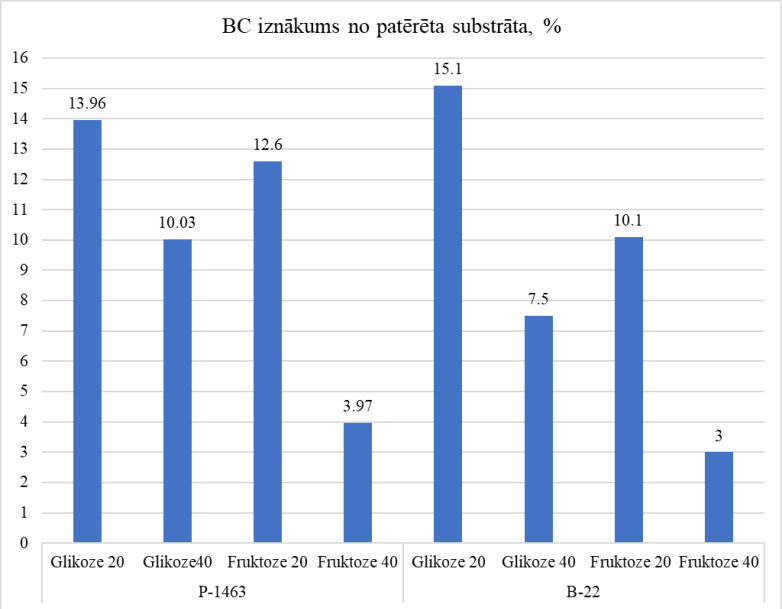
S_1 – substrāta koncentrācija barotnē eksperimenta beigās, g/L.

Rezultāti

Lai pārbaudītu BC ražību *K. rhaeticus* celmam P-1463 un *K. hansenii* celmam B22, inokulāta sagatavošanai izmantoja HS barotni (kas satur 20 g/L glikozes) un HS barotni vai modificēto barotni, kas satur 40 g/L glikozes, vai 20 un 40 g/L fruktozes kā galveno barotnes komponentu. Iegūtie dati apkopoti 5. tabulā. *K. rhaeticus* celma P 1463 un *K. hansenii* celma B-22 BC sintēze uz glikozes barotnes bija būtiski augstāka nekā uz fruktozes barotnes. Vislielākā BC sintēze tika sasniegta *K. rhaeticus* P-1463 celmam uz HS 40 g/L glikozes barotnes (2,57 ± 0,14).



6. attēls. BC sintēze *K. rhaeticus* P-1463 un *K. hansenii* B-22 celmiem atkarībā no izmantotas barotnes (fruktozes vai glikozes barotne ar 20 vai 40 g/L koncentrāciju).



7. attēls. BC sintēze *K. rhaeticus* P-1463 un *K. hansenii* B-22 celmiem atkarībā no izmantotas barotnes (fruktozes vai glikozes barotne ar 20 vai 40 g/L koncentrāciju).

Tabula 5.

Eksperimenti vidējā tilpumā, īslaicīgi (250-ml fermentācijas barotni, 5 dienas); inokulāts tika kultivēta modificētā HS barotnē, kas satur 10 g/L glikozes. Iesniegtie dati ir vidējais piecu eksperimentu skaits, kas veikts ar trīs līdz sešiem atkārtojumiem.

Celms	**C avots**	**S_0, g/L**	**Gala pH**	**ΔS, g/L**	**BC, g/L**	**$Y_{BC/\Delta S}$, %**
P-	Glikoze	20	5,3 ± 0,02	13,1 ± 0,50	1,83 ± 0,07	13,96 ± 0,73

1463		40	5,5 ± 0,03	25,61 ± 0,42	2,57 ± 0,14	10,03 ± 0,66
	Fruktoze	20	3,5 ± 0,02	14,4 ± 0,62	1,81 ± 0,05	12,6 ± 0,75
		40	3,2 ± 0,04	34,2 ± 0,64	1,36 ± 0,04	3,97 ± 0,32
B-22	Glikoze	20	6,2 ± 0,05	12,0 ± 0,48	1,66 ± 0,08	15,1 ± 1,07
		40	5,4 ± 0,02	22,7 ± 1,15	1,57 ± 0,06	7,5 ± 0,6
	Fruktoze	20	3,8 ± 0,03	15,6 ± 0,53	1,6 ± 0,08	10,1 ± 0,69
		40	3,2 ± 0,04	31,6 ± 0,85	0,99 ± 0,05	3,0 ± 0,19

Attiecībā uz barotni, kas satur 40 g/L fruktozes, rezultāti bija atšķirīgi, atklājot ne tikai nelielu BC sintēzes samazināšanos pētāmiem celmiem, bet arī ievērojamu BC iznākuma no substrāta samazināšanos (P-1463 celmam – 3,97 ± 0,32 % un B-22 – 3 ± 0,19 %), salīdzinot ar 20 g/L fruktozes barotnes vērtībām (12,6 un 10,1 % attiecīgi). Visos turpmākajos fermentācijas eksperimentos tika nolemts izmantot HS fermentācijas barotni, kas satur sākotnējo glikozes koncentrāciju 20 g/L dēļ vislielākā BC iznākuma no iztērēta substrāta.

Iepriekšējo eksperimentu rezultāti liecina, ka *K. rhaeticus* P-1463 līdzīgos kultivācijas apstākļos sintezēja vairāk BC nekā *K. hanseni* B22. Tas ir saistīts ar to, ka mikroorganismiem var atšķirties metabolisma ceļi un noteiktu enzīmu sintēzes un iedarbības intensitāte un gēnoms.

Secinājumi

Abi celmi ir spējīgi efektīvi ražot BC, izmantojot gan glikozi, gan fruktozi 20 g/L koncentrācijā. Par optimālo koncentrāciju BC sintēzei tiek uzskatīta 20 g/L glikozes koncentrācija.

KOMAGATAEIBACTER XYLINUS DSM 6513T, *KOMAGATAEIBACTER HANSENII* DSM 5602T UN *KOMAGATOEIBACTER RHAETICUS* P-1463 DAŽĀDU C AVOTU IZMANTOŠANAS SPĒJA

Materiāli un metodes

Izmantotie celmi:

- *Komagataeibacter xylinus* DSM 6513T;
- *Komagataeibacter hansenii* DSM 5602;
- *Komagatoeibacter rhaeticus* P-1463,

Modificēta HS barotne, BC sintēzei:

Turpinot pētījumus par etiķskābo baktēriju kultivācijas apstākļiem, standarta HS barotne tika modificēta, izmantojot fruktozi un saharozi 20 g/L koncentrācijā.

6. tabula

Modificēta HS barotne ar fruktozi un saharozi (20 g/L koncentrācijā).

Reaģents	Daudzums, g/L
Fruktoze/saharoze	20
Peptons	5
Rauga ekstrakts	5
Na_2HPO_4	2,7
$C_6H_8O_7$	1,5
$MgSO_4$,	0,2

Inokulāta sagatavošana un mikroorganismu kultivācija

Komagatoeibacter hansenii B-22, *Komagataeibacter xylinus* DSM 6513T, *Komagataeibacter hansenii* DSM 5602T un *Komagatoeibacter rhaeticus* P 1463 inokulāts tika pagatavots, izmantojot 100 mL HS barotni. Kultivēšana notika +30°C temperatūrā 48 h. Eksperimenta kultivācijas laiks – 5 dienas. Mikroorganismu kultivācijas notika 500 mL kolbās 150 mL barotnē.

Cukuru daudzuma noteikšana

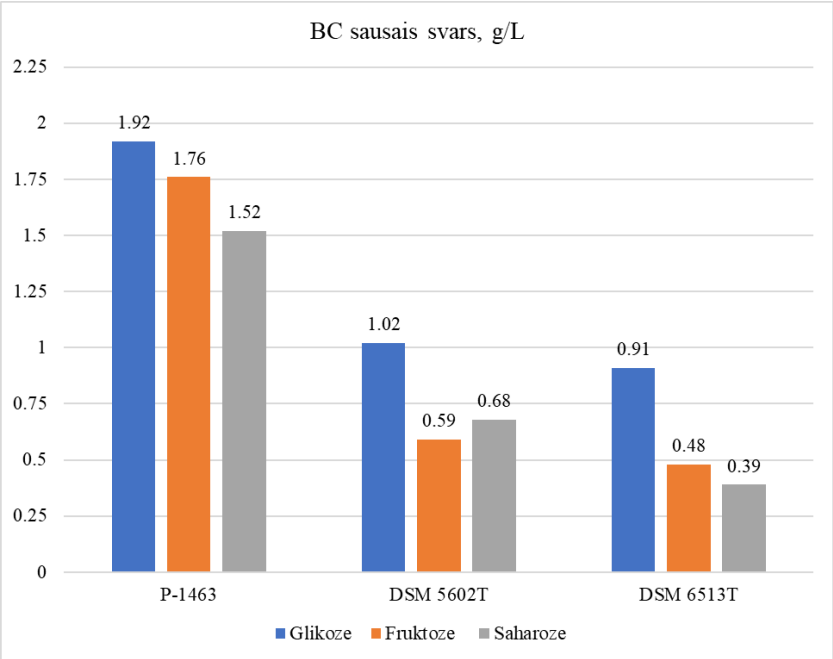
Cukuru koncentrācijas tika noteiktas, izmantojot komerciāli pieejamus reaģentu komplektus (K-SURFG un Megazyme Co, Wicklow, Īrija), sekojot ražotāja instrukcijām.

BC attīrīšana un masas noteikšana

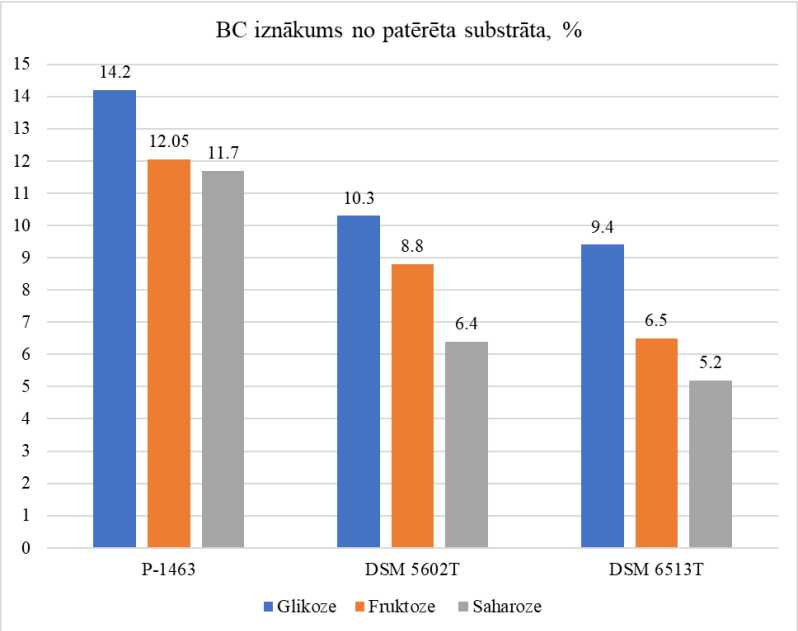
Sintezētu BC iegremdē 1 M NaOH temperatūrā +60°C 90 min, lai attīrītu BC plēvi no šūnām. Vēlāk BC tika mazgāta destilētā ūdenī un žāvēta 24 h +50°C temperatūrā. Pēc žāvēšanas tika noteikta BC plēves sausā masa.

Rezultāti

Šajā eksperimentā tika ņemti papildus BC producenti un salīdzināti ar *K. rhaeticus* P-1463 celmu, ka arī tika papildus modificēta barotne (ar fruktozi un saharozi). Eksperimenta laikā iegūtie rezultāti bija apkopoti 8. un 9. attēlā.



8. attēls. BC sintēze (sausais svars), izmantojot *K. rhaeticus* P-1463, *K. xylinus* DSM 6513T un *K. hansenii* DSM 5602T) pēc 5 dienām kultivēšanas standartā HS un modificētajā HS barotnē (fruktoze, saharoze).



9. attēls. BC iznākums no patērēta substrāta, izmantojot *K. rhaeticus* P-1463, *K. xylinus* DSM 6513T un *K. hansenii* DSM 5602T) pēc 5 dienām kultivēšanas standartā HS un modificētajā HS barotnē (fruktoze, saharoze).

Šajā pētījumā tika parādīts, ka *K. rhaeticus* celms P-1463 sintezē būtiski vairāk ($p < 0{,}001$) BC no glikozes, fruktozes un saharozes nekā citi celmi. Modificētajā HS saharozes un fruktozes barotnē, BC sintēze bija būtiski mazāka visiem celmiem. Vismazākā BC sintēze tika novērota saharozes barotnē, it īpaši *K. xylinus* DSM 6513T un *K. hansenii* DSM 5602T celmiem (0,48 un 0,39 g/L attiecīgi).

BC iznākums no patērēta substrāta ir līdzīgs BC sintēzei. *K. xylinus* DSM 6513T un *K. hansenii* DSM 5602T celmiem iznākums ir zemāks par *K. rhaeticus* P-1463 celma iznākumu uz visiem pētāmiem substrātiem.

Iepriekš ziņots par *K. hanseni* DSM 5602T celms nespēj efektīvi metabolizēt saharozi un izmantot to BC sintēzei (Cleenwerck et al. 2009). Iespējams, ka vairākiem etiķskābo baktēriju celmiem ir zema spēja metabolizēt saharozi, jo baktērija nevar transportēt saharozi caur šūnu membrānu, un pirms lietošanas (Velasco-Bedran un Lopez-Isunza 2007) tas ir jāhidrolizē līdz glikozei un fruktozei.

Secinājumi

K. rhaeticus P-1463 ir spējīgs efektīvi sintezēt BC, izmantojot dažādus oglekļa avotus (glikoze, fruktoze, saharoze). *K. rhaeticus* P-1463 sintezē BC labāk nekā *K. xylinus* DSM 6513T un *K. hansenii* DSM 5602T. Tālākajos eksperimentos tiks plašāk pētīts *K. rhaeticus* P-1463.

Informācijas avoti

Cleenwerck I, De Wachter M, González A, De Vuyst L, De Vos P (2009) Differentiation of species of the family of Acetobacteriaceae by AFLP DNA fingerprinting: Gluconacetobacter kombuchae is a later heterotypic synonym of Gluconacetobacter hansenii. IntJ Syst Evol Microbiol 59:1771–1786.

Velasco-Bedran H, Lopez-Isunza F (2007) The unified metabolism of Gluconacetobacter entanii in continuous and batch processes. Proc Biochem 42:1180–1190.

BAKTERIĀLAS CELULOZES SINTĒZE AR *KOMAGATOEIBACTER HANSENII* B-22 *UN KOMAGATOEIBACTER RHAETICUS* P-1463 BAROTNĒ, KAS SATUR SŪKALAS

Materiāli un metodes

Izmantotie celmi:

- *Komagatoeibacter hansenii* B-22;
- *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463.

Inokuāta sagatavošana un baktēriju kultivācija

K. hanseni B22, *K. rhaeticus* P-1463 inokulāti tika pagatavoti, izmantojot 100 ml HS barotni. Kultivēšana notika +30°C temperatūrā 48 h. Kultivācijas notika 500 ml kolbās, pievienojot 250 mL HS vai sūkalu barotnes un 5% inokulata. Kultivācijas laiks – 7 dienas. Atkārtojumu skaits – 7.

Sūkalu barotnes sagatavošana

Siera sūkalas tika vārītas +60°C 20 min, lai proteīns izgulsnētos. Tad šķīdums tika izlaists cauri filtrpapīram. Tad barotne tika sterilizēta atbilstoši standarta sterilizācijas procedūrai.

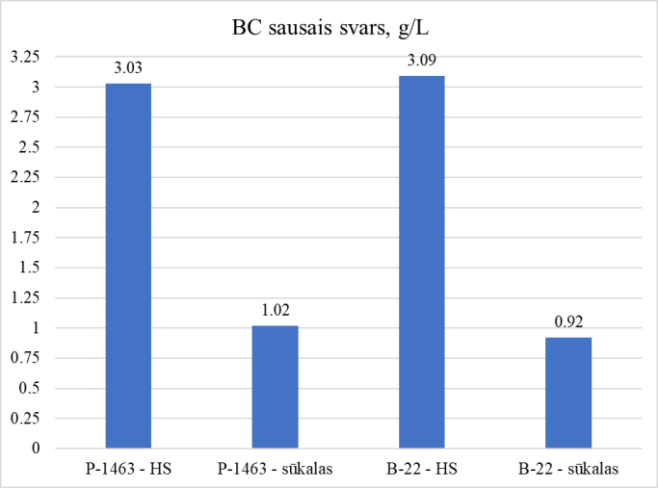
Cukuru analīze

Cukuru koncentrācijas analīzes tika veiktas, izmantojot:

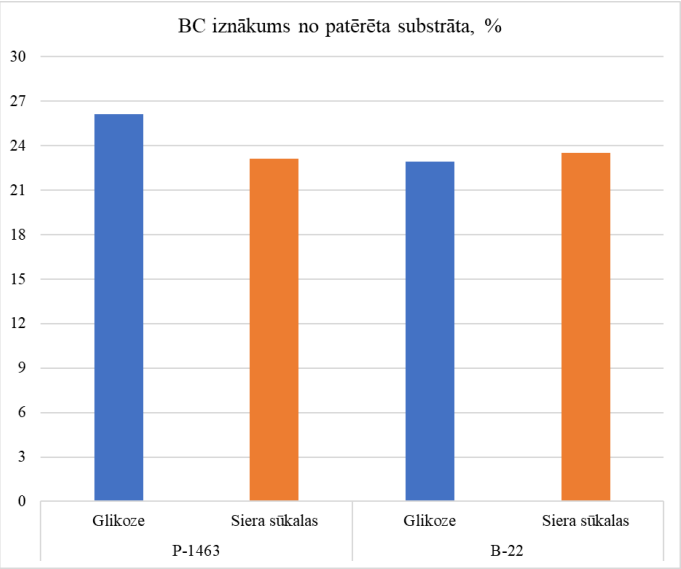
- Glikozes koncentrācija tika noteikta D-glucose assay procedure K-GLUC 08/18 (GOPOD-format, Megazyme, Īrija);
- Laktozes un galaktozes koncentācijas tika noteiktas, izmantojot ENRK pēc – Lactose & D-galactose (Rapid) assay procedure K-LACGAR 03/20 (Megazyme, Īrija).

Rezultāti

Turpmākas izpētes mērķis bija noteikt pētāmo celmu spēju sintezēt BC, izmantojot siera sūkalas ka substrātu. Iegūti dati ir attēloti 10. un 11. attēlā un 7. tabulā.



10. attēls. BC sintēze standartā HS barotnē un sūkalās, izmantojot *K. hansenii* B-22 un *K. rhaeticus* P-1463 celmus.



11. attēls. BC iznākums no patērēta substrāta standartā HS barotnē un sūkalās, izmantojot *K. hansenii* B-22 un *K. rhaeticus* P-1463 celmus.

7. tabula

BC sintēze un iznākums no patērēta substrāta atkarība no C avota: glikoze vai sūkalas – *K. hansenii* B-22 un *K.rhaeticus* P-1463 celmiem.

Celms	**C avots**	**Final pH**	**ΔS g/L**	**BC, g/L**	**$Y_{BC/\Delta S}$, %**
P-1463	Glikoze	3,91 ± 0,05	18,4 ± 0,31	3,03 ± 0,09	26,11 ± 0,94
	Siera sūkalas	5,06 ± 0,1	4,43 ± 0,72	1,02 ± 0,13	23,1 ± 0,91
B-22	Glikoze	3,87 ± 0,09	15,12 ± 0,8	3,09 ± 0,18	22,90 ± 1,2
	Siera sūkalas	5,15 ± 0,08	3,92 ± 0,64	0,92 ± 0,15	23,5 ± 1,21

Balstoties uz iegūtiem datiem var secināt, ka abi celmi bija spējīgi sintezēt BC, izmantojot gan HS barotni ar glikozi, gan siera sūkalas. Var redzēt, ka uz standarta HS barotnes ar glikozi BC sintēze *K. hansenii* B-22 un *K. rhaeticus* P-1463 celmiem ir lielāka (3,03 ± 0,09 g/L un 3,09 ± 0,18 g/L) nekā uz apstrādātas sūkalu barotnes (1,02 ± 0,13 g/L un 0,92 ± 0,15 g/L attiecīgi). Savukārt, BC iznākums no patērēta substrāta ir līdzīgs abām barotnēm. Tas var būt saistīts ar zemo substrāta patēriņu sūkalu barotnē.

Tomēr, šajā pētījumā tika paradīts, ka siera sūkalas var tikt izmantotas ka substrāts BC iegūšanai. BC sintēze šajā eksperimentā bija uz ~70% lielāka nekā iepriekšējos eksperimentos. Tas var būt saistīts gan ar pētāmo celmu spēju metabolizēt laktozi un galaktozi (galvenie C avoti sūkalās), ka arī ar sūkalu pirmsapstrādes procedūras uzlabošanu. Pašlaik ir nepieciešama sūkalu barotnes pirmsapstrādes tālāka optimizācija.

Secinājumi

K. hansenii B-22 un *K. rhaeticus* P-1463 celmi ir spējīgi sintezēt BC, izmantojot gan standarta HS glikozi, gan siera sūkalas kā substrātu. Ir nepieciešama detalizētāka sūkalu pirmsapstrādes izpēte, lai palielinātu BC sintēzi.

***Komagataeibacter rhaeticus* P-1463 kultivācija un BC sintēze nemodificētajā melases barotnē**

Materiāli un metodes

Izmantotais celms: *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463

Melases barotne

Līdzīgi sūkalām melase var kalpot kā alternatīvs substrāts baktēriju audzēšanai. Cukurbiešu melase tika saņemta no SIA Latvijas Lauku Serviss un ir raksturojama ar šādiem rādītājiem: kopēja sausna, 80%; saharoze, 47,3%; proteīni, 6,2%; pelni 16,62%; kopējas minerālvielas 1,9 g/100 g; pH 8,3.

Eksperimenta ietvaros tika pagatavota melases barotne ar 25 mL/L melases koncentrāciju. Melases barotnes sagatavošana:

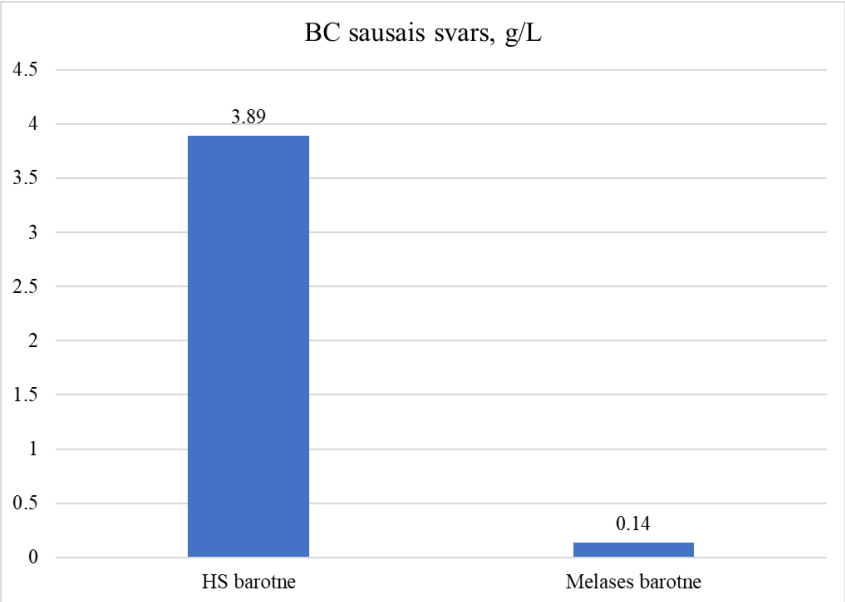
1. Ar pipeti paņem 25 mL melases un ievieto vārglāzē;
2. Melasei pievieno dH_2O līdz 1 L;
3. Šķīdumu pārnes durāna stikla pudelē un ieliec autoklāvā;
4. Sterilizē autoklāvā 45 min 121°C 1,2 atm;
5. Pēc sterilizācijas ļauj melases barotnes atdzesēties.

Inokulāta sagatavošana un kultivācija melases barotnē

Komagatoeibacter rhaeticus P-1463 inokulāts tika pagatavots, izmantojot 100 mL HS barotni. Kultivēšana notika +30°C temperatūrā 48 h. Eksperimenta kultivācijas laiks – 7 dienas. Mikroorganismu kultivācijas notika 500 mL kolbās 150 mL standarta HS vai melases barotnē. Atkārtojumu skaits – 7.

Rezultāti

Eksperimenta ietvaros iegūtie rezultāti ir apkopoti 12. attēlā. un 8. tabulā. Papildus BC sintēzei tika pārbaudīts saharozes patēriņš melases barotnē eksperimenta laikā.



12. attēls. BC sintēze standartā HS barotnē un sūkalās, izmantojot *K. hansenii* B-22 un *K. rhaeticus* P-1463 celmus.

8. tabula

BC sintēze un iznākums no patērēta substrāta *K.rhaeticus* P-1463 celmam atkarība no C avota: stanfdarta HS baortne ar glikozi vai melases barotne.

Barotne	C avots	ΔS g/L	BC, g/L	$Y_{BC/\Delta S}$, %
HS	Glikoze	19,21 ± 0,28	3,89 ± 0,06	20,25
Melase	Saharoze fruktoze	8,92 ± 1,05	0,14 ± 0,04	1.5

Rezultāti liecina, ka BC sintēze nemodificētajā melases barotnē ir būtiski mazāka ($p < 0,001$; ANOVA metode) nekā standartā HS barotnē. Melases barotnē BC sausais svars bija 0,14 ± 0,04 g/L. Līdzīgi rezultāti bija neapstrādātajā sūkalu barotnē (0,12 g/L). Savukārt, sūkalu pirmsapstrādes optimizācijas rezultātā izdevās būtiski palielināt BC sintēzi. Līdzīgā veidā ir nepieciešams optimizēt melases barotni, lai uzlabotu BC sintēzi.

Ir zināms, ka melases ir zema N (slāpekļa) koncentrācija. Tālākajos eksperimentos ir nepieciešams palielināt N daudzumu barotnē, lai nodrošinātu baktērijas ar nepieciešamām komponentēm augšanai un BC sintēzei.

BC sintēzi melases barotnē var ietekmēt arī melases koncentrācija. Tālākajos eksperimentos ir nepieciešams noteikt optimālu melases koncentrāciju BC sintēzei.

Secinājumi

BC sintēze K. rhaeticus P-1463 celmam melases barotnē ir būtiski zemāka nekā standartā HS barotnē. Ir nepieciešama tālāka melases barotnes optimizācija. Ir nepieciešams atrast optimālu melases koncentrāciju un N avotu.

KOMAGATAEIBACTER HANSENII B-22 KULTIVĀCIJA UN BC SINTĒZE NEMODIFICĒTAJĀ MELASES BAROTNĒ

Materiāli un metodes

Izmantotais celms: *Komagataeibacter hansenii* B-22

Melases barotne

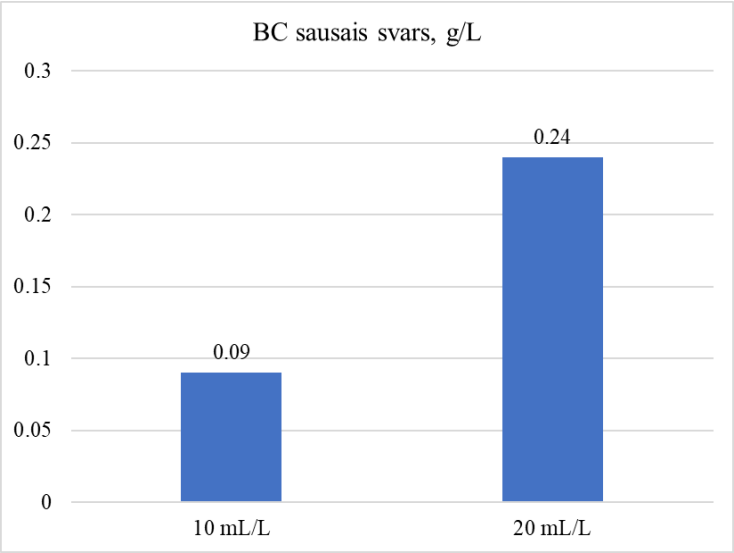
Melases barotnes sagatavošanai tika izmantota metodika, kas aprakstīta iepriekšejā eksperimentā. Darbam bija izmantota melases barotne ar 10 mL/L un 20 mL/L melases koncentrāciju, lai pārbaudītu koncentrācijas ietekmi uz BC sintēzi.

Inokulāta sagatavošana

Komagataeibacter hansenii B-22 inokulāts tika pagatavots, izmantojot 100 mL HS barotni. Kultivēšana notika +30°C temperatūrā 48 h. Eksperimenta kultivācijas laiks – 10 dienas. Mikroorganismu kultivācijas notika 250 mL kolbās 75 mL melases barotnē. Atkārtojumu skaits – 7.

Rezultāti

Eksperimenta ietvaros tika pārbaudīta *K. hansenii* B-22 celma spēja sintezēt BC uz melases barotnes divās dažādās koncentrācijās. Iegūtie rezultāti tika apkopoti 14. attēlā.



14. attēls. BC sintēze (*K. hansenii* B-22 celms) uz melases barotnese 10 mL/L un 20 mL/L melases koncentrācijā.

Baltoties uz rezultātiem, *K. hansenii* B-22 celmam optimālāka koncentrācija BC sintēzei ir 20 mL/L melases neviss 10 mL/L. Melases barotne var kalpot ka BC sintēzes avots *K. hansenii* B-22 celmam. Tālākajos eksperimentos ir nepieciešams palielināt testējamo koncentrāciju daudzumu, jo BC iespējami var būt lielāka ar melases koncentrāciju >20 mL/L.

Salīdzinot ar *K. rhaeticus* P-1463 celmu, var redzēt, ka BC sintēze bija būtiski lielāka ($p>0,001$) *K. hansenii* B-22 celmam. Tomēr tā joprojām paliek niecīga salīdzinājumā ar standartu HS barotni (>3,5 g/L). Tālākajos eksperimentos ir nepieciešams pārbaudīt melases priekšapstrādes procedūras tajā skaitā piedevu pievienošanu. BC sintēzi var ietekmēt ne tikai N trūkums barotnē, bet arī citu makro vai mikroelementu, ka arī vitamīnu trūkums.

Cukuru (saharoze, fruktoze) patēriņš ir apkopoti 9. tabulā. Dati ir līdzīgi *K. rhaeticus* P-1463 celma rezultātiem. 10 mL/L barotnē cukuru kopējais daudzums ekperimenta sākumā bija 11,4 g/L un 20 mL/L barotnē – 21,53 g/L.

9. tabula

BC sitnēze un iznākums no pātērēta substrāta K. hansenii B-22 celmam atkarībā no melases barotnes koncentrācijas (10 mL/L, 20 mL/L).

Koncentrācija, mL/L	**ΔS g/L**	**BC, g/L**	**$Y_{BC/\Delta S}$, %**
10	3,92 ± 0,63	0,09 ± 0,02	2,3
20	9,47 ± 0,79	0,24 ± 0,04	2,53

Secinājumi

K. hansenii B-22 celms ir spējīgs sintezēt BC uz melases barotnes. Lielāka BC sintēze tika novērota ar melases koncentrāciju 20 mL/L. Ir nepieciešams tālāka melases bartnes optimizācija.

LEVĀNA SINTĒZE UN OPTIMĀLO KULTIVĀCIJAS APSTĀKĻU ATLASE

Ievads

Levans ir dabiski sastopams fruktāns, kuru spēj sintezēt daudzas mikroorganismu sugas. Fruktuāni, tajā skaitā arī levāns, tiek sintezēti no saharozes, disaharīda cukura, kas sastāv no glikozes un fruktozes. Sintēzes procesā piedalās mikroorganismu fruktoziltransferāzes enzīmi, kas spēj veidot fruktānus no saharozes. Visbiežāk levāna sintēzei izmanto *Zymomonas, Acetobacter, Micobacterium Streptococcus, Bacillus Xanthomonas, Komagataeibacter* baktērijas, kas producē fruktānu eksopolisaharīda (EPS) formā.

Vēsturiski levāns tika izmantots tradicionālajā japāņu ēdienā *natto* gatavošanai. Galvenā levāna sintēzes baktēriju suga *natto* produktā ir *Bacillus subtilis,* kas sasniedz 49,4 g/L levāna sintēzi pēc 21 kultivācijas stundām. Kā viena no *natto* sastāvdaļām, levans jau sen ir piesaistījis pētnieku interesi, meklējot dabiskus produktus ar labumu veselībai. Levānam ir liels izmantošanas potenciāls medicinā, kur tas var tik pielietots brūču dzīšanai, holesterīna līmeņa samazināšanai, kā arī tas var tikt izmantots kā pret-iekaisuma līdzeklis vai kā prebiotiķis. Savukārt, levānu ir iespējams izmantot akvakultūrās, veicinot zivju imūnas sistēmas darbību, ka arī izmantot iepakojuma materiāla ražošanai. Fruktāniem ir plašs potenciāls pielietojums pārtikā kā funkcionālajam produktam.

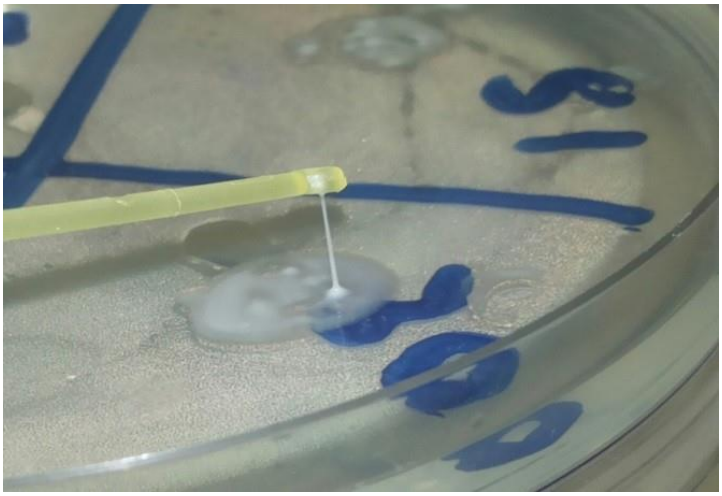
Levāna sintēze laboratorijas mērogos ir samērā vienkāršs process. Tomēr, pašlaik pastāv tikai daži realizēti projekti, kas ir saistīti ar levāna komercializāciju (ar samērā maziem biopolimēra ražošanas apjomiem). Galvenokārt tas ir saistīts ar augstām levāna ražošanas izmaksām, ka arī ražošanas procesam ir raksturīgi vairāki neoptimizēti posmi. Pašlaik ir nepieciešams turpināt levāna sintēzes pētījumus ar mērķi optimizēt ražošanas procesu, samazināt ražošanas izmaksas, tajā skaitā atlasīts lētus kultivācijas substrātus, un atlasīt efektīvākus levāna producentus.

Eksperimentu ietvaros tika izpētīta *Gluconobacter nephelii* P1464 spēja sintezēt levānu/fruktānus. Tika apskatīti un optimizēti levāna sintēzes apstākļi.

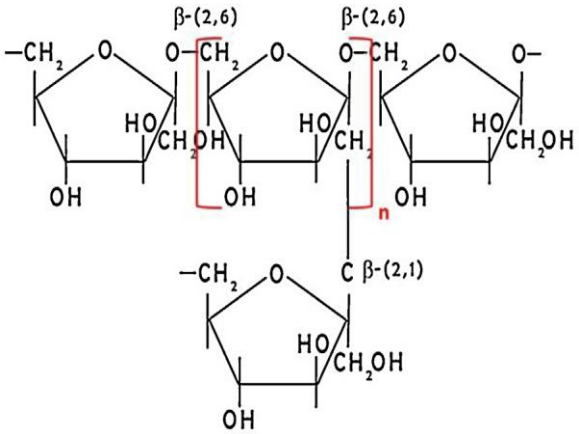
Dažādu parametru ietekme uz levāna sintēzi ar *Gluconobacter nephelii* P1464

Materiāli un metodes

Izmantotais celms: *Gluconobacter nephelii* P1464



1. attēls. *Gluconobacter nephelii* P1464 baktērijas augšana uz agarizētas HS barotnes laboratorijā. Ir iespējams novērot fruktānu sintēzi (balts gļotains eksopolishaharīds).



2. attēls. Levāna ķīmiskā struktūra (Abou-taleb et al. 2015).

HS barotnes sagatavošana

G. nephelii P1464 kultivēšanai tika izmantota etiķskābes baktēriju standarta HS barotne, kas tika modificēta ar saharozi.

1. tabula

HS/saharozes barotnes sastāvs

Reaģents	Daudzums, g/L
Saharoze	50
Peptons	5
Rauga ekstrakts	5
Na_2HPO_4	2,7
$MgSO_4$,	0,2
$C_6H_8O_7$	1,5

2. tabula

Agarizētas HS/saharozes barotnes sastāvs

Reaģents	Daudzums, g/L
Saharoze	50
Agars	15
Peptons	5
Rauga ekstrakts	5
Na_2HPO_4	2,7
$MgSO_4$,	0,2
$C_6H_8O_7$	1,5

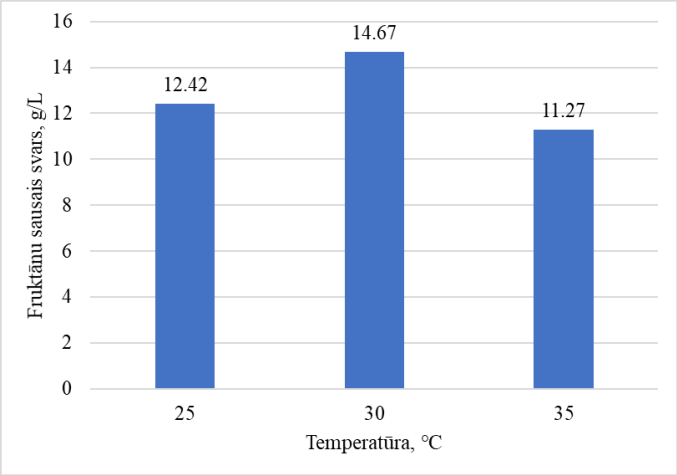
Inokulāta sagatavošana un baktēriju kultivācija

Inokulāts tika pagatavots, 500 mL koniskajā kolbā ar 200 mL HS barotnei pievienojot 10 mL pirmskultūras. Kolba tika ievietota kratītajā-inkubatorā uz 24 h, +30°C, 150 rpm. Mikroorganismu kultivācija notika statiski 100 HS barotnēs ar 5% inokulātu (250 mL koniskajās kolbās) termostatos +30°C 24 h.

Rezultāti

Temperatūras ietekme uz fruktānu sintēzi

Temperatūras ietekme uz fruktānu produkciju ir apkopota 3. attēlā. Šo procesu veica, inkubējot *Gluconobacter nephelii* P1464 atšķirīgā (25, 30, 35 °C) temperatūrā 24 stundu laikā. Pēc inkubācijas fruktāni tika izgulsnēti, izmantojot etanolu. Attiecībā uz katru temperatūru aprēķināja fruktānu sauso svaru.



3. attēls, Temperatūras ietekme uz fruktānu sintēzi *Gluconobacter nephelii* P1464. Baktēriju kultivācija veikta 25, 30, 35°C temperatūrā.

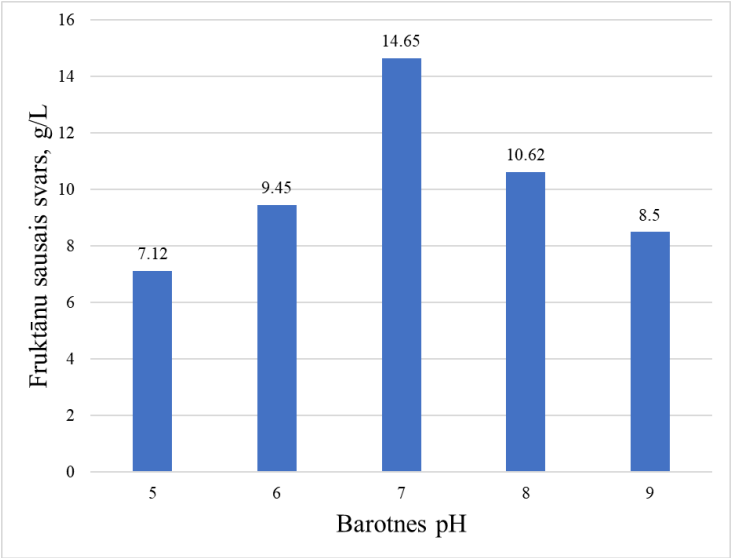
Var secināt, ka optimāla *Gluconobacter nephelii* P1464 kultivācijas temperatūra ir +30°C, kas sakrīt ar literatūras datiem par optimālām etiķskābes baktērijas kultivācijas temperatūrām. Šajā temperatūra tika sasniegta 14,67 g/L fruktānu sintēze. Kultivācija +25 un +35°C temperatūrā ir saistīta ar būtiski mazāku ($p<0,01$) fruktānu sintēzi (12,42 un 11,27 g/L attiecīgi).

Secinājumi

Optimāla *Gluconobacter nephelii* P1464 kultivācijas temperatūra ir +30°C, kas ļauj sasniegt 14.67 g/L levāna sintēzi. Tālākajos eksperimentos tika izmantota +30°C temperatūra.

pH ietekme uz fruktānu sintēzi

Barotnes pH ietekme uz fruktānu sintēzi ir paradīta 4. attēls. Pētot kultūras barotnes pH ietekmi uz fruktānu ražošanu, barotni koriģēja līdz pH = 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 vai 9,0. Barotni inkubēja +30°C temperatūrā ar 24 stundu inkubācijas laiku. Katram pH aprēķināja levāna sauso svaru.



4. attēls. pH ietekme uz fruktānu sauso svaru. Mērījumi veikti ar pH = 5, 6, 7, 8, 9.

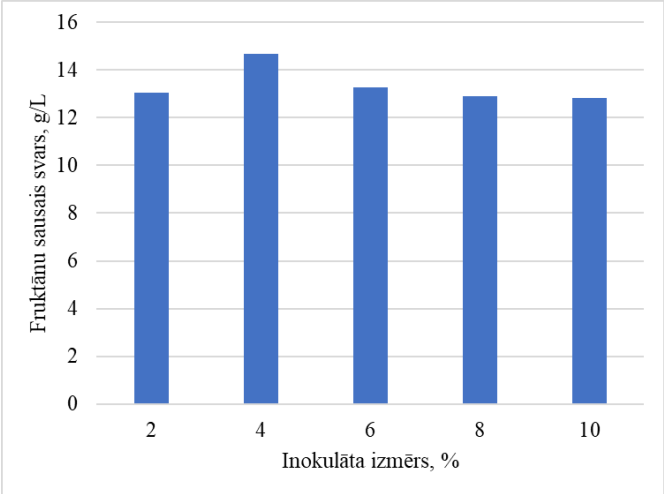
Rezultāti liecina, ka pH = 7 ir optimāla pH vērtība fruktānu sintēzei (14,65 g/L). Savukārt, augstākas un zemākas pH vērtības noved pie būtiski zemākas fruktānu sintēzes ($p<0,001$).

Secinājumi

Vislielākā levāna sintēze bija novērota pH = 7 (14,65 g/L). Tālākajos eksperimentos pH eksperimenta sākumā tika pieregulēts līdz pH = 7.

Inokulāta izmēra ietekme uz fruktānu sintēzi

Inokulāta lielums potenciāli var ietekmēt EPS sintēzi. Eksperimenta rezultāti ir apkopoti 5. attēlā. Perējumā ietvaros tika apskatīts 2, 4, 6, 8 un 10 % inokulāta lielums.



5. attēls. Inokulāta izmēra ietekme uz fruktānu sintēzi ar *Gluconobacter nephelii* P1464.

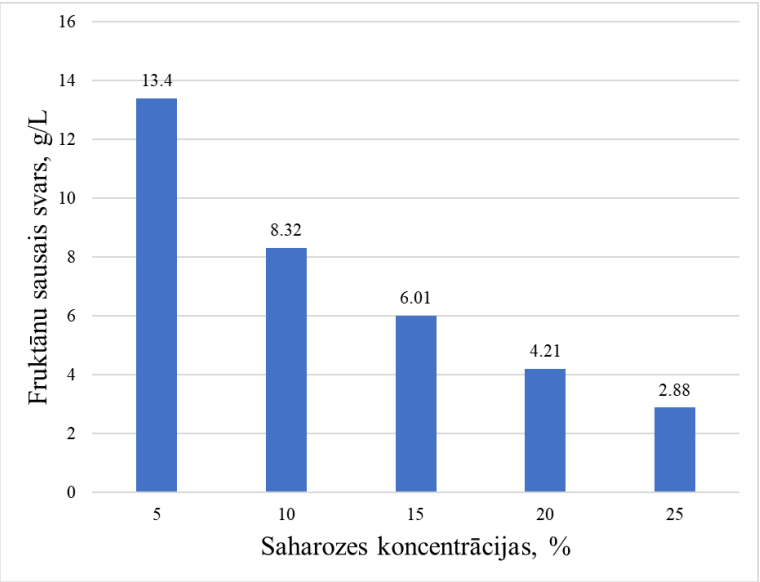
Rezultāti liecina, ka 4% inokulāta izmērs ir optimālākais fruktānu sintēzei (13,95 g/L). Starp inokulāta izmēriem 2, 6, 8 un 10 % nebija novērota būtiskā atšķirība ($p>0,05$).

Secinājumi

Optimālais inokulāta izmērs ir 4% no kopēja barotnes tilpuma. Tālākajos eksperimentos tika izmantots 4% inokulāts.

Saharozes koncentrācijas ietekme uz fruktānu sintēzi

Lai noteiktu piemērotāku saharozes koncentrāciju levāna ražošanai, barotni inokulēja ar dažādu saharozes koncentrāciju (10, 20, 30, 40, 50)%, barotnes pH koriģēja līdz piemērotākām pH = 7, kas bija noteikts iepriekšējā eksperimentā. Inkubācija notika 30°C temperatūrā. Inokulata daudzums bija 4%. Nogulšņu daudzumu aprēķināja, izmantojot auksto etanolu.



6. attēls. Fruktānu sintēze atkarībā no saharozes koncentrācijas barotnē.

Rezultāti liecina, ka optimālu levāna sintēzi 24 stundu laikā nodrošina 50 g/L saharozes koncentrācija (13,4 g/L). Saharozes koncentrācijai pieaugot, būtiski ($p<0,001$) samazinās fruktānu sintēze.

Secinājumi

Saharozes koncentrācijas būtiski ietekmē fruktānu sintēzi. Optimālā saharozes koncentrācija 24 h kultivācijai ir 50 g/L.

Apkopojot iepriekšējus eksperimentus, var secināt, ka fruktānu iegūšanai ar *Gluconobacter nephelii* P1464 ir nepieciešami sekojošie apstākļi: +30°C temperatūra, pH = 7, 4% inokulāta daudzums un 50 g/L saharozes koncentrācija.

MELASES IZMANTOŠANA FRUKTĀNU IEGŪSANAIS AR *GLUCONOBACTER NEPHELII P1464*

Materiāli un metodes

Izmantotais celms: *Gluconobacter nephelii* P1464

Melases barotnes sagatavošana

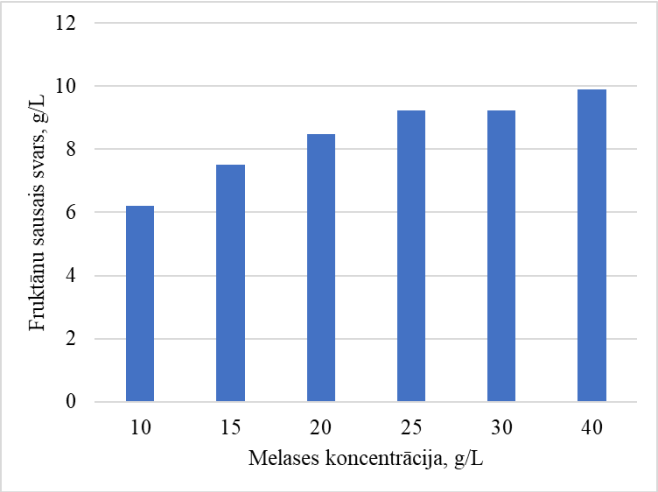
Eksperimentos tika izmantota cukurbiešu melase ar sekojošu sastāvu: kopēja sausna, 80%; saharoze, 47,3%; proteīni, 6,2%; pelni 16,62%; kopējas minerālvielas 1,9 g/100 g; pH 8,3.

Barotnes gatavošana:

1. Ar seroloģisko pipeti paņem 10, 15, 20, 25, 30 un 40 mL melases attiecīgi;
2. Melasi pārnes uz vārglāzi (katra koncentrācija atbilstošā vārglāzē);
3. Melasi šķīdina destilētā ūdenī. Ūdeni piepildot līdz 1 L atzīmei mērcilindrā un pārnes uz vārglāzi;
4. Izšķīdināto melasi pārnes durāna stikla pudelēs;
5. Pudeles ar barotnēm autoklāvē 121°C 30 min.

Rezultāti

Eksperimenta rezultāti tika apkopoti 7. attēlā.



7. attēls. Melases koncentrācijas ietekme uz *Gluconobacter nephelii* P1464 fruktānu sintēzi.

Balstoties uz iegūtiem datiem, var secināt, ka pieaugot melases koncentrācijai barotnē, pieaug fruktāna koncentrācija. Vislielākā fruktānu sintēze bija novērota ar 40 mL/L melases koncentrāciju (9,89 g/L). Melase ir alternatīvs kultivācijas substrāts, kura izmantošana ļautu būtiski samazināt levāna ražošanas izmaksts. Tomēr uz doto brīdi fruktānu sintēze uz melases barotnes ir mazāka nekā uz standarta HS barotnes.

Secinājumi

Melases izmantošana ir saistīta ar būtiski mazāku fruktānu sintēzi, salīdzinot ar standartu HS/saharozes barotni. Optimālā melases koncentrācija fruktānu sintēzei ir 40 mL/L. Ir nepieciešama tālāka melases barotnes optimizācija.

Datu statistiskā apstrāde

Datu statistiskā analīze un attēlu veidošana tika veikta, izmantojot JASP (JASP Team, 2020; JASP (Version 0.14.1)) un SPSS (BM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0.) datu analīzes programmas. Statistiskai analīzei tika izmantota ANOVA un t-tests pie būtiskuma līmeņa p = 0,05.

Bakteriālas celulozes producentu efektivitātes novērtējums sūkalu barotnēs

ANOVA tests

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	η²
Celms	9.977	2	4.988	**536.949**	< .001	0.333
Barotne	15.456	1	15.456	**1663.647**	< .001	0.516
Celms ✻ Barotne	4.276	2	2.138	**230.115**	< .001	0.143
Residuals	0.223	24	0.009			

Note. Type III Sum of Squares

Aprakstoša statistika - Masa, g/L

Celms	Barotne	Mean	SD	N
1	1	3.323	0.041	5
	2	1.952	0.154	5
2	1	3.755	0.066	5
	2	1.364	0.058	5
3	1	1.650	0.122	5
	2	1.104	0.087	5

Levenesa tests

F	df1	df2	p
3.104	5.000	24.000	0.027

Post Hoc salīdzinājums - Celms ✻ Barotne

		Mean Difference	SE	t	p_{tukey}	p_{bonf}
1, 1	2, 1	-0.432	0.061	-7.093	< .001	< .001
	3, 1	1.673	0.061	27.444	< .001	< .001
	1, 2	1.370	0.061	22.477	< .001	< .001

Post Hoc salīdzinājums - Celms ✻ Barotne

		Mean Difference	SE	t	p_{tukey}	p_{bonf}
	2, 2	1.959	0.061	32.133	< .001	< .001
	3, 2	2.218	0.061	36.388	< .001	< .001
2, 1	3, 1	2.105	0.061	34.538	< .001	< .001
	1, 2	1.803	0.061	29.570	< .001	< .001
	2, 2	2.391	0.061	39.226	< .001	< .001
	3, 2	2.651	0.061	43.481	< .001	< .001
3, 1	1, 2	-0.303	0.061	-4.967	< .001	< .001
	2, 2	0.286	0.061	4.688	0.001	0.001
	3, 2	0.545	0.061	8.944	< .001	< .001
1, 2	2, 2	0.589	0.061	9.656	< .001	< .001
	3, 2	0.848	0.061	13.911	< .001	< .001
2, 2	3, 2	0.259	0.061	4.255	0.003	0.004

Note. P-value adjusted for comparing a family of 6

Aprakstoša statistika

	Masa, g/L	
	1	**2**
Valid	15	15
Missing	0	0
Mean	2.909	1.474
Std. Deviation	0.943	0.381
Shapiro-Wilk	0.776	0.900
P-value of Shapiro-Wilk	0.002	0.097
Minimum	1.448	1.020
Maximum	3.850	2.160

Sūkalu kā bakteriālas celulozes substrāta efektivitātes novērtējums

ANOVA tests

ANOVA - Masa, g/L

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	η^2
Barotne	11.340	2	5.670	**2295.300**	**< .001**	**0.997**
Residuals	0.037	15	0.002			

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives - Masa, g/L

Barotne	Mean	SD	N
1	3.262	0.062	6
2	1.321	0.037	6
3	2.389	0.048	6

Assumption Checks

Test for Equality of Variances (Levene's)

F	df1	df2	p
0.776	**2.000**	**15.000**	**0.478**

Post Hoc Comparisons - Barotne

		Mean Difference	SE	t	p_{bonf}
1	**2**	**1.941**	**0.029**	**67.641**	**< .001**
	3	**0.873**	**0.029**	**30.434**	**< .001**
2	**3**	**-1.068**	**0.029**	**-37.207**	**< .001**

Note. **P-value adjusted for comparing a family of 3**

Descriptive Statistics

Descriptive Statistics

	Masa, g/L		
	1	2	3
Valid	6	6	6
Missing	0	0	0
Mean	3.262	1.321	2.389
Std. Deviation	0.062	0.037	0.048
Shapiro-Wilk	0.968	0.905	0.890
P-value of Shapiro-Wilk	0.882	0.403	0.321
Minimum	3.186	1.280	2.340
Maximum	3.360	1.366	2.452

Metabolītu analīze

Case		Glikoze (HS)	Glikoze (Sūkalas)	Laktoze	Galaktoze	Manitols
.00	Mean	20.0352	.8759	49.9592	.4138	18.3057
	Std. Deviation	.23956	.05646	2.24069	.03956	.86421
5.00	Mean	.6474	.0399	48.5307	.0503	10.6733
	Std. Deviation	.10352	.00544	1.98115	.02447	3.09429
10.00	Mean	.1969	.0379	46.3500	.0114	3.3680
	Std. Deviation	.02940	.01771	.67462	.00609	.04807
Total	Mean	6.9598	.3179	48.2800	.1585	10.7823
	Std. Deviation	9.80933	.41955	2.19728	.19362	6.66523

Sūkalu koncentrācijas ietekme

ANOVA - Masa, g/L

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Atschkaidijumi	5.472	2	2.736	1116.297	< .001
Residuals	0.037	15	0.002		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - Masa, g/L

Atschkaidijumi	Mean	SD	N
1	1.676	0.045	6
2	0.565	0.050	6
3	0.456	0.053	6

Assumption Checks

Test for Equality of Variances (Levene's)

F	df1	df2	p
0.204	2.000	15.000	0.818

Post Hoc Tests

Post Hoc Comparisons - Koncentrācijas

		Mean Difference	SE	t	p_{bonf}
1	2	1.111	0.029	38.870	< .001
	3	1.220	0.029	42.701	< .001
2	3	0.110	0.029	3.831	0.005

Post Hoc Comparisons - Koncentrācijas

Mean Difference	SE	t	p_{bonf}

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3

Descriptive Statistics

Descriptive Statistics

	Masa, g/L		
	1	2	3
Valid	6	6	6
Missing	0	0	0
Mean	1.676	0.565	0.456
Std. Deviation	0.045	0.050	0.053
Shapiro-Wilk	0.971	0.941	0.904
P-value of Shapiro-Wilk	0.900	0.669	0.399
Minimum	1.607	0.490	0.402
Maximum	1.740	0.618	0.545

Termiskās apstrādes ietekme

ANOVA

ANOVA - Masa, g/L

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Varishana	1.985	3	0.662	1671.961	< .001
Residuals	0.008	20	3.957e -4		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - Masa, g/L

Varishana	Mean	SD	N
1	1.114	0.007	6
2	1.115	0.004	6
3	1.115	0.006	6
4	1.779	0.038	6

Assumption Checks

Test for Equality of Variances (Levene's)

F	df1	df2	p
6.142	3.000	20.000	0.004

Post Hoc Tests

Post Hoc Comparisons - Varishana

		Mean Difference	SE	t	Cohen's d	p_{bonf}
1	2	-1.000e -3	0.011	-0.087	-0.168	1.000
	3	-0.001	0.011	-0.102	-0.168	1.000
	4	-0.665	0.011	-57.889	-24.074	< .001
2	3	-1.667e -4	0.011	-0.015	-0.031	1.000
	4	-0.664	0.011	-57.802	-24.352	< .001
3	4	-0.664	0.011	-57.788	-24.141	< .001

Note. Cohen's d does not correct for multiple comparisons.

Note. P-value adjusted for comparing a family of 4

Descriptive Statistics

Descriptive Statistics

	Masa, g/L			
	1	2	3	4
Valid	6	6	6	6
Missing	0	0	0	0
Mean	1.114	1.115	1.115	1.779
Std. Deviation	0.007	0.004	0.006	0.038
Shapiro-Wilk	0.995	0.937	0.909	0.843
P-value of Shapiro-Wilk	0.998	0.638	0.430	0.139
Minimum	1.103	1.110	1.108	1.708
Maximum	1.124	1.120	1.124	1.812

Hidrolītiskās apstrādes ietekme

ANOVA tests

ANOVA - Masa, g/L

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Apstrade	48.958	4	12.239	13825.320	< .001

ANOVA - Masa, g/L

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Residuals	0.021	24	8.853e -4		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives - Masa, g/L

Apstrade	Mean	SD	N
1	3.700	0.035	6
2	1.613	0.026	7
3	2.415	0.038	6
4	0.271	0.023	5
5	0.173	0.020	5

Assumption Checks

Test for Equality of Variances (Levene's)

F	df1	df2	p
0.525	4.000	24.000	0.718

Post Hoc Tests

Standard

Post Hoc Comparisons - Apstrade

		Mean Difference	SE	t	Cohen's d	p_{bonf}
1	2	2.086	0.017	126.040	68.301	< .001
	3	1.285	0.017	74.784	34.944	< .001
	4	3.429	0.018	190.324	111.647	< .001
	5	3.527	0.018	195.741	119.414	< .001
2	3	-0.802	0.017	-48.433	-25.127	< .001
	4	1.343	0.017	77.065	54.041	< .001
	5	1.440	0.017	82.667	61.231	< .001
3	4	2.144	0.018	119.020	66.269	< .001
	5	2.242	0.018	124.437	71.765	< .001
4	5	0.098	0.019	5.187	4.503	< .001

Note. Cohen's d does not correct for multiple comparisons.

Note. P-value adjusted for comparing a family of 5

Descriptive Statistics

	Masa, g/L				
	1	2	3	4	5
Valid	6	7	6	5	5
Missing	0	0	0	0	0
Mean	3.700	1.613	2.415	0.271	0.173

Descriptive Statistics

	Masa, g/L				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Std. Deviation	0.035	0.026	0.038	0.023	0.020
Shapiro-Wilk	0.908	0.899	0.946	0.861	0.950
P-value of Shapiro-Wilk	0.424	0.324	0.712	0.230	0.737
Minimum	3.663	1.586	2.360	0.232	0.143
Maximum	3.761	1.651	2.476	0.292	0.194

Piedevu ietekme

ANOVA tests

ANOVA - Masa, g/L

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	η^2
Piedevas	13.883	5	2.777	2352.671	< .001	0.998
Residuals	0.032	27	0.001			

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives - Masa, g/L

Piedevas	Mean	SD	N
1	3.157	0.031	6
2	1.600	0.048	5
3	1.760	0.042	6
4	1.876	0.023	5
5	1.347	0.036	5
6	2.700	0.019	6

Assumption Checks

Test for Equality of Variances (Levene's)

F	df1	df2	p
1.220	5.000	27.000	0.327

Post Hoc Tests

Standard

Post Hoc Comparisons - Piedevas

		Mean Difference	SE	t	p_{bonf}
1	2	1.557	0.021	74.845	< .001
	3	1.397	0.020	70.435	< .001
	4	1.282	0.021	61.606	< .001
	5	1.810	0.021	87.027	< .001
	6	0.458	0.020	23.083	< .001
2	3	-0.160	0.021	-7.688	< .001
	4	-0.275	0.022	-12.675	< .001
	5	0.253	0.022	11.663	< .001
	6	-1.099	0.021	-52.836	< .001
3	4	-0.115	0.021	-5.551	< .001
	5	0.413	0.021	19.870	< .001
	6	-0.939	0.020	-47.352	< .001
4	5	0.529	0.022	24.338	< .001
	6	-0.824	0.021	-39.597	< .001
5	6	-1.353	0.021	-65.018	< .001

Post Hoc Comparisons - Piedevas

	Mean Difference	SE	t	p_{bonf}

Note. P-value adjusted for comparing a family of 6

Descriptive Statistics

Descriptive Statistics

	Masa, g/L					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Valid	6	5	6	5	5	6
Missing	0	0	0	0	0	0
Mean	3.157	1.600	1.760	1.876	1.347	2.700
Std. Deviation	0.031	0.048	0.042	0.023	0.036	0.019
Shapiro-Wilk	0.954	0.870	0.913	0.921	0.999	0.955
P-value of Shapiro-Wilk	0.775	0.267	0.455	0.535	1.000	0.777
Minimum	3.105	1.523	1.698	1.846	1.299	2.674
Maximum	3.193	1.641	1.804	1.900	1.395	2.730

Metabolītu analīzes vidējas vērtības un standartnovirzes

Bakteriālas celulozes producentu efektivitātes novērtējums sūkalu barotnēs

Report

Case		GlikozeP1463HS	GlikozeB22HS	GlikozeDSMHS	GlikozeP1463S	GlikozeB22S	GlikozeDSMS	LaktozeP1463	LaktozeB22	LaktozeDSM	GalaktozeP1463	GalaktozeB22	GalaktozeDSM	EtiķskābeP1463HS	EtiķskābeB22HS	EtiķskābeDSNHS	EtiķskābeP1463S	EtiķskābeB22S	EtiķskābeDSMS	GlikonskabeP1463HS	GlikonskābeB22HS	GlikonskābeDSMHS	GlikonskābeP1463S	GlikonskābeB22S	GlikonskābeDSMS	ProteīniP1463	ProteīniB22	ProteīniDSM
.00	Mean	20.9435	20.3640	21.3401	1.0230	.8514	1.0230	49.9750	46.7618	49.7640	.4208	.4171	.4426	.0790	.0730	.1020	.0590	.0590	.0795	.1060	.0995	.0850	.0514	.0895	.0800	3.2115	3.1215	3.2465
	Std. Deviation	.17317	.47092	.93883	.04101	.01497	.04101	.34507	.05763	.77923	.00636	.01280	.05574	.00424	.00707	.00424	.00707	.01414	.00354	.01414	.02051	.00707	.01181	.00354	.00566	.04031	.10112	.06576
5.00	Mean	.3030	.3815	.3495	.0245	.0125	.0245	48.2220	45.3975	49.9350	.0315	.0370	.0373	.2775	.4985	.1370	.0395	.0455	.0405	.5115	1.8600	.2110	.0860	.0255	.0470	3.1910	3.1150	3.2525
	Std. Deviation	.05374	.02333	.01344	.00636	.00071	.00636	.41012	.78560	.99561	.00495	.00884	.00679	.03041	.00919	.00707	.00212	.00636	.01202	.03182	.10324	.01414	.00990	.00212	.00707	.08485	.13435	.04313
10.00	Mean	.2143	.2023	.2614	.0345	.0106	.0345	45.6943	44.9261	49.1115	.0168	.0248	.0562	.3955	1.1230	.2160	.1180	.0765	.0105	1.1230	4.6805	1.1240	.1291	.1005	.1055	3.2435	3.1450	3.2520
	Std. Deviation	.00046	.01743	.01190	.01061	.00602	.01061	.05332	.11886	.16900	.00064	.00962	.00841	.01626	.06647	.01414	.00707	.00636	.00071	.02687	.21001	.00849	.00297	.01061	.01909	.05445	.00707	.03960
Total	Mean	7.1536	6.9826	7.3170	.3607	.2915	.3607	47.9638	45.6951	49.6035	.1564	.1596	.1787	.2507	.5648	.1517	.0722	.0603	.0435	.5802	2.2133	.4733	.0888	.0718	.0775	3.2153	3.1272	3.2503
	Std. Deviation	10.68196	10.36763	10.87045	.51342	.43375	.51342	1.93982	.92413	.69028	.20498	.19966	.20617	.14390	.47334	.05274	.03684	.01579	.03145	.45834	2.06955	.50721	.03554	.03658	.02788	.05402	.07658	.03949

Sūkalu kā bakteriālas celulozes substrāta efektivitātes novērtējums

Case		Glikoze (HS)	Glikoze (Sūkalas)	Laktoze	Galaktoze	Manitols	EtiķskābeHS	EtiķskābeSūkalas	Etiķskābe Manitols	GlikonskabeHS	GlikonskabeSukalas	GlikonskabeManitols	Proteīni
.00	Mean	20.0352	.8759	49.2926	.4138	18.9723	.0794	.1083	.1177	.1267	.1157	.1943	3.4014
	Std. Deviation	.23956	.05646	1.35459	.03956	.53372	.00950	.00764	.02542	.01986	.00451	.01155	.04987
5.00	Mean	.6474	.0399	47.8640	.0503	11.0067	.0420	.1180	.0170	.0846	.1031	.2120	3.4080
	Std. Deviation	.10352	.00544	.91084	.02447	.89198	.00755	.02512	.00700	.00563	.00680	.00173	.01929
10.00	Mean	.1969	.0379	46.0167	.0114	3.3680	.2799	.1413	.1130	1.5088	.1440	2.5300	3.3950
	Std. Deviation	.02940	.01771	.11156	.00609	.04807	.01053	.00681	.00557	.01289	.00557	.08833	.03081
Total	Mean	6.9598	.3179	47.7244	.1585	11.1157	.1338	.1226	.0826	.5734	.1209	.9788	3.4015
	Std. Deviation	9.80933	.41955	1.64084	.19362	6.77737	.11109	.01999	.05102	.70190	.01879	1.16429	.03136

Sūkalu koncentrācijas ietekme

Report

Case		LaktozeBez	Laktoze11	Laktoze12	GlikozeBez	Glikoze11	Glikoze12	GalaktozeBez	Galaktoze11	Galaktoze12	EtiķskāeBex	Etiķskāe11	Etiķskāe12	GlikonskāeBEz	Glikonskābe11	Glikonskābe12	ProteīniBez	Proteīni11	Proteīni12
.00	Mean	47.2497	26.0987	19.1177	.8844	.3719	.0694	.4104	.2129	.1803	.0593	.0463	.0473	.0512	.0407	.0347	3.1791	2.3087	1.4820
	Std. Deviation	.80198	.76639	1.08322	.01086	.06016	.00190	.01448	.00115	.01856	.00503	.00404	.00503	.00835	.01106	.01222	.10490	.05897	.03724
5.00	Mean	46.4857	24.9970	18.9920	.0280	.0300	.0487	.0276	.0260	.0842	.0403	.0417	.0207	.0850	.0873	.0550	3.1677	2.2810	1.4960
	Std. Deviation	.37167	.07275	.86097	.00529	.00917	.00252	.00188	.00265	.00786	.00208	.00231	.01701	.00721	.00551	.00265	.06264	.03439	.01637
10.00	Mean	44.6256	24.8393	17.8551	.0176	.0313	.0319	.0407	.0441	.0520	.1153	.0887	.0657	.1307	.0980	.0763	3.2230	2.2960	1.4410
	Std. Deviation	.19061	1.06606	1.74918	.02614	.00699	.00272	.04310	.04928	.05638	.00681	.00611	.00208	.00352	.00600	.01050	.15492	.00721	.01825
Total	Mean	46.1203	25.3117	18.6549	.3100	.1444	.0500	.1596	.0943	.1055	.0717	.0589	.0446	.0890	.0753	.0553	3.1899	2.2952	1.4730
	Std. Deviation	1.25324	.88620	1.26743	.43108	.17333	.01643	.18956	.09262	.06508	.03405	.02275	.02154	.03504	.02729	.01981	.10185	.03636	.03331

Termiskās apstrādes ietekme

Report

Case		Diena	Laktoze60	Laktoze80	Laktoze121	LaktozeSt	Glikoze60	Glikoze80	Glikoze121	GlikozeSt	Gaaktoze60	Galaktoze80	Galaktoze121	GalaktozeSt	Etiķskābe60	Etiķskābe80	Etiķskābe121	EtiķskābeSt	Glikonskābe60	Glikonskābe80	Glikonskābe121	GlikonskābeSt	Proteīni60	Proteīni80	Proteīni121	ProteīniSt
.00	Mean	.0000	49.2799	48.9775	50.5040	50.3380	.9985	.8775	.9390	1.0000	.5380	.4900	.4930	.5785	.0880	.1065	.1090	.1155	.1250	.1250	.1250	.1375	8.1120	7.5685	7.6981	3.1470
	Std. Deviation	.00000	1.32781	.07707	1.71968	.06223	.06576	.09122	.09051	.05940	.07778	.04384	.01556	.07142	.00566	.01909	.04384	.03323	.01273	.01273	.01273	.00919	.17253	.11102	.06208	.07778
5.00	Mean	5.0000	49.2470	49.4620	48.9750	48.1400	.1940	.0371	.0396	.0565	.0464	.0435	.0581	.0565	.1105	.0875	.0895	.0910	.0710	.0715	.0980	.0795	8.0275	7.5970	7.8915	3.0620
	Std. Deviation	.00000	1.47644	.76509	.10324	1.61362	.23335	.00361	.00226	.00354	.03239	.00778	.03550	.03182	.03041	.01768	.03041	.00283	.04525	.04455	.00849	.00919	.02475	.20506	.14071	.04525
10.00	Mean	10.0000	47.6365	47.7140	46.5630	46.6090	.0236	.0287	.0359	.0285	.0130	.0070	.0160	.0045	.1440	.1855	.1185	.1540	.1475	.1150	.1260	.1475	8.0061	7.5085	7.8278	3.1250
	Std. Deviation	.00000	.99631	2.37022	.74812	1.97848	.00580	.01881	.00014	.00778	.01273	.00283	.01838	.00212	.01131	.07849	.01909	.01273	.00778	.01556	.03394	.00636	.02560	.25951	.00672	.08485
Total	Mean	5.0000	48.7211	48.7178	48.6807	48.3623	.4054	.3144	.3382	.3617	.1991	.1802	.1890	.2132	.1142	.1265	.1057	.1202	.1145	.1038	.1163	.1215	8.0485	7.5580	7.8058	3.1113
	Std. Deviation	4.47214	1.30123	1.37601	1.96566	2.02858	.47818	.43817	.46716	.49534	.26566	.24138	.23698	.28609	.02919	.05940	.02858	.03258	.04112	.03354	.02189	.03347	.09336	.16117	.11185	.06795

Hidrolītiskās apstrādes ietekme

Report

Case		Diena	GlikozeHS	GlikozeS	GlikozeEnz	GlikozeSk90	GlikozeSk180	GalaktozeS	GalaktozeEnz	GalaktozeS90	GalaktozeS180	LakctozeSt	LaktozeEnz	LaktozeS90	LaktozeSk180	EtiķskābeHS	EtiķskābeS	EtiķskābeEnz	EtiķskābeSk90	EtiķskābeSk180	GlikonskābeHS	GlikonskābeS	GlikonskābeEnz	GlikonskābeSk90	GlikonskābeSk180	ProteīniS	ProteīniEnz	ProteīniSk90	ProteīniSk180
.00	Mean	.0000	20.0674	.9243	5.1403	1.8770	6.9076	.1270	4.9880	1.7790	6.3027	47.9782	39.6235	45.0889	36.5732	.1195	.1030	.0320	.0420	.0270	.0952	.0435	.0690	.0355	.0670	3.2115	2.7300	2.9320	2.8455
	Std. Deviation	.00000	.05282	.08167	.15238	.03536	.04872	.15132	.09051	.21637	.01089	.73801	.83368	.00460	.66164	.00071	.00141	.00283	.00283	.00990	.00021	.00212	.00707	.00495	.00141	.01626	.02828	.00283	.01909
5.00	Mean	5.0000	.4396	.0335	.0390	.0475	1.2850	.0440	.0832	.0395	2.6970	45.9365	38.8120	44.9280	36.4045	.2385	.0920	.0830	.0830	.0755	.6025	.1165	.1020	.8425	.9460	3.2480	2.6915	2.8150	2.8135
	Std. Deviation	.00000	.07863	.01202	.00141	.00778	.07778	.02828	.01237	.00778	.34648	1.28198	.84570	.13576	.74883	.00495	.00000	.00000	.00424	.00212	.09970	.01909	.00141	.00071	.01980	.06505	.00212	.02121	.01061
10.00	Mean	10.0000	.0280	.0310	.0395	.0482	.8283	.0032	.0787	.0450	1.4055	44.7322	38.2471	44.9565	36.3320	.4395	.1415	.1320	.1010	.0980	1.4800	.1410	.1270	.1095	.8210	3.2330	2.5010	2.7055	2.6715
	Std. Deviation	.00000	.00424	.00141	.01061	.00870	.13393	.00163	.00665	.01138	.07566	.27040	1.70993	.04738	.84853	.00778	.00212	.00424	.00141	.01131	.03394	.00283	.00990	.00495	.01556	.03253	.00283	.00495	.07283
Total	Mean	5.0000	6.8450	.3296	1.7396	.6576	3.0070	.0580	1.7167	.6212	3.4684	46.2156	38.8942	44.9911	36.4366	.2658	.1122	.0823	.0753	.0668	.7259	.1003	.0993	.3292	.6113	3.2308	2.6408	2.8175	2.7768
	Std. Deviation	4.47214	10.24374	.46211	2.63503	.94473	3.02916	.08903	2.53431	.90210	2.27568	1.61438	1.11793	.10017	.59661	.14473	.02328	.04478	.02715	.03316	.62842	.04619	.02659	.39901	.42548	.03715	.11041	.10179	.08954

Piedevu ietekme

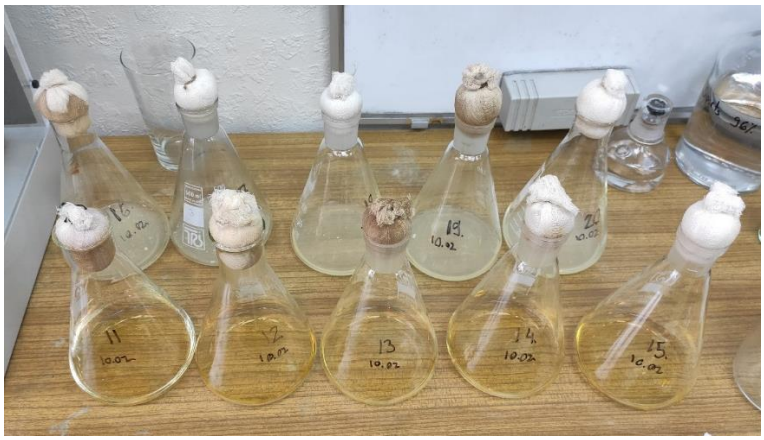
Report

Case		GlikozeHS	GlikozeS	GlikozeRE	GlikozeP	GlikozeNH	GlikozeM	SaharozeM	LaktozeS	LaktozeRE	LaktozeP	LaktozeNH	LaktozeM	GalaktozeS	GalaktozeRE	GalaktozeP	GalaktozeNH	GalaktozeM	ProteīniM
.00	Mean	20.3960	1.0260	.9445	1.0850	.9435	1.3745	20.9755	50.4435	51.9965	52.1305	51.7990	48.9910	.3180	.3200	.2676	.3076	.3097	3.2565
	Std. Deviation	1.47927	.00849	.07283	.10182	.12940	.04031	.62862	.64128	1.26643	.65407	.18668	.09899	.15839	.07637	.03620	.03338	.01039	.01061
5.00	Mean	.4645	.0235	.0470	.0606	.1715	.0240	15.8330	48.6560	50.8305	50.1850	51.3270	47.5695	.0475	.0295	.0215	.0440	.0135	3.2465
	Std. Deviation	.04172	.00495	.01697	.01782	.19587	.03111	.84711	.37477	.69226	.17678	1.43260	.38962	.00778	.03748	.02616	.02828	.01344	.00919
10.00	Mean	.0320	.0415	.0620	.0465	.0270	.0280	11.9810	46.1510	48.2305	47.1258	49.3790	47.2920	.0224	.0058	.0195	.0275	.0033	3.1870
	Std. Deviation	.00566	.02616	.01838	.00636	.03677	.03394	.79337	.36480	.42497	.14743	.44265	.07354	.02772	.00311	.01202	.02192	.00233	.00566
Total	Mean	6.9642	.3637	.3512	.3974	.3807	.4755	16.2632	48.4168	50.3525	49.8138	50.8350	47.9508	.1293	.1184	.1029	.1264	.1088	3.2300
	Std. Deviation	10.42708	.51326	.46093	.53469	.45336	.69690	4.07918	1.96377	1.85105	2.27780	1.33159	.83545	.16332	.16106	.12927	.14227	.15581	.03428

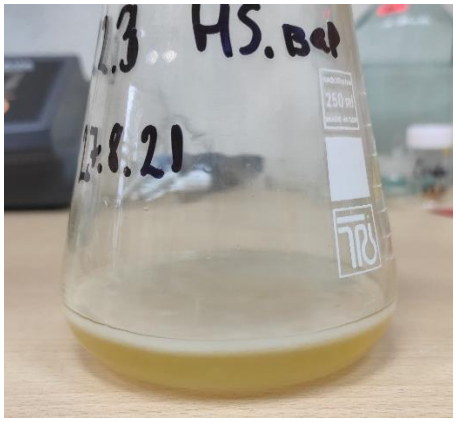
Rezultāti

Bakteriālas celulozes producentu efektivitātes novērtējums sūkalu barotnēs

Pirmajā eksperimentā tika novērtēti vairāki BC sintezējošie EB celmi, lai noteiktu to piemērotību BC iegūšanai kā substrātu izmantojot sūkalas. Tika savstarpēji salīdzināts BC iznākums trim celmiem (*K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602) uz standarta HS un sūkalu barotnēm. Datu statistiskā analīze paradīja, ka vislielākā BC sintēze uz sūkalām novērojama *K. rhaeticus* P-1463 celmam, kas atbilst 1,95 ± 0,15 g/L (sausais svars) (5. attēls). Vislielākā BC sintēze tika novērota standarta HS barotnē, kur glikoze kalpo par C avotu, *K. hansenii* B-22 celmam (3,76 ± 0,07 g/L). Salīdzinot BC iznākumu no substrāta vienības ($Y_{P/S}$) uz HS un sūkalu barotnēm tika konstatēts, ka uz sūkalām *K. rhaeticus* P-1463 iznākums ievērojami lielāks ($Y_{P/S}$ = 15,85% uz HS un 34,32% uz sūkalām), savukārt *K. hansenii* B-22 iznākums sasniedz 18,46% un 47,72%, attiecīgi. Visaugstākais BC iznākums no substrāta uz sūkalām tika novērots *K. hansenii* DSM 5602 celmam ($Y_{P/S}$ = 7,73% uz HS un 54,46% uz sūkalām).



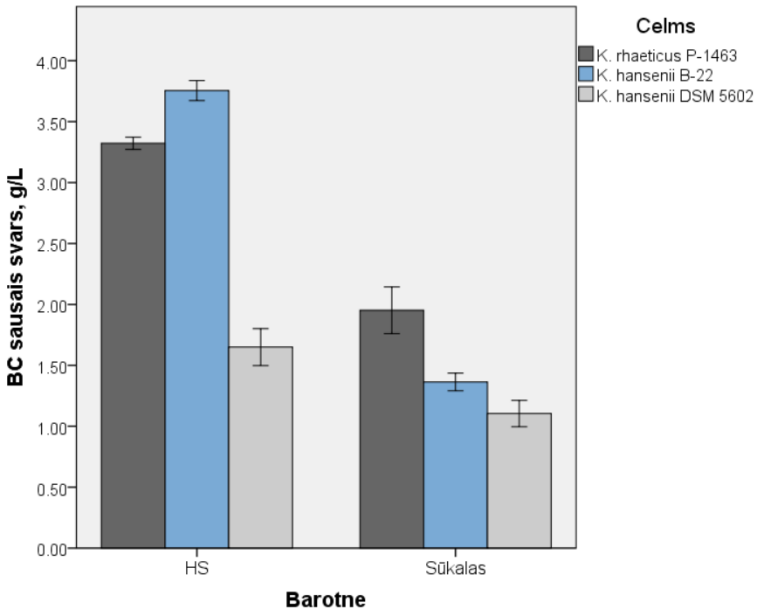
1. attēls. 500 mL kolbas ar standarta HS barotni un sūkalu barotni *K. rhaeticus* P-1463 celma kultivēšanai.



2. BC plēves veidošana uz barotnes virsmas eksperimenta laikā (pēc piecām dienām) standartā HS barotnē ar K. rhaeticus P-1463 celmu.

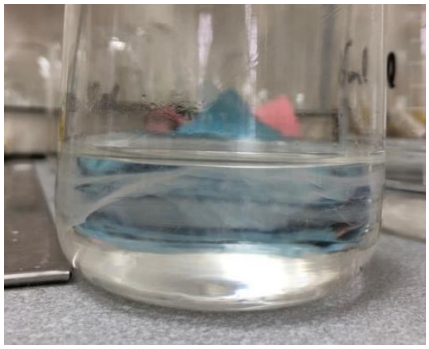
3. attēls. BC plēve pēc 10 kultivācijas dienām standartā HS barotnē ar *K. rhaeticus* P-1463.

4. attēls. BC plēve pēc 10 kultivācijas dienām un žāvēšanas.

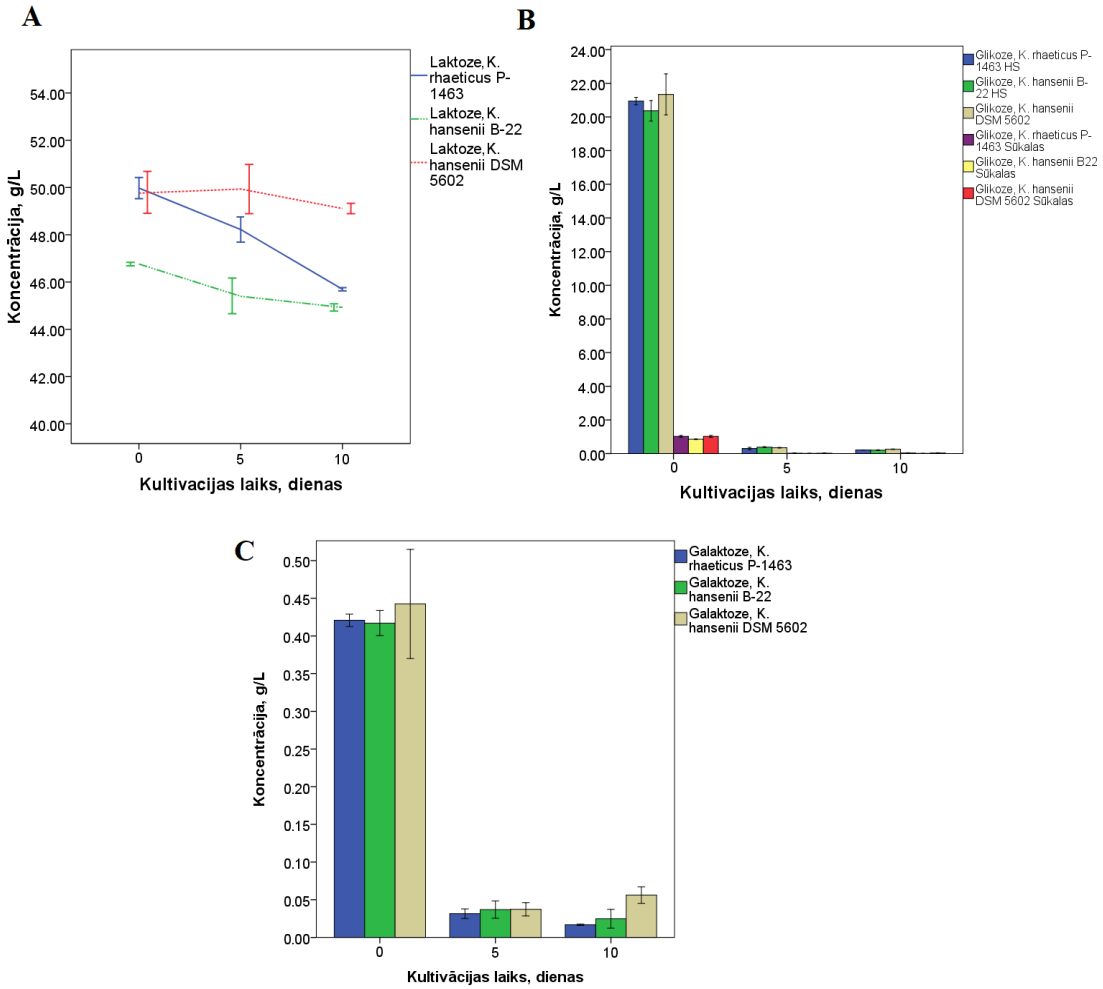


5. attēls. BC sintēze uz standarta HS barotnes un sūkalām, izmantojot dažādus celmus – *K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602, pēc 10 kultivācijas dienām.

Ogļhidrātu (laktozes, glikozes un galaktozes) koncentrācijas izmaiņas ir redzamas 7. attēlā. Analizējot laktozes un tās hidrolīzes produktu koncentrācijas izmaiņas, var secināt, ka vislielākais laktozes patēriņš sūkalu barotnē tika novērots *K. rhaeticus* P-1463 (no 49,97 ± 0,35 g/L līdz 45,69 ± 0,05 g/L). Eksperimentu gaitā *K. rhaeticus* P-1463 celmam tika patērēti aptuveni 8,6% no barotnē esošās laktozes. Pēc eksperimentā iegūtajiem datiem var redzēt, ka *K. rhaeticus* P-1463 celms sūkalu barotnē 10 dienu laikā glikozes un galaktozes koncentrācijas samazinājās no 1,02 ± 0,4 līdz 0,03 ± 0,01 glikozei un no 0,42 ± 0,01 līdz 0,02 ± 0,01 g/L galaktozei.

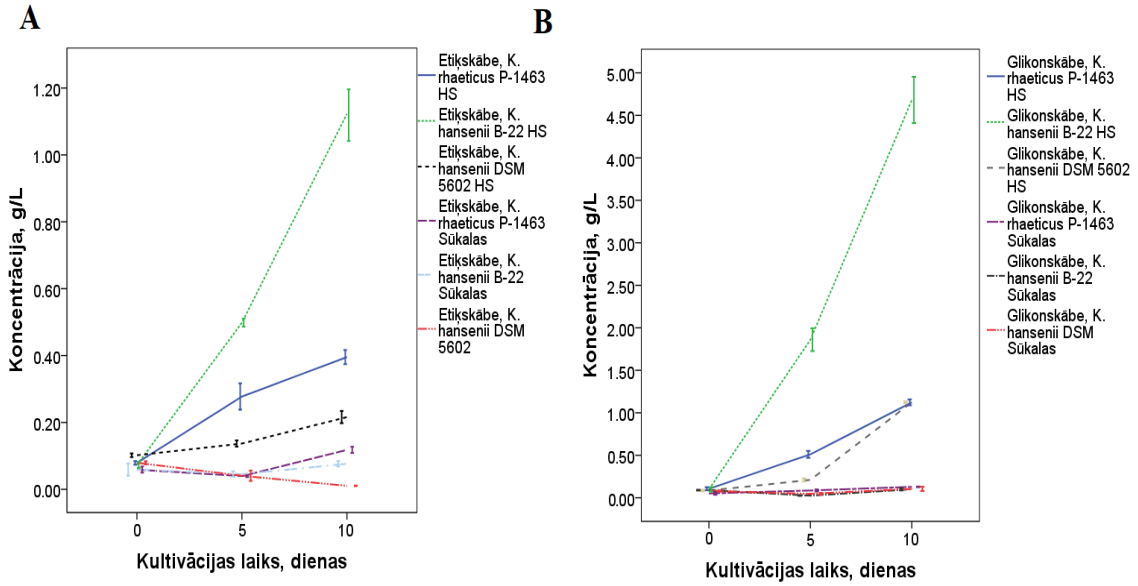


6. attēls. Ļoti plāna un ūdenī minimāli saskatāma BC plēve.



7. attēls. (A) Laktozes koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnē eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602); (B) Glikozes koncentrācijas izmaiņas standartā HS un sūkalu barotnē eksperimenta laikā *(K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602); (C) Galaktozes koncentrācijas izmaiņās standartā HS un sūkalu barotnē (*K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602).

Organisko skābju izmaiņas ir apkopotas 8. attēlā. Pēc iegūtiem datiem var redzēt, ka HS barotnē tika novērota ievērojami lielāka organisko skābju uzkrāšanās eksperimenta laikā nekā sūkalu barotnēs. *K. rhaeticus* P-1463 celmam etiķskābes koncentrācija būtiski palielinājās no 0,06 ± 0,01 g/L līdz 0,12 ± 0,01 g/L un glikonskābes koncentrācija palielinājās no 0,05 ± 0,01 g/L līdz 0,13 ± 0,01 g/L. Lielāka skābju produkcija tika konstatēta uz HS barotnes – *K. hansenii* B-22 celmam etiķskābes pieaugums sastādīja no 0,07 ± 0,01 g/L līdz 1,12 ± 0,07 g/L un glikonskābei 0,1 ± 0,02 g/L un 4,68 ± 0,21 g/L, attiecīgi.



8. attēls. Organisko skābju (etiķskābe un glikonskābe) koncentrācijas izmaiņas *K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602 celmiem eksperimenta laikā.

Proteīnu koncentrācijas samazināšanās nehidrolizētu sūkalu barotnē netika konstatēta nevienam pētāmajam celmam. Eksperimenta laikā proteīnu koncentrācijas barotnē palika nemainīgas ap 3,21 ± 0,12 g/L visiem trim pētāmajiem celmiem.

Balstoties uz iegūtiem datiem, tālākiem eksperimentiem tika izvelēts *K. rhaeticus* P-1463 celms dēļ savas spējas ievērojami efektīvāk sintezēt BC uz sūkalu barotnes.

Sūkalu kā bakteriālas celulozes substrāta efektivitātes novērtējums

Otrajā eksperimentā sūkalu barotne tika salīdzināta ar HS barotni un alternatīvu manitola barotni. Eksperimenta sākumā tika pārbaudīts, vai izvelētais BC producenta celms (*K. rhaeticus* P-1463) spēj izmantot laktozi un galaktozi kā vienīgos C avotus modificētajā HS barotnē (1. tabula). Tika konstatēts, ka *K. rhaeticus* P-1463 celms izmanto laktozi un galaktozi kā vienīgo C avotu, sasniedzot 2,85 ± 0,04 g/L un 2,1 ± 0,02 g/L BC pēc 10 kultivācijas dienām.

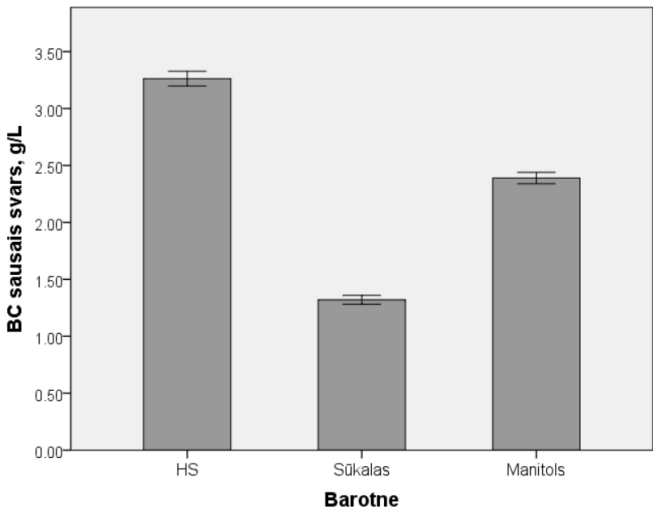
1. tabula

BC sintēze uz standarta un modificētām HS barotnēm (*K. rhaeticus* P-1463).

Barotne	BC sausais svars, g/L	Produktivitāte Q_X, g/L/d
Standarta HS barotne ar glikozi	3,68 ± 0,03	0,37
Modificētā HS barotne ar laktozi	2,85 ± 0,04	0,29
Modificētā HS barotne ar galaktozi	2,1 ± 0,02	0,21

Eksperimenta otrajā daļā sūkalu barotne tika salīdzināta ar standarta HS barotni ar glikozi un manitola barotni. BC sausais svars *K. rhaeticus* P-1463 celmam dažādās barotnēs tika apkopots 10. attēlā. Eksperimentā ir konstatēts, ka sūkalu barotnes izmantošana nodrošina ievērojami zemāko ($p < 0,001$) BC sauso svaru (1,32 ± 0,04 g/L) salīdzinājumā ar HS (3,26 ± 0,06 g/L) un manitola (2,39 ± 0,05 g/L) barotnēm. BC $Y_{P/S}$ = 29,23% bija ievērojami lielāka nekā HS (16,28%) un manitola (15,31%) barotnē.

9. attēls. BC biezuma atšķirības. Pa kreisi – BC plēve uz standarta HS barotnes, pa labi – plānāka plēve uz sūkalu barotnes.

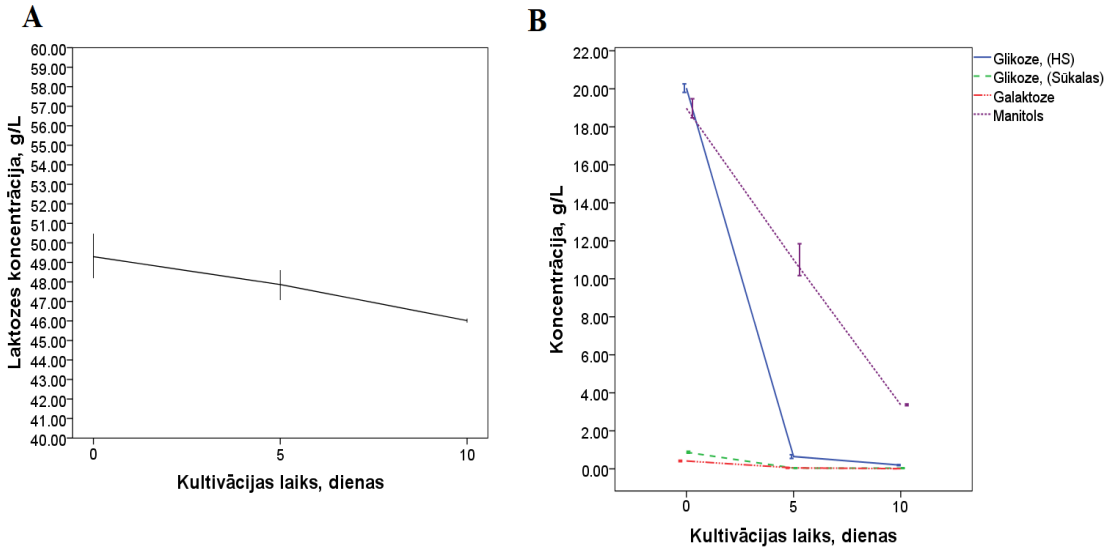


10. attēls. BC sintēze dažādās barotnēs – standarta HS, sūkalu un manitola , pēc 10 kultivācijas dienām (*K. rhaeticus* P-1463).

11. attēls. BC plēvju atmazgāšana un paraugu ievākšana metabolītu un pH analīzei eksperimenta beigās.

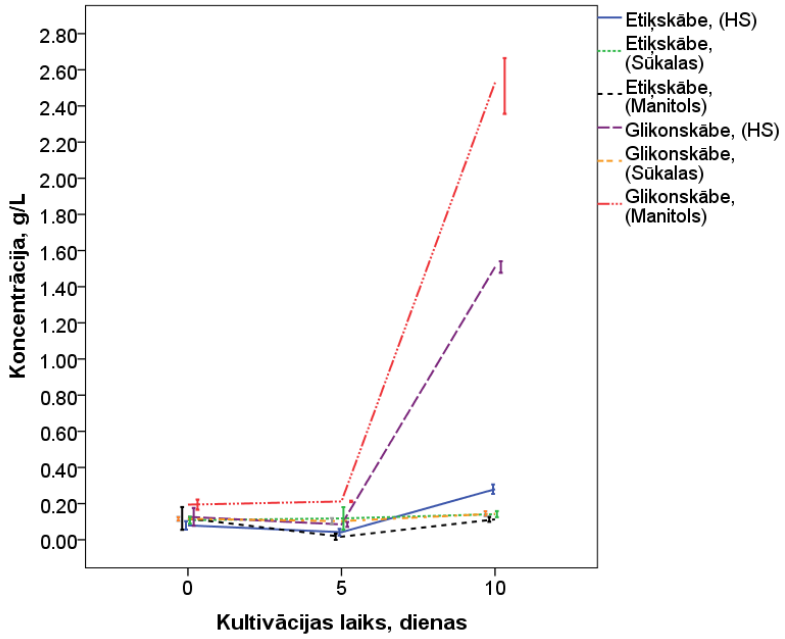
12. attēls. BC plēves pēc kaltēšanas.

Oglekļa avotu (laktozes, glikozes, galaktozes un manitola) koncentrācijas izmaiņas eksperimenta laikā ir apkopotas 13. attēlā. Cukuru izmaiņas sūkalu barotnē ir līdzīgas pirmajam eksperimentam, t.i. galaktoze un glikoze tika patērētas jau pirmajās eksperimenta dienās (līdz piektajai dienai). Savukārt, laktozes patēriņš bija aptuveni 6,3%. Eksperimenta dati rāda, ka manitola koncentrācija barotnē pazeminājās no 18,97 ± 0,53 g/L līdz 3,36 ± 0,03 g/L.



13. attēls (A) Laktozes koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnē eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463); (B) Monosaharīdu (glikozes un galaktozes) un manitola koncentrācijas izmaiņas standartā HS, sūkalu un manitola barotnē eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463).

Organisko skābju koncentrāciju izmaiņas ir apkopotas 20. attēlā. Sūkalu barotnē tika novērota minimāla, bet statistiski būtiska organisko skābju uzkrāšanās. Savukārt, manitola barotnē būtiski palielinājās glikonskābes koncentrācija no 0,19 ± 0,01 g/L līdz 2,53 ± 0,01 g/L, kas bija lielāka nekā HS barotnē (1,51 ± 0,01 g/L). Visizteiktākā etiķskābes uzkrāšanās tika novērota HS barotnē (0,28 ± 0,01 g/L). Aprēķinot organisko skābju iznākumu $Y_{P/S}$ no patērēta substrāta vienības, tika konstatēts, ka organisko skābju iznākums sūkalu barotnē ir zemāks ($Y_{P/S}$ = 4,89%), salīdzinājumā ar skābju iznākumu HS (8,4%) un manitola barotnēs (14,92%) attiecīgi. Šāda tendence tika konstatēta visos eksperimentos.



14. attēls. Organisko skābju (etiķskābe un glikonskābe) koncentrācijas izmaiņas standarta HS, sūkalu un manitola barotnē eksperimenta gaitā (*K. rhaeticus* P-1463).

Līdzīgi kā pirmajā eksperimentā proteīnu koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnē netika konstatētas (3,15 ± 0,08 g/L).

pH izmaiņas eksperimenta laikā tika apkopotas 6. tabulā. Var konstatēt, ka pH samazinājums sūkalu barotnē nebija tik straujš (pH 5,72 ± 0,03) salīdzinot ar HS (pH 3,54 ± 0,02) un manitola (pH 3,24 ± 0,02) barotnēm.

2. tabula

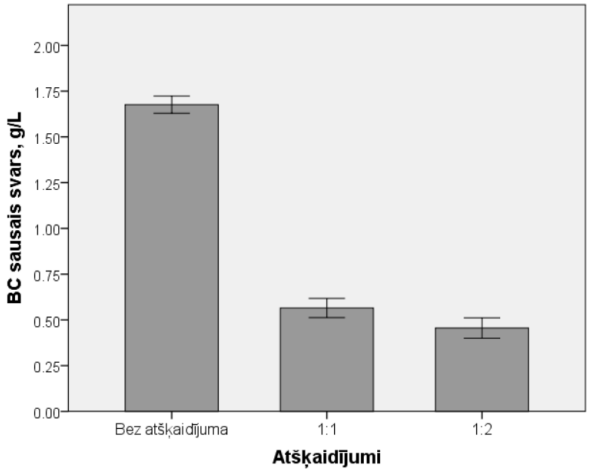
pH izmaiņas kultivācijas laikā (*K. rhaeticus* P-1463).

Barotne	pH		
	Eksperimenta sākumā	5. diena	10. diena
HS	5,97 ± 0,01	3,92 ± 0,03	3,54 ± 0,02
Sūkalas	6,03 ± 0,02	5,84 ± 0,02	5,72 ± 0,03
Manitols	6,04 ± 0,01	4,38 ± 0,01	3,24 ± 0,02

Sūkalu barotnes pirmsapstrādes un sastāva modificēšanas ietekme uz BC sintēzi

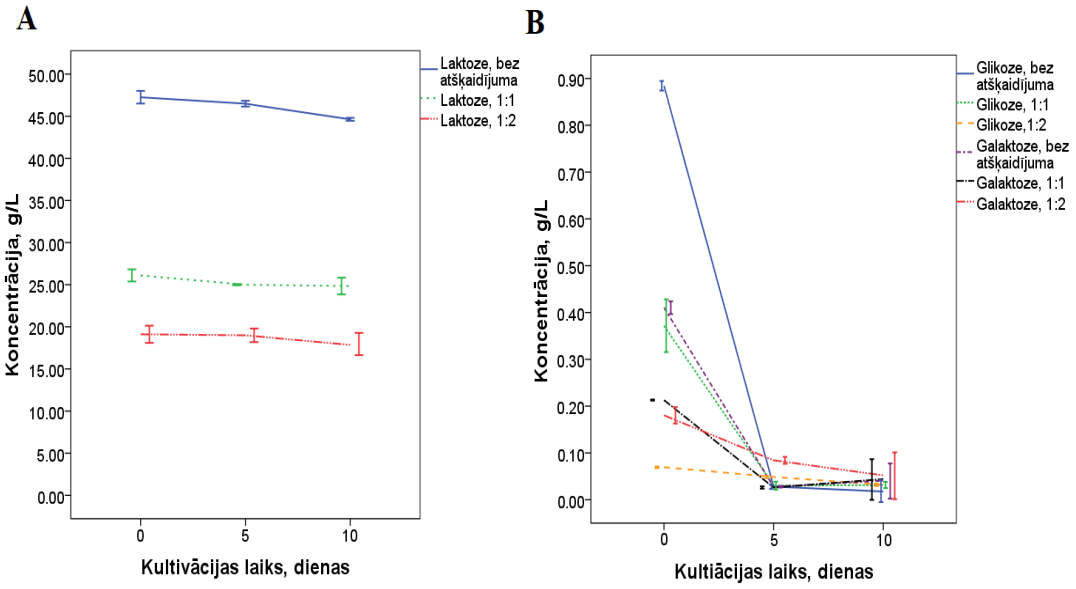
Sūkalu koncentrācijas ietekme

Eksperimentā tika pārbaudīs, vai sūkalu atšķaidīšana ietekmēs BC sintēzi, jo augsta laktozes koncentrācija sūkalās potenciāli var inhibēt baktērijas augšanu un samazināt BC iznākumus (Khudair et al. 2018). Eksperimenta gaitā tika konstatēts, ka sūkalu atšķaidīšana būtiski samazināja BC iznākumu no 1,68 ± 0,05 g/L neatšķaidītajās sūkalās līdz 0,57 ± 0,05 g/L (1:1 atšķaidījums) un 0,46 ± 0,05 g/L (1:2 atšķaidījums) (21. attēls). $Y_{P/S}$ neatšķaidītajās sūkalas bija 43,75 % un attiecīgi 32,03 % (1:1 atšķaidījums) un 31,45 % (1:2 atšķaidījums).



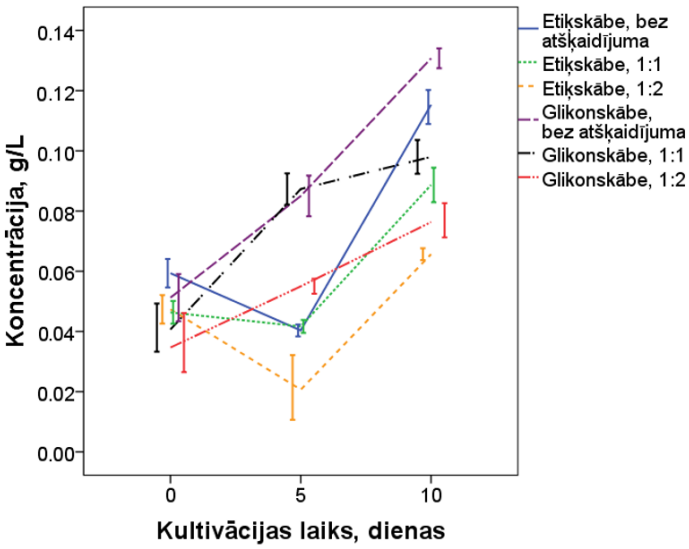
15. attēls. *K. rhaeticus* P-1463 BC sintēze atkarībā no sūkalu barotnes atšķaidījuma 10 dienu kultivācijas laikā.

Ogļhidrātu koncentrācijas izmaiņas tika apkopotas 16. attēlā. Cukuru patēriņš eksperimenta laikā neatšķaidītajā barotnē ir līdzīgs iepriekšējiem eksperimentiem (14. un 19. attēls). Atšķaidītajos paraugos netika novērota būtiskās laktozes koncentrācijas izmaiņas ($p > 0,05$).



16. attēls. (A) Laktozes koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnē eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463) atkarībā no atšķaidījuma; (B) Monosaharīdu (glikozes un galaktozes) koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnēs eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463) atkarībā no atšķaidījuma.

Līdzīgi kā iepriekšējos eksperimentos, sūkalu barotnē bija novērotas minimālas statistiski būtiskas ($p > 0,05$) organisko skābju koncentrācijas izmainās. Šīs izmaiņas ir apkopotas 17. attēlā. Vislielākā koncentrācija tika novērota neatšķaidītajos paraugos, kur tika sasniegtas 0,11 ± 0,01 g/L etiķskābes un 0,13 ± 0,01 g/L glikonskābes koncentrācijas. Būtiskas ($p > 0,05$) proteīnu koncentrācijas izmaiņas šī eksperimenta gaitā netika konstatētas nevienā no paraugu grupām.

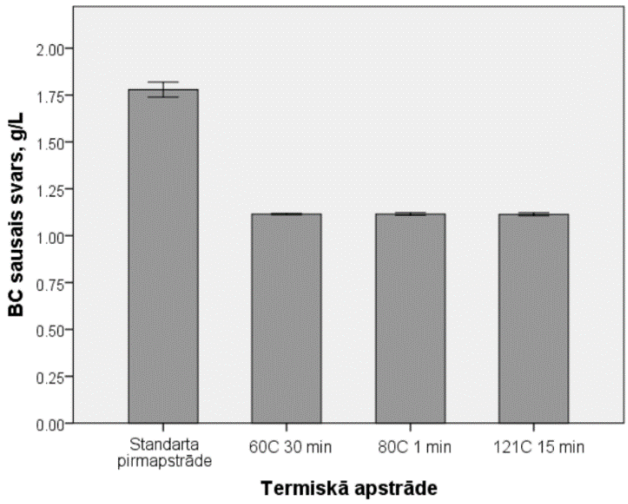


17. attēls. Organisko skābju (etiķskābe un glikonskābe) koncentrācijas izmaiņas eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463) atkarībā no sūkalu barotnes atšķaidījuma.

Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, tālākajos eksperimentos sūkalu barotnes sagatavošanas laikā sūkalas netika atšķaidītas.

Termiskās apstrādes ietekme

Šajā eksperimenta tika novērtēta BC sintēzes intensitāte atkarībā no barotnes sterilizēšanas procedūras (pirmsapstrādes). BC sausā svara rezultāti ir apkopoti 18. attēlā. Vislielākais BC sausais svars ir novērots standarta sūkalu termiskas pirmsapstrādes metodikas pielietošanas gaitā un sastāda 1,78 ± 0,04 g/L. Datu statistiskā analīze paradīja ka BC sintēzē paraugiem ar šādiem apstrādes režīmiem – 60°C 30 min; 80°C 1 min un 121°C 15 min nebija novērotas savstarpēji būtiskas atšķirības ($p > 0,05$).

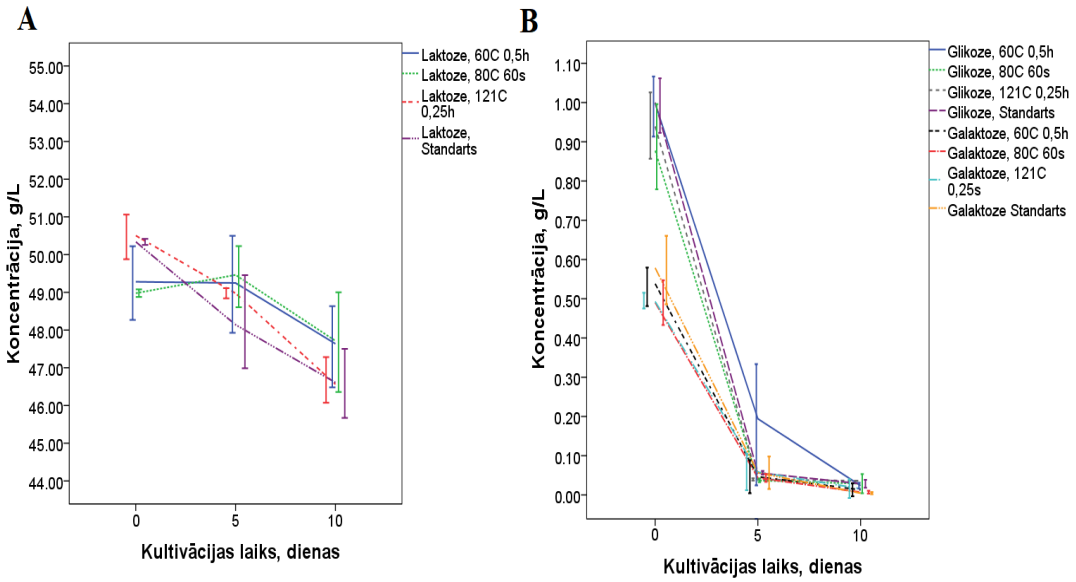


18. attēls. BC sintēze atkarībā no sūkalu termiskās pirmsapstrādes metodes pēc 10 kultivācijas dienām (*K. rhaeticus* P-1463).

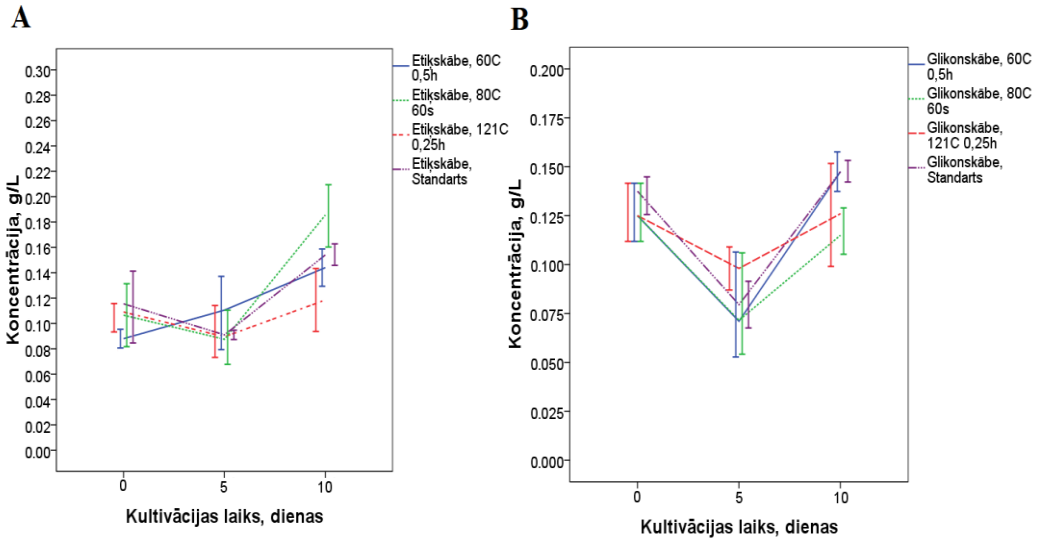
19. Attēls. Sūkalas pēc termiskas apstrādes 121°C 15 min.

20. attēls. Izkaltēti BC plēves paraugi.

Laktozes, glikozes un galaktozes analīžu rezultāti ir apkopotas 21. attēlā. Būtiskās laktozes koncentrācijas izmaiņas tika novērotas tikai standarta pirmsapstrādes paraugu grupai ($p = 0,045$). Laktozes patēriņa izmaiņas parējās grupas bija minimālās un nav statistiski ticami savstarpēji atšķirīgas ($p > 0,05$). Glikozes un glakatozes patēriņš ir līdzīgs pārējiem eksperimentiem. Organisko skābju izmaiņās ir apkopotas 27. attēlā. Datu statistiskā analīze paradīja, ka būtiskas skābju izmaiņas tika konstatētas tikai sūkalu standarta pirmsapstrādes paraugiem. Savukārt, pārējiem paraugiem netika konstatētas būtiskas izmaiņās organisko skābju koncentrācijās ($p > 0,05$).



21. attēls. (A) Laktozes koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnēs eksperimenta laikā atkarībā no termiskas pirmsapstrādes (*K. rhaeticus* P-1463); (B) Monosaharīdu (glikozes un galaktozes) koncentrācijas izmaiņas atkarībā no termiskās pirmsapstrādes eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463).



22. attēls. Organisko skābju (etiķskābe un glikonskābe) koncentrācijas izmaiņas fermentācijas (*K. rhaeticus* P-1463) laikā atkarībā no termiskās pirmsapstrādes.

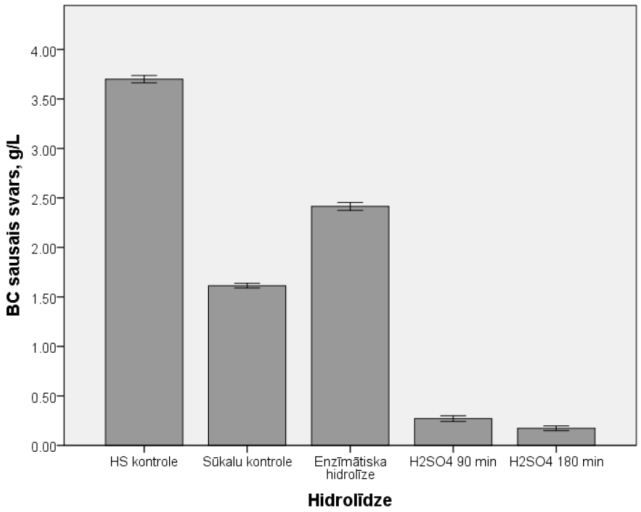
Proteīnu analīze parāda, ka standarta sūkalu pirmsapstrādes procedūra samazina proteīnu koncentrāciju barotnē no ~8 līdz ~3,2 g/L. Savukārt, pielietojot citus pirmsapstrādes paņēmienus proteīnu koncentrācijas palika 7,8 – 8,1 g/L robežās, tas ir nav būtiski mainījušas. Tālākajos eksperimentos tika izmantota standarta sūkalu pirmsapstrādes procedūra.

Hidrolītiskās apstrādes ietekme

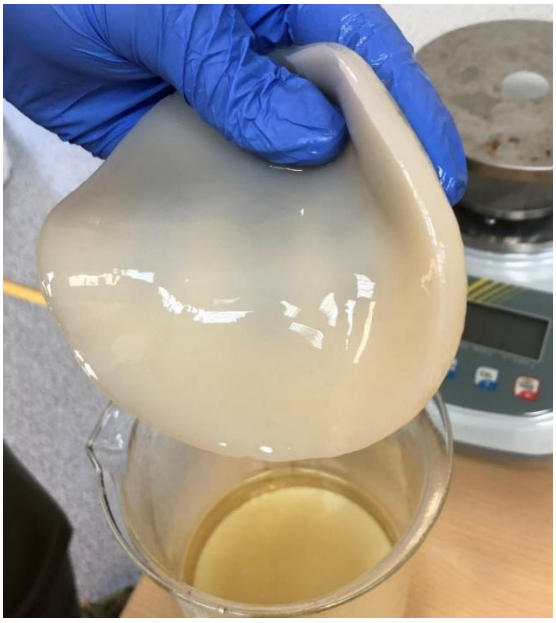
Šajā eksperimentā tika pārbaudīts, vai sūkalu hidrolīze uzlabos BC sintēzi. Rezultāti tika apkopoti 23. attēlā. Rezultāti liecina, ka BC sausais svars uz sūkalu barotnēm bija vislielākais gadījumā, kad tika pielietota enzimātiskās pirmsapstrādes metode (2,41 ± 0,04 g/L). Sūkalu kontroles paraugiem BC sausais svars sasniedza 1,61 ± 0,03 g/L. Savukārt, paraugiem, kur tika veikta skābes hidrolīze – BC sausais svars bija ievērojami zemāks nekā sūkalu kontroles grupai, t.i. 0,27 ± 0,02 g/L H_2SO_4 1,5 h paraugu grupai un 0,173 ± 0,02 g/L H_2SO_4, 3 h paraugu grupai. Aprēķinot BC iznākumu no substrāta vienības var secināt, ka enzimātiskā

hidrolīze samazināja produktivitāti līdz 20,93% salīdzinājumā ar sūkalu kontroles (bez papildus apstrādes) grupas paraugu produktivitāti (36,42%). BC iznākums no substrāta $Y_{P/S}$ skābes hidrolīzes paraugiem bija 7,41% (H_2SO_4, 1,5 h) un 1,51% (H_2SO_4, 3 h).

23. attēls. Hidrolītiski apstrādātas sūkalas izmantošana BC sintēzei termostatos.

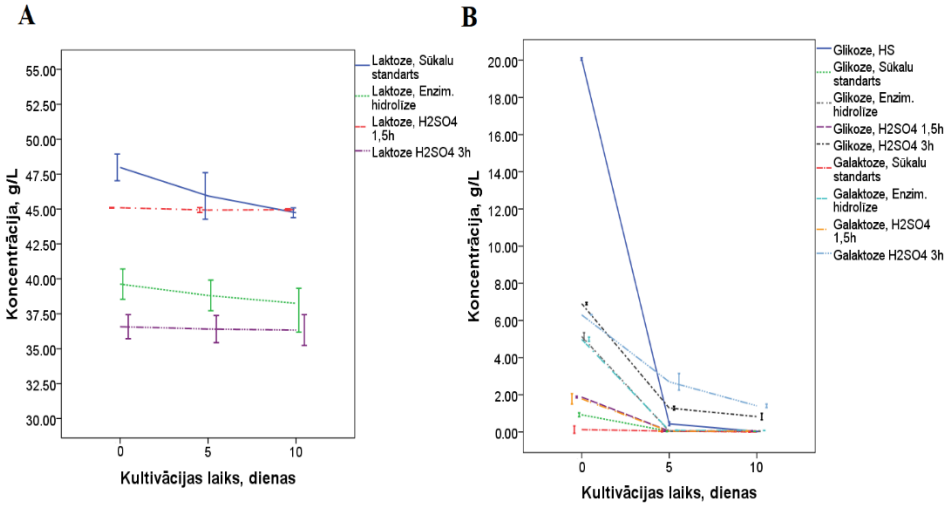


24. attēls. BC sintēze (*K. rhaeticus* P-1463) atkarībā no sūkalu hidrolīzes metodes pēc 10 kultivācijas dienām.



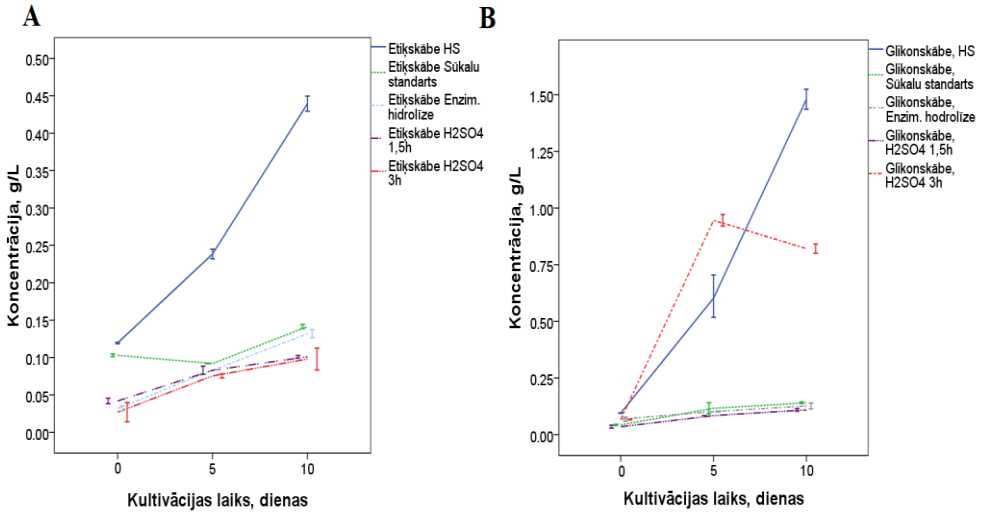
25. attēls. BC plēve pēc sintēzes uz HS barotnes.

No 26. attēla var redzēt, ka enzimātiskā pirmsapstrāde palielināja glikozes koncentrāciju barotnē līdz 5,14 ± 0,15 g/L, ka arī galaktozes daudzumu barotnē līdz 4,99 ± 0,09 g/L. Laktozes koncentrācija šajā barotnē hidrolīzes rezultātā samazinājās līdz 39,62 ± 0,83 g/L. Enzimātiskās hidrolīzes ceļā palielinot brīvas glikozes un galaktozes koncentrāciju barotnē bija iespējams palielināt BC produktivitāti (Q_X = 0,27 g/L/d). Paraugos, kur tika veikta enzimātiskā hidrolīze fermentācijas gaitā tika patērēta visa brīva glikoze un galaktoze. Ir svarīgi atzīmēt, ka glikozes un galaktozes koncentrācijas paaugstinājās arī skābas hidrolīzes grupām. Tomēr tur BC sintēzes intensitāte bija būtiski mazāka salīdzinot ar kontroles paraugiem. Ar H_2SO_4 trīs stundas hidrolīzētajiem eksperimenta gaitā paraugos netika patērēta visa brīva glikoze (6,9 ± 0,05 g/L no līdz 0,82 ± 0,13 g/L) un galaktoze (no 6,3 ± 0,01 līdz 1,4 ± 0,08 g/L).



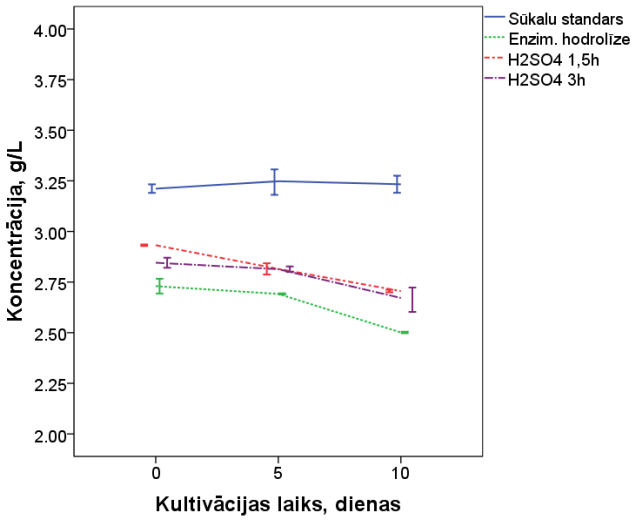
26. attēls (A) Sūkalu hidrolītskās apstrādes paņēmiena ietekme uz laktozes koncentrācijas izmaiņām eksperimenta gaitā (*K. rhaeticus* P-1463); (B) Sūkalu hidrolītskās apstrādes paņēmiena ietekme uz monosaharīdu (glikozes un galaktozes) koncentrācijas izmaiņām eksperimenta gaitā. (*K. rhaeticus* P-1463).

Organisko skābju koncentrāciju izmaiņas ir apkopotas 27. attēlā. Kopumā sūkalu hidrolīze neietekmēja skābju koncentrācijas izmaiņas tendences. Vienīgi var atzīmēt glikonskābes koncentrācijas izmaiņas H_2SO_4 trīs stundu hidrolīzes paraugiem no 0,06 ± 0,01 g/L līdz 0,82 ± 0,01 g/L.



27. attēls. Sūkalu hidrolītskās apstrādes paņēmiena ietekme uz etiķskābes koncentrācijas izmaiņām eksperimenta gaitā (*K. rhaeticus* P-1463); (B) Sūkalu hidrolītskās apstrādes paņēmiena ietekme uz glikonskābes koncentrācijas izmaiņām eksperimenta gaitā (*K. rhaeticus* P-1463).

Ir svarīgi atzīmēt, ka šajā eksperimenta salīdzinot ar ir iepriekšējiem tika novērota proteīnu koncentrācijas samazināšanās fermentācijas gaitā. Proteīnu koncentrācijas izmaiņas ir apkopotas 28. attēlā. Var redzēt, ka salīdzinājumā ar kontroles grupu, enzimātiskas hidrolīzes grupai proteīnu koncentrācija (p = 0,02) samazinājās no 2,73 ± 0,03 g/L līdz 2,5 ± 0,01 g/L, kas atbilst aptuveni 8,4% proteīnu patēriņam.



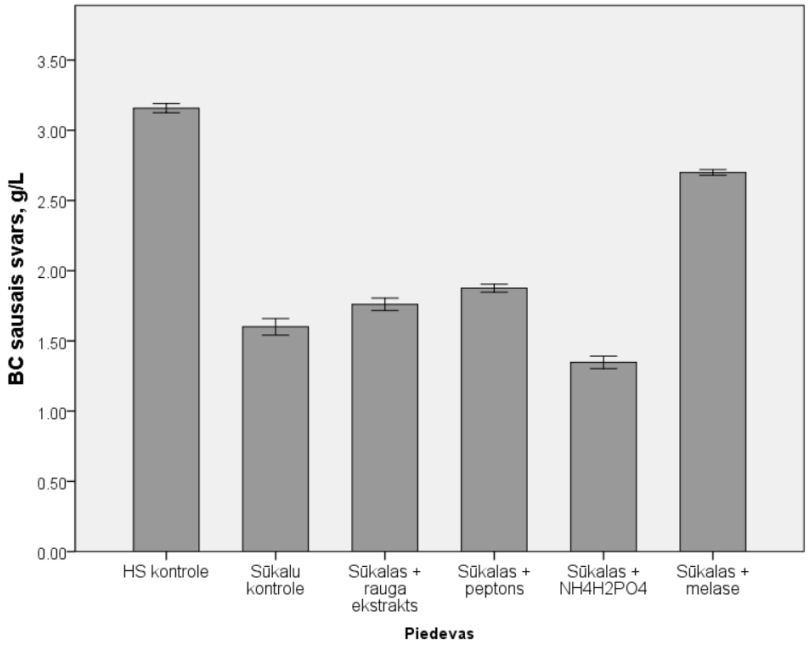
28. attēls. Sūkalu hidrolītskās apstrādes paņēmiena ietekme uz proteīnu koncentrācijas izmaiņām eksperimentu laikā (*K. rhaeticus* P-1463).

Piedevu ietekme

Eksperimenta gaitā tika pārbaudīts vai augšanas faktoru piedevas varētu palielināt BC sintēzi. Iegūti rezultāti tika apkopoti 31. attēlā. Pēc iegūtiem rezultātiem var redzēt, ka BC sintēze uz sūkalu barotnes kas papildināta ar melasi bija visaugstākā (2,7 ± 0,02 g/L). BC $Y_{P/S}$ bija viszemākais paraugiem ar pievienotu $NH_4H_2PO_4$ (1,35 ± 0,04 g/L). BC iznākums $Y_{P/S}$ kombinētajā sūkalu / melases barotnē bija 21,88%, kas ir mazāks par iznākumu kontroles sūkalu barotnē bez pievienotām piedevām (32,24%).

29. attēls. Dažādas piedevas sūkalu barotnei.

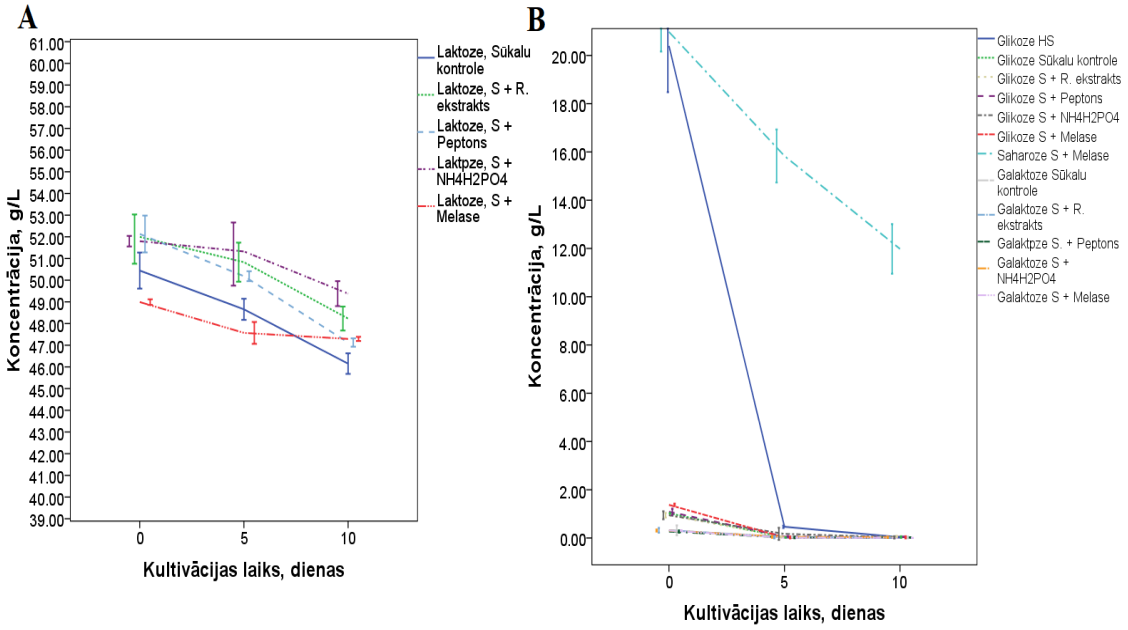
30. attēls. Statiska augšana sūkalu barotnē ar dažādām piedevām.



31. attēls. Barotnes bagātināšanas (rauga ekstrakts, peptons, $NH_4H_2PO_4$, melase) ietekme uz BC sintēzi pēc 10 kultivācijas dienām (*K. rhaeticus* P-1463).

Cukuru patēriņš eksperimentā laikā ir apkopots 38. attēlā. Šajā eksperimentā tika pārbaudīta papildus saharozes (no melases) koncentrācijas un melases sastāvā esošo augšanas faktoru ietekme uz BC sintēzi. 32.B attēlā var redzēt, ka fermentācijas gaitā saharozes koncentrācija kombinētajā sūkalu un melases barotnē samazinājās no 20,98 ± 0,64 g/L līdz 11,98 ± 0,79 g/L.

Pārējās barotnes tika konstatēts līdzīgs cukuru patēriņš kā iepriekšējos eksperimentos.



32. attēls (A) Laktozes koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnē (*K. rhaeticus* P-1463) eksperimenta laikā atkarībā no piedevām (rauga ekstrakts, peptons, $NH_4H_2PO_4$, melase); (B) Monosaharīdu (glikozes un galaktozes) koncentrācijas izmaiņas (*K. rhaeticus* P-1463) standarta HS un sūkalu barotnē eksperimenta laikā atkarībā no piedevām (rauga ekstrakts, peptons, $NH_4H_2PO_4$, melase).

Diskusija

Eksperimentu gaitā tika pētītas sūkalas kā potenciāli lēta un perspektīva alternatīva dārgākām BC sintēzes barotnēm. Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, var secināt, ka sūkalas var kalpot kā alternatīvā barotne BC sintēzei. *K. rhaeticus* P-1463 celms uzrādīja vislielāko BC iznākumu (1,95 ± 0,15 g/L), salīdzinot ar citiem pētījumā izmantotajiem celmiem. Eksperimentu laikā iegūtie *K. rhaeticus* P-1463 BC sintēzes dati ir apkopoti biotehnoloģisko rādītāju tabulā (7. tabulā).

7. tabula

BC sintēzes biotehnoloģiskie rādītāji uz sūkalām *(K. rhaeticus* P-1463).

Barotne	BC sausais svars, g/L	BC iznākums no substrāta ($Y_{P/S}$), %	BC produktivitāte (Q_X), g/L/d
Standarta HS barotne	3,32 ± 0,04	16,6	0,33
Sūkalu barotne (bez pirmsapstrādes)	1,95 ± 0,15	34,32	0,2
Sūkalu barotne ar enzimātisku hidrolīzi	2,41 ± 0,4	20,93	0,24
Sūkalu un melases kombinēta barotne	2,7 ± 0,02	21,88	0,27

Salīdzinot ar literatūras avotiem, *K. rhaeticus* P-1463 uzrada samērojami labus rezultātus sūkalu barotnē bez pirmsapstrādes (8. tabula).

8. tabula

BC sintēze (sausais svars) uz sūkalām vai laktozi saturošām barotnēm (pēc literatūras avotiem).

Celms	Baronte	BC iznākums, g/L	Avots
K. xylinus DSM 2325	Sūkalu permiāts pēc enzimāniskās hidrolīzes ar β-galaktozidāzi	6,77	(Rollini et al. 2020)
G. sucrofermentans B-11267	Sūkalas	5,45	(Revin et al. 2018)
G. xylinus PTCC 1734	Sūkalas pēc enzimātiskās hidrolīzes ar β-galaktozidāzi	3,55	(Salari et al. 2019)
***K. rhaeticus* P-1463**	**Sūkalas**	**1,95**	-
***K. rhaeticus* P-1463**	**Sūkalas pēc enzmimātiskās hidrolīzes ar β-galaktozidāzi**	**2,41**	-
K. sucrofermentans DSM 15973	Sūkalu barotne	1,6	(Tsouko et al. 2015)
G. sacchari	Sūkalu barotne	0,08	(Carreira et al. 2011)
G. xylinus K3	Laktozes barotne	0,07	(Nguyen et al. 2008)

Salīdzinot ar citām alternatīvajām barotnēm, piemēram, jēlglicerīnu, melasi, ābolu sulu, sūkalas, salīdzinoši, neuzrada labākus rezultātus (9. tabula). Salīdzinot šajā pētījumā iegūtus rezultātus ar literatūras avotiem, var konstatēt, ka vairākos pētījumos BC sintēze uz sūkalām bija salīdzinoši zema (Thompson and Hamilton 2000; Battad-Bernardo et al. 2004; Nguyen et al. 2008).

9. tabula

BC iznākums izmantojot rūpniecības un lauksaimniecības izejvielas vai blakusproduktus (Kolesovs and Semjonovs, 2020).

Barotne	Celms	BC iznākums, sausais svars, g/L	Informācijas avots
Sūkalu barotne (bez pirmsapstrādes)	***K. rhaeticus* P-1463**	**1,95**	-
Sūkalas pēc enzimātiskās hidrolīzes ar β-galaktozidāzi	***K. rhaeticus* P-1463**	**2,41**	-
Sūkalas	*G. sucrofermentans* B-11267	5,45	(Revin et al. 2018)
Kukurūzas stiebru sula	*A. xylinum* NRRL B-42	6,7	(Cerrutti et al. 2016)
Vinogu spiedpaliekas	*G. xylinus* NRRL B-42	8,0	(Vazquez et al. 2013)
Spirta šķiedenis	*Gluconacetobacter oboediens*	8,9	(Jahan et al. 2018)
Apelsīnu sula	*A. xylinum* NBRC 13693	5,9	(Kurosumi et al. 2009)
Abolu sula	*A. xylinum* NBRC 13693	3,9	(Kurosumi et al. 2009)

Ananasu sula	*A. xylinum* NBRC 13693	3,9	(Kurosumi et al. 2009)
Melase	*A. xylinum* BPR2001	5,3	(Bae and Shoda 2004)
Glicerīnsls	*G. xylinus* CGMCC no. 2955	5,97	(Zhong et al. 2013)
Auzu enzimātiskais hidrolizāts	*A. xylinus* ATCC 23770	8,3	(Chen et al. 2013)
Kokosriekstu piens (*Nata de Coco*)		712,9 (slapja BC)	(Phong et al. 2017)

Kā redzams, lielākā BC sintēzes intensitāte tika sasniegta tajās barotnēs, kur bija klātesošie brīvie cukuri, saharoze, ka arī daudzveidīgi, kaut arī nedefinētie, augšanas papildus faktori, kas nāca no dabiskas izcelsmes ražošanas vai lauksaimniecības blakusproduktiem un izejvielām. Tiek atzīmēts, ka laktoze ir problematīsks C avots, un BC producenti patērē to lēnāk nekā glikozi vai saharozi (Jozala et al. 2015). Kas visticamāk ir saistīts ar *lac*Z gēna trūkumu, kas ir atbildīgs par β-galaktozidāzes enzīma produkciju un laktozes šķelšanu (Battad-Bernardo et al. 2004). Ņemot vērā to, ka šajā pētījumā tika novērota laktozes šķelšana, var pieļaut, par *lac*Z gēna esamību *K. rhaeticus* P-1463 genomā (14. attēls). Tomēr laktozes patēriņš eksperimenta laikā bija ievērojami zemāks nekā *G. sucrofermentans* B-11267, kas pirmajā kultivācijas dienā spēja samazināt laktozes koncentrāciju barotnē no 42,1 g/L līdz 22,4 g/L (Revin et al. 2018). *K. rhaeticus* P-1463 celma genoma sekvencēšana dotu pilnu ainu par gēniem, kas iesaistīti laktozes metabolismā. Tostarp, uz doto brīdi ir bijis maz mēģinājumu veidot ģenētiski modificētus BC producentu celmus. Ka potenciāls risinājums laktozi saturošu substrātu izmantošanas efektivitātes uzlabošanai varētu būt ģenētiskas inženierijas metožu izmantošana. Ievietojot producenta genomā gēnus, kas atbild par laktozes šķelšanu un proteāzes aktivitāti, var panākt lielāku BC ražu (Battad-Bernardo et al. 2004).

Svarīgi atzīmēt, ka paildzinot kultivācijas laiku virs izvēlētajām 10 dienām, BC sintēze uz pētāmās barotnes ir augstāka, Salīdzinot ar BC sintēzes intensitāti ar literatūras avotiem, ir jāatzīmē, ka būtu lietderīgi salīdzināt nevis iegūto BC sauso svaru, bet, piemēram, produktivitāti (Q_X), t.i. BC produktivitāti dienā vai stundā, jo kultivācijas laiks vairākos pētījumos atšķiras (no divām līdz 40 kultivācijas dienām), tomēr ne vienmēr publikācijās pārstāvēti dati un eksperimentu apstākļu atšķirības ļauj to veikt. Literatūras avotu analīze un šī darba rezultāti rāda, ka ir svarīgi turpināt pētīt BC sintezējošus celmus ar mērķi atlasīt efektīvākus BC producentus.

Pētījumā tika paradīts, ka BC sintēze uz sūkalām ir zemāks salīdzinot ar standarta HS barotni un citiem alternatīviem oglekļa avotiem, piemēram, ar manitolu vai glicerīnu (Oikawa et al. 1995; Zhong et al. 2013). BC sausa sausais svars uz sūkalām joprojām paliek par 40 – 50 % mazāks par iznākumu uz standarta HS barotnes. Neskatoties uz to, ka sūkalas ir lēts substrāts, to izmantošana ir problemātiska mazas BC produktivitātes dēļ. Eksperimentu laikā arī tika paradīts, ka manitola barotne var kalpot, kā laba alternatīva HS standarta barotnei (2,39 ± 0,05 g/L) (17. attēls). Tika parādīts, ka *G. xylinus* ATCC 53524 sintezēja 3,37 g/L BC uz manitola barotnes (Mikkelsen et al. 2009), tomēr šobrīd joprojām trūkst pētījumu saistībā ar BC sintēzi uz manitola kā oglekļa avota un būtu nepieciešams optimizēt manitola barotni ar mērķi palielināt BC produktivitāti uz šīs barotnes.

Ir zināms, ka BC sintēze ir būtiski atkarīga no barotnes virsmas uz kuras attīstās BC plēve un barotnes tilpuma attiecibas, proti skābekļa pieejamības BC veidošanai. Šīs labi zināms parametrs nav ticis izvērtēts šajā pētījumu stadijā maģistra darba ietvaros, izvēloties kā optimālu literatūras avotos noradītu attiecību – 50 mL / 75 cm^2 (Ruka et al. 2012), kā arī nav ņemts vērā BC produktivitātes aprēķinos. Kā jau minēts iepriekš, ilgāks kultivācijas laiks nodrošinātu lielāku BC sauso svaru, bet ne vienmēr produktivitāti (Q_X).

Pievēršot uzmanību metabolītu izmaiņām barotnēs, *K. rhaeticus* P-1463 10 dienu kultivācijas laikā patērēja aptuveni 7 – 8% no sūkalu barotnes esošas laktozes. Palielinot kultivācijas ilgumu, ir iespējams palielināt arī laktozes patēriņu. Svarīgs novērojums, ka visos eksperimentos baktēriju kultivācijas laikā tika patērēta galaktoze (14.C attēls). Iepriekšējos pētījumos *K. rhaeticus* P-1463 celms bija spējīgs sintezēt BC uz galaktozes, sasniedzot 0,79 g/L un $Y_{P/S}$ 8,2% (Semjonovs et al. 2017b). Neizslēdzot citu skaidrojumu iespējamību, kuri pārbaudāmi tālākos pētījumos, tas varētu nozīmēt, ka baktērijai ir raksturīgs laktozes transports iekššūnas telpā ar tālāko laktozes šķelšanu līdz glikozei un galaktozei. Ar to varētu izskaidrot, kāpēc barotnē netika novērota galaktozes uzkrāšanās, kā tām vajadzētu būt novērojamam, kad baktērijas ārpusšūnas enzīmi šķeltu laktozi, primāri patērējot glikozi, savukārt galaktoze uzskartos barotnē, līdz nebūs patērēta ievērojama daļa no brīvās glikozes. Šādas hipotēzes verificēšanai ir nepieciešams to eksperimentāli apstiprināt turpmākajos pētījumos. Visticamāk visas sūkalu barotnē esošie brīvie monosaharīdi tiek iztērēti pirmajās eksperimenta dienās un tikai tad baktērijas sāk šķelt laktozi (14. attēls). Vienlaicīgi ir

viennozīmīgi konstatēts (5. tabula), ka *K. rhaeticus* P-1463, izmanto galaktozi un laktozi kā vienīgus C avotus mākslīgajā HS barotnē. Tomēr, citā pētījumā tika paradīts, ka *G. xylinus* ATCC 53524 neasimilē galaktozi, un nav novērota BC producēšana uz galaktozes barotnes, neskaitot 0,09 g/L, kas, domājams ir saistāms ar sējmateriāla palieku klātbūtni analizējamajā kultūršķidrumā (Mikkelsen et al. 2009), kas liecina par šīs tehnoloģiski svarīgas īpašības specifiskumu konkrētajam producenta celmam. Lai būtu iespējams iegūt viennozīmīgi interpretējamus datus par ogļhidrātu metabolisma ceļiem, tiek turpināti *K. rhaeticus* P-1463 metabolisma pētījumi, ieskaitot arī šī celma genoma struktūras izpēti izpētes turpmākos posmos.

Salīdzinot organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) sintēzi uz HS un sūkalu barotnēm, var konstatēt, ka uz sūkalu barotnes etiķskābes un glikonskābes uzkrāšanās notika ievērojami lēnāk (15. attēls). BC sintēze notiek paralēli šūnu biomasas sintēzei (Hornung et al. 2007), kā redzams 13. attēlā BC sintēze ir mazāka sūkalu barotnē, mazāka ir arī skābju sintēze (16. attēls). Spriežot pēc pH mērījumiem, var konstatēt, ka sūkalu barotnē pH kritums notika lēnāk nekā HS barotnē (no 5,97 ± 0,01 līdz 3,54 ± 0,02) nesamazinoties zem pH = 5,72 ± 0,03. Tas ir saistīts ar mazāku organisko skābju sintēzi sūkalu barotnē. Rēķinot produktu iznākumu ($Y_{P/S}$), sūkalu barotnē notiek efektīvāka substrāta konversija par BC salīdzinājuma ar HS vai manitola barotnēm, vienlaicīgi, organisko skābju iznākums no substrāta sūkalu barotnē (4,89%) ir zemāks, salīdzinot ar skābju iznākumu no substrāta vienības HS un manitola barotnēs (8,4 % un 14,92% attiecīgi). Tas varētu liecināt par to, ka, kaut arī sūkalu barotnē BC sintēze ir mazāka, tomēr substrāts tiek patērēts efektīvāk tieši BC sintēzei, nevis organisko skābju sintēzei.

Šobrīd trūkst pētījumu par sūkalas pirmsapstrādes iespējām ar mērķi uzlabot BC sintēzi (Kolesovs and Semjonovs 2020). Bieži trūkst datu par sūkalas esošo vielu koncentrācijām, piemēram, laktozes, galaktozes un proteīnu koncentrācijām. Svarīgi atzīmēt, ka sūkalu sastāvs ir diezgan mainīgs, kas var būtiski ietekmēt eksperimenta rezultātus. Dati par sūkalu sākotnējo sastāvu ne vienmēr ir pārstāvēti pat tajās nedaudzās publikācijās, kas šajā tēmā ir pieejamas (Jozala et al. 2015). Dažreiz arī informācija par sūkalu pirmsapstrādes procedūrām ir nepilnīga, kas arī var ietekmēt BC produktivitātes salīdzinošo izvērtējumu.

Eksperimentu laikā tika konstatēts, ka, lai panāktu lielāku BC ražu, ir svarīgi veikt sūkalu pirmsapstrādi. Liels proteīnu saturs barotnē traucē BC sintēzei (sūkalu termiskās priekšapstrādes eksperimentos), ka arī proteīni var iesaistīties BC struktūrā, kas nav vēlams veidojot produktus no BC. Ir paradīts, ka svarīgs faktors, kas ietekme BC iznākumu ir proteīnu koncentrācija barotnē, kas var mainīties atkarībā no pirmsapstrādes procedūras. Sūkalu termiskās pirmsapstrādes eksperimentā standarta pirmsapstrādes metode, kad sūkalas sākuma tika karsētas, tāds centrifugētas un beigās autoklavētas, paradīja savu efektivitāti, jo tika novērots lielākas BC sausais svars (1,78 ± 0,04 g/L) (24. attēls). Standarta pirmsapstrādes procedūras rezultātā proteīnu koncentrācija samazinās no ~8 līdz ~3 g/L, kas veicināja BC veidošanos, salīdzinājumā ar citām pirmsapstrādes metodēm (24. attēls). Proteīnu koncentrācija bija vienīgais parametrs, kas izmainījās sūkalu standarta pirmsapstrādes rezultātā. Piena pārstrādes ražošanas mērogos izdalītus proteīnus potenciāli var izmantot citu produktu veidošanai, piemēram iegūstot kazeīnu, sūkalu olbaltumvielu koncentrātus u.c.

Sūkalu hidrolītiskā pirmsapstrāde paradīja, ka enzimātiskā hidrolīze var būtiski palielināt BC sauso svaru (līdz 2,41 ± 0,04 g/L). Arī citos pētījumos ir secināts, ka sūkalu laktozes enzimātiskā pirmsapstrāde ar β-galaktozidāzes enzīmu palielina BC sauso svaru (Das et al. 2015; Salari et al. 2019) (8. tabula). BC iznākums $Y_{P/S}$ enzimātiskās hidrolīzes gadījumā bija zemāks (20,93%) nekā sūkalu kontroles paraugam (36,42%) ar standarta pirmsapstrādi bez piedevām. Ņemot vērā to, ka organisko skābju produkcija enzimātiski apstrādātajiem paraugiem nebija lielāka par skābju produkciju sūkalu kontroles paraugiem, iespējams, ka BC produktivitāte bija zemāka dēļ tā, ka substrāts tika patērēts vairāk biomasas vai eksperimenta gaitā nekontrolētu metabolītu veidošanai. Eksperimenta laikā tika konstatēts, ka laktozes koncentrācija enzimātiskās hidrolīzes rezultātā samazinājās no 47,98 ± 0,74 līdz 39,62 ± 0,83 g/L, kas atbilst aptuveni 17,43 % hidrolizētas laktozes (29. attēls). No tā var secināt, ka sūkalu hidrolīzes pakāpe bija relatīvi zema, kas liek turpināt pētījumus sūkalu enzimātiskās hidrolīzes procesa optimizēšanai, kas savukārt nodrošinātu lielāku BC sintēzi. Tomēr ir jāatzīmē, ka enzimātiskā pirmsapstrāde rūpnieciskos ražošanas mērogos ir samērā dārga (Rollini et al. 2020), un varētu būtiski palielinātu BC ražošanas izmaksas, jā šīs papildus izmaksas neatsver būtiski lielāku BC sintēzi. Šobrīd literatūrā šīs metodes izmantošana BC iegūšanai nav pietiekami labi aprakstīta, tāpēc tiek turpināti maģistra darba ietvaros uzsākti pētījumi. Cita metode, kas varētu uzlabot laktozes hidrolīzi sūkalās ir tās hidrolītiskā apstrāde ar skābēm. Eksperimentā tika izmantota H_2SO_4, un divi dažādi apstrādes laiki: 1,5 stunda un trīs stundas. Hidrolīzes rezultātā 1,5 stundu grupai laktozes koncentrācija barotnē samazinājās no 47,98 ± 0,74 līdz 45,09 ± 0,01 g/L, kas atbilst aptuveni 6,4% hidrolizētas laktozes. Otrajā grupā hidrolīzes pakāpe sasniedza 25%, laktozei samazinoties līdz 36,62 g/L. Tas ir augstāka hidrolīzes pakāpe,

kas tika sasniegta eksperimentu gaitā. Var konstatēt, ka ilgāks hidrolīzes laiks noved pie augstākas hidrolizācijas pakāpes. Neskatoties uz to, skāba hidrolīze paradīja zemāku BC iznākumu salīdzinājuma ar enzimātisko hidrolīzi un kontroles paraugiem. Trīs stundu hidrolīzes grupā 10. dienā pat netika patērēti visi monosaharīdi. Tas varētu būt saistīts ar to, ka H_2SO_4 ir agresīva skābe, kas šim mērķim nav labi piemērota. Neitralizējot šo skābi, barotnē varēja izveidoties pārāk augsta sāļu koncentrācija, kas inhibēja baktērijas augšanu un BC sintēzi. Tiek turpināti pētījumi dažādu, tostarp organisko skābju (piemēram, pienskābe vai etiķskābe) ietekmes noteikšanai uz sūkalu hidrolīzes procesu (koncentrācijas, pH līmenis, laiks, temperatūra) – tāda režīma atrašanai kas nodrošinās maksimālus BC iznākumus. Viens no iemesliem pieticīgajam BC iznākumam pēc sūkalu hidrolītiskās apstrādes ar H_2SO_4 varētu būt Maillarda reakcijas produktu rašanās, kuras pamatā ir aminoskābju un cukuru savstarpēja reakcija, kas var traucēt baktērijām metabolizēt barotnē esošus oglekļa avotus (Einarsson et al. 1983). Tuvākajos eksperimentos plānots izmantot zemāku hidrolīzes temperatūru, palielinot hidrolīzes laiku. Kā jau teikts, literatūras dati liecina, ka enzimātiskā hidrolīze palīdz sašķelt laktozi līdz glikozei un galaktozei, palielinot BC iznākumu (Das et al. 2015), tomēr uz doto brīdi trūkst datu par skābju hidrolīzes izmantošanu ar mērķi iegūt BC uz sūkalu barotnes.

Eksperimentāli tika noteikta piedevu ietekme uz sūkalu barotni. Tika konstatēts, ka liellopu gaļas bakterioloģiskais peptons, rauga ekstrakts un melase ievērojami palielina BC sintēzi, savukārt $NH_4H_2PO_4$ pievienošana to samazināja , salīdzinot ar kontroles paraugiem (23. attēls). It īpaši labi BC sausa svara pieaugumu var redzēt sūkalu un melases kombinētajā barotnē (2,7 ± 0,02 g/L). Tas ir augstākais BC iznākums uz sūkalām, kas tika panākts uz sūkalu barotnes šo eksperimentu ietvaros. Augstāks BC sausais svars šajā grupā varētu būt saistīts ar to, ka izmainījās C / N attiecība barotne, ka arī tika ievadīti papildus augšanas faktori (Rouabhia et al. 2014). Melasē esoša saharoze tika izmantota kā galvenais C avots (35. attēls) un sūkalās esošas aminoskābes kā N avots. Domājams arī, *K. rhaeticus* P-1463 efektīvāk hidrolizē saharozi salīdzinot ar laktozi. Melase ir cukura ražošanas blakusprodukts lauksaimniecības ar plašām pielietošanas iespējām biotehnoloģijās, kā arī lopkopībā (Keshk et al. 2006). Šo divu ražošanas blakusproduktu izmantošana varētu ne tikai samazināt BC ražošanas izmaksas, bet arī samazināt vides piesārņojumu, ko abas šīs vielas rada ja tiek utilizētas neefektīvi. Pētījumi ar optimālas C / N attiecības noteikšanu sūkalu / melases barotnei turpinās, jo sagaidāms, ka tas var ievērojami palielināt BC iznākumu (Zhong, 2013). $NH_4H_2PO_4$ izmantošana samazināja BC sintēzi. Potenciāli $NH_4H_2PO_4$ varēja kalpot kā lēta piedeva sūkalu barotnei, tomēr arī citā pētījumā konstatēts, ka šī savienojuma pievienošana pazeminēja BC iznākumu (Yodsuwan et al. 2012).

Uz doto brīdi turpinās BC iegūšana uz HS un sūkalām ar mērķi noteikt un salīdzināt iegūta materiāla fizikālas un mehāniskās īpašības, jo ir zināms, ka substrāts var būtiski ietekmēt tās, piemēram, sūkalu izmantošana kā substrātu, var samazināt BC kristāliskuma indeksu un to mehānisko izturību (Revin et al. 2018). Fizikālo un mehānisko īpašību izmaiņas var lielā mērā ietekmēt vēlama galaprodukta īpašības.

Kopumā var konstatēt kā sūkalas, neveicot to pirmsapstrādi vai/un sastāvā optimizēšanu ir samērā problemātisks BC sintēzes avots. BC iznākums uz sūkalām ir ievērojami zemāks nekā uz glikozi vai manitolu saturošām barotnēm (HS). Neskatoties uz to, iznākums $Y_{P/S}$ sūkalu barotnē ir augstāks nekā standarta HS un manitola barotnēs. Tika konstatēts, ka enzimātiskā hidrolīze uzlaboja BC sintēzi, tomēr ņemot vērā, ka enzīmu izmantošana rūpnieciskos procesos rada samērā lielas papildus ražošanas izmaksas, tā atrisinās galveno problēmu, kas ir saistīta ar BC augstām ražošanas izmaksām vienīgi gadījumā, ja šīs izmaksas atsver ievērojami augstāki BC iznākumi. Šobrīd tiek turpināti pētījumi skābju hidrolīzes procesa optimizēšanai, kas domājams, ļaus palielināt BC iznākumu, vienlaicīgi pārmērīgi nepalielinot ražošanas izmaksas. Savukārt, melases izmantošana, kas arī ir pārtikas rūpniecības blakusprodukts, varētu ievērojami palielināt BC veidošanos pateicoties izmaiņām C / N attiecībā, vieglāk asimilējamu cukuru un papildus augšanas faktoru pieejamībai. Šobrīd tiek turpināti pētījumi sūkalu kombinēto barotņu sastāva un pirmsapstrādes procedūru optimizēšanai.

Secinājumi

1. Starp izvērtētajiem BC producējošiem celmiem *K. rhaeticus* P-1463 celms ir vislabāk piemērots BC iegūšanai uz sūkalām;
2. *K. rhaeticus* P-1463 izmanto galaktozi un laktozi kā vienīgos C substrātus mākslīgajā HS barotnē, kā arī sūkalās BC sintēzei;
3. Sūkalas kā alternatīvā barotne ir piemērotas BC iegūšanai, kaut arī nodrošina par aptuveni 40 – 50% mazāku BC produktivitāti Q_X nekā standarta HS barotnē ar glikozi;
4. BC iznākums $Y_{P/S}$ no patērēta substrāta vienības sūkalu barotnē bez piedevām un hidrolīzes paņēmienu pielietošanas bija augstāks nekā uz standarta HS barotnes par 40 – 50 %;
5. BC produktivitāti Q_X var būtiski uzlabot (par 33,2%), veicot sūkalu pirmsapstrādi, tai skaitā tās pakļaujot enzimātiskajai pirmsapstrādei ar β-galaktozidāzi, kā arī pievienojot papildus augšanas faktorus, kur vislabāko efektivitāti (par 40,8%) nodrošina melases pievienošana.

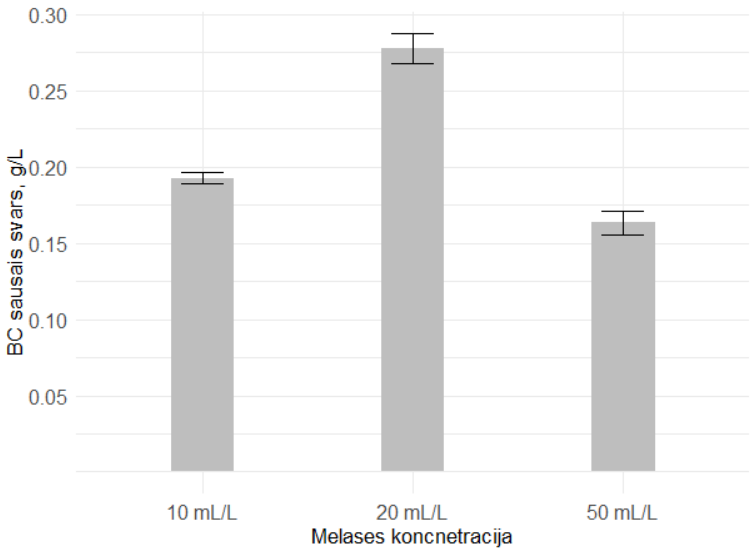
Melase kā alternatīvs avots bakteriālās celulozes iegūšanai

Rezultāti un diskusija

Optimālas melases koncentrācijas noteikšana bakteriālās celulozes sintēzei

Šajā eksperimentā tika noteikta optimālā melases koncentrācija BC iegūšanai. Eksperimentā tika izmantots *K. rhaeticus* P-1463 celms. Bija savstarpēji salīdzināta BC sintēze trim melases koncentrācijām (10 mL/L, 20 mL/L un 50 mL/L). Iegūtie dati liecina, ka lielākā BC sintēze bija novērota uz melases koncentrācijas 20 mL/L, kas atbilst 0,28 ± 0,09 g/L iegūtās BC. Mazākā BC sintēze bija novērota uz melases koncentrācijas 50 mL/L, kas atbilst 0,16 ± 0,08 g/L (4. attēls). Ir zināms, ka pārmērīgi augsta cukuru koncentrācija var samazināt polimēru sintēzi (Machado et al. 2018).

3. attēls. Statiski audzēta BC dažādu melases koncentrāciju barotnēs.

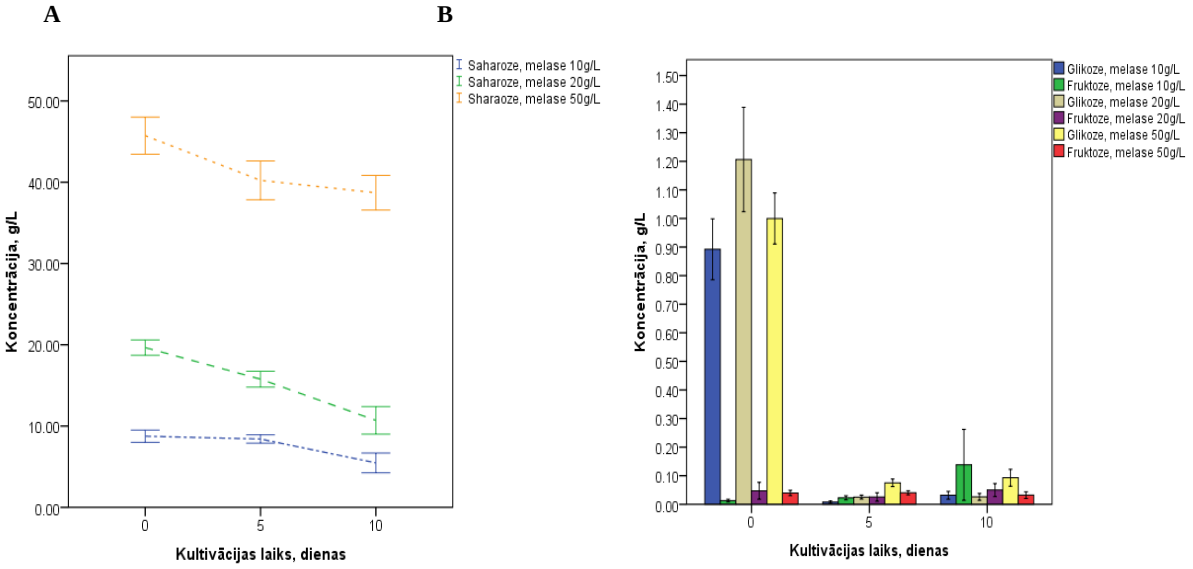


4. attēls BC sausais svars uz melases barotnes ar dažādām melases koncentrācijām (10 mL/L, 20 mL/L un 50 mL/L), izmantojot *K. rhaeticus* P-1463 celmu pēc 10 kultivācijas dienām.

Ogļhidrātu (saharozes, glikozes un fruktozes) koncentrācijas izmaiņas ir apkopotas 6. attēlā. Analizējot saharozes un tās hidrolīzes produktu koncentrācijas izmaiņas, var secināt, ka lielākais saharozes patēriņš tika novērots barotnē ar melases koncentrāciju 20 mL/L no 19,65 ± 0,20 g/L līdz 10,70 ± 0,25 g/L (6. attēls). Pēc eksperimentā iegūtajiem datiem var redzēt, ka barotnē ar melases koncentrāciju 20 mL/L 10 dienu laikā glikozes koncentrācija samazinājās no 1,21 ± 0,35 g/L līdz 0,03 ± 0,01 g/L, bet fruktozes koncentrācija palika nemainīga 0,05 ± 0,01 g/L (p = 0,1). No iegūtajiem datiem var secināt, ka pie

melases daudzuma 20 mL/L tiek sintezēts vairāk BC nekā pie pārējām koncentrācijām. Melases koncentrācija 20 mL/L atbilst aptuveni 20 g/L saharozes koncentrācijai barotnē. Salīdzinot ar literatūras avotiem, vairākos pētījumos tika ņemta 20 g/L (Keshk et al. 2006; Esin Poyrazoğlu Çoban 2011; Machado et al. 2018), kas ļauj sasniegt BC sauso svaru 4,01 g/L (Machado et al. 2018). Apskatot attēlus, var konstatēt, ka saharoze un tās hidrolīzes produkti ir piemērots oglekļa avots BC iegūšanai. Tālākajos eksperimentos tika izmantota melases koncentrācija 20 mL/L. Svarīgi atzīmēt, ka šajos pētījumos tika modificēta HS barotne, aizvietojot glikozi ar melasi, tāpēc, salīdzinot ar literatūras avotiem, būtiski atšķiras sintezētā BC daudzums (Keshk et al. 2006; Esin Poyrazoğlu Çoban 2011; Machado et al. 2018).

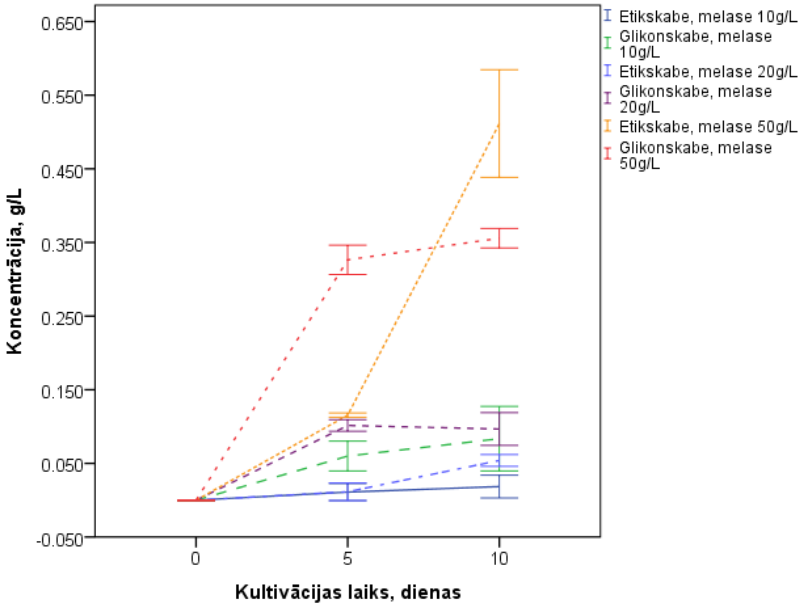
5. attēls. pH noteikšana dažādas koncentrācijas melases barotnēs.



6. attēls. (A) Saharozes koncentrācijas izmaiņas melases barotnē eksperimenta laikā, izmantojot *K. rhaeticus* P-1463 celmu; (B) monosaharīdu (glikozes un fruktozes) koncentrācijas izmaiņas melases barotnē eksperimenta laikā, izmantojot *K. rhaeticus* P-1463 celmu.

Organisko skābju koncentrācijas izmaiņas ir apkopotas 7. attēlā. Pēc iegūtajiem datiem var redzēt, ka vairāk organisko skābju veidojās melases barotnē ar koncnetrāciju 50 mL/L. Kultivācijas beigās etiķskābes daudzums bija 1,01 ± 0,15 g/L, bet glikonskābes daudzums bija 0,36 ± 0,05 g/L. Mazāks organisko skābju daudzums tika novērots melases barotnē ar koncetrāciju 10 mL/L. Etiķskābes daudzums kultivācijas beigās bija 0,02 ± 0,01 g/L un glikonskābes daudzums bija 0,83 ± 0,05 g/L. Ir konstatējams, ka etiķskābes koncentrācija strauji pieaug pēc eksperimenta piektās dienas, bet glikonskābes koncentrācija sāk pieaugt jau no eksperimenta pirmās dienas, bet, sākot no piektās dienas, tās pieaugums palēninās. Barotņu pH mainījās

proporcionāli skābju koncentrācijas pieaugumam. Kā arī ir iespējams novērot to, ka BC sintēze producentam ir paralēla skābju sintēzei barotnē.

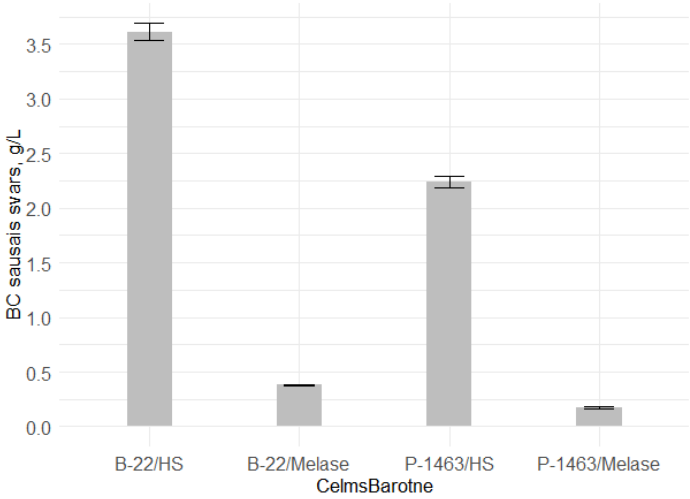


7. attēls. Organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrācijas izmaiņas melases barotnē eksperimenta laikā, izmantojot *K. rhaeticus* P-1463 celmu.

Efektīvākā bakteriālās celulozes producenta izvēle

Šajā eksperimentā tika noteikts celms, kas ir piemērotāks BC iegūšanai kā substrātu, izmantojot melasi. Bija savstarpēji salīdzināts BC iznākums diviem celmiem (*K. rhaeticus* P-1463 un *K. hansenii* B-22) uz standarta HS un melases barotnes. Datu statistiskā analīze parādīja, ka lielākā BC sintēze uz melases bija novērojama *K. hansenii* B-22 celmam, kas atbilst 0,38 ± 0,01 g/L BC. Lielākais BC iznākums uz standarta HS barotnes arī tika novērots *K. hansenii* B-22 celmam, kas atbilst 3,61 ± 0,1 g/L BC (9. attēls). Eksperimentā, izmantojot iepriekš noteikto optimālo melases koncentrāciju (20 mL/L), tika noteikts efektīvākais BC producents, kas ir *K. hansenii* B-22 celms. Otrs producenta celms *K. rhaeticus* P-1463 uzrādīja mazāku BC sintēzi par *K. hansenii* B-22 celmu abās barotnēs. HS barotnē sintezētais BC daudzums ir lielāks salīdzinājumā ar melases barotnē sintezēto BC daudzumu, jo melases barotnē var trūkt N avoti, kas inhibē baktērijas augšanu. Lai uzlabotu BC sintēzi, ir nepieciešams palielināt N koncentrāciju barotnē, mainot tās C / N attiecību, kas pašlaik ir novirzīta ievērojami vairāk uz C pusi (Zhang et al. 2016).

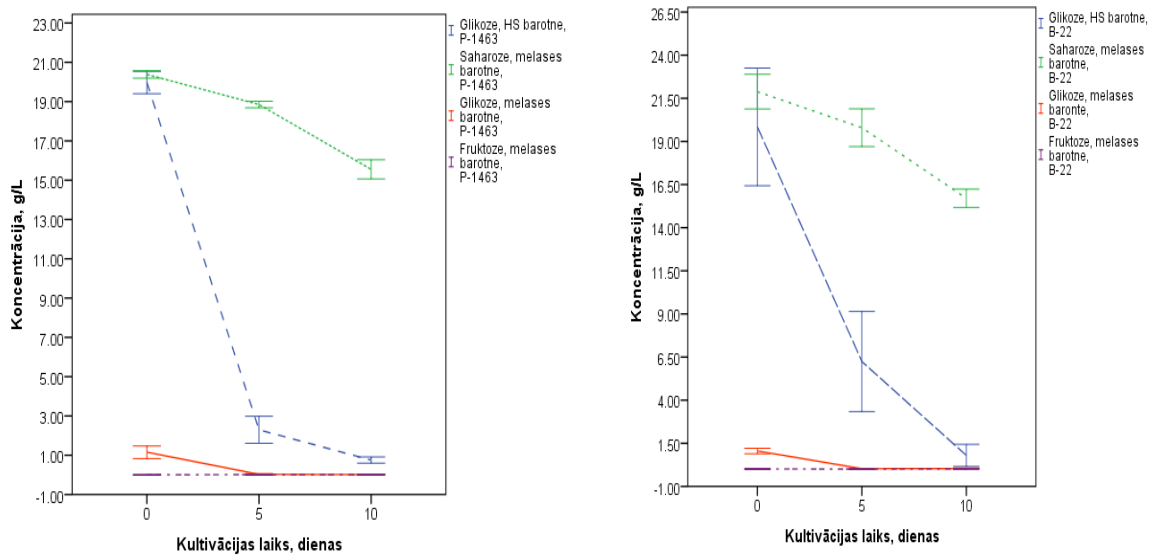
8. attēls. Uzglabāti melases paraugi saldētavā tālākām metabolītu pārbaudēm.



9. attēls. BC sausais svars uz melases barotnes, izmantojot dažādus celmus – *K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22 pēc 10 kultivācijas dienām.

Ogļhidrātu (saharozes, glikozes un fruktozes) koncentrācijas izmaiņas ir attēlotas 10. attēlā. Analizējot saharozes un tās hidrolīzes produktu koncentrācijas izmaiņas, var secināt, ka lielākais saharozes patēriņš melases barontē tika novērots *K. hansenii* B-22 no 22,66 ± 0,4 g/L līdz 15,41 ± 0,3 g/L (B). Pēc eksperimentā iegūtajiem datiem var redzēt, ka *K. hansenii* B-22 celmam melases barotnē 10 dienu laikā glikozes koncentrācija samazinājās no 1,05 ± 0,05 g/L līdz 0,03 ± 0,01 g/L, bet fruktozes koncentrācija palika nemainīga 0,15 ± 0,01 g/L.

A **B**

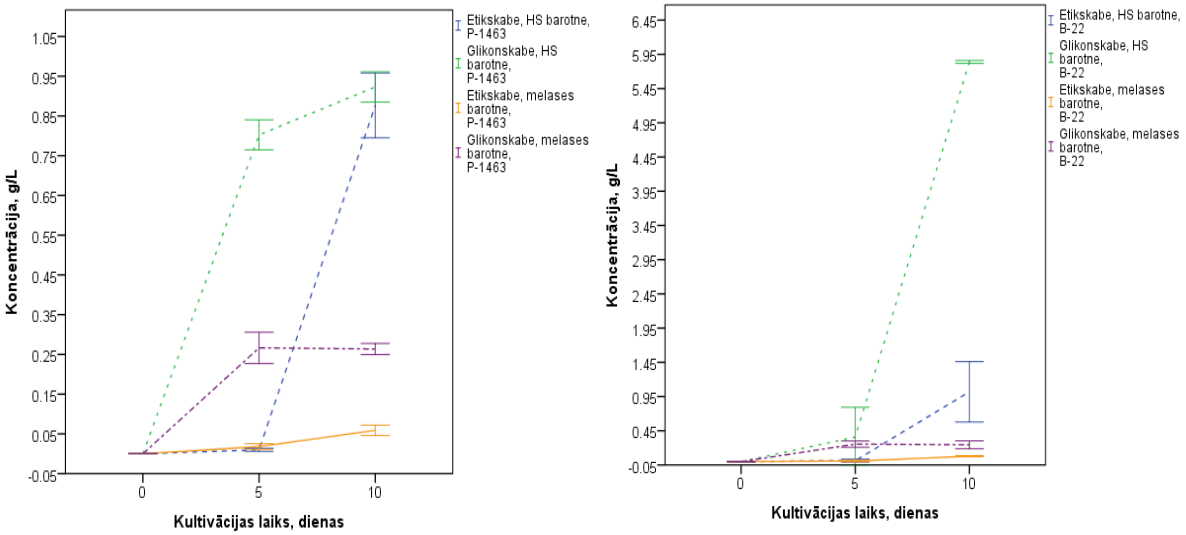


10. attēls. Ogļhidrātu (saharozes, glikozes un fruktozes) koncentrācijas izmaiņas standarta HS barotnē un melases barotnē *K.rhaeticus* P-1463 un *K. hansenii* B-22 celmiem eksperimenta laikā.

Organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) izmaiņas ir apkopotas 11. attēlā. Pēc iegūtajiem datiem var secināt, ka HS barotnē tika novērota ievērojami lielāka organisko skābju uzkrāšana eksperimenta laikā nekā melases barotnē. *K. hansenii* B-22 celmam etiķskābes koncentrācija būtiski (p = 0,05) palielinājās no 0,03 ± 0,01 g/L līdz 1,02 ± 0,45 g/L un glikonskābes koncentrācija palielinājās no 0,02 ± 0,01 g/L līdz 5,83 ± 0,1 g/L. Ir vērojams, ka etiķskābes koncentrācija strauji pieaug pēc eksperimenta piektās dienas, bet glikonskābes koncentrācija sāk pieaugt jau no eksperimenta pirmās dienas, bet, sākot no piektās dienas, tās pieaugums palēlinās.

A **B**

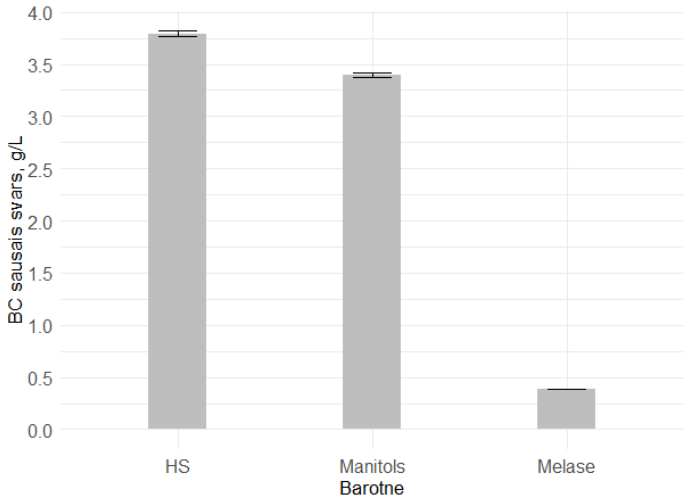
11. attēls. Organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes)



koncentrācijas izmaiņas *K.rhaeticus* P-1463 un *K. hansenii* B-22 celmiem eksperimenta laikā.

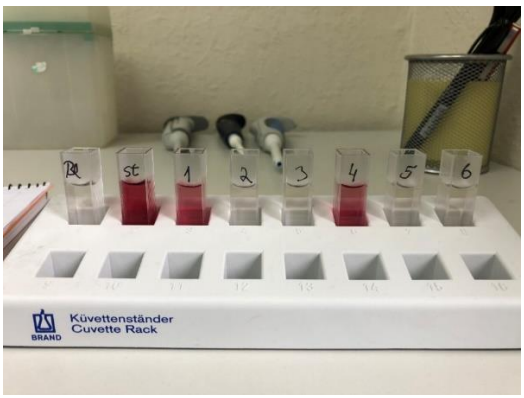
Apskatot metabolītu grafikus, ir iespējams konstatēt, ka saharoze un tās hidrolīzes produkti ir piemērots oglekļa avots BC iegūšanai. Kā arī ir iespējams novērot to, ka BC sintēze producentiem ir paralēla skābju sintēzei barotnēs. Tālākos eksperimentos tika izmantots *K. hansenii* B-22 BC producējošais celms.

Šajā eksperimentā tika salīdzināta melases barotne ar HS barotni un manitola barotni. Datu statistiskā analīze parādīja, ka lielākā BC sintēze 3,79 ± 0,15 g/L bija novērota uz standarta HS barotnes. Uz manitola barotnes BC sintēze bija novērota līdzīga kā uz standarta HS barotnes 3,40 ± 0,1 g/L. Mazākā BC sintēze bija novērota uz melases barotnes 0,39 ± 0,05 g/L (12. attēlā). Šajā eksperimentā tika izmantota optimālā melases koncentrācija 20 mL/L un par efektīvāku atzīts BC producents *K. hansenii* B-22. Tika novērots, ka manitola barotne kalpoja kā laba alternatīva barotne BC iegūšanai. Salīdzinot ar literatūru, var konstatēt, ka manitola barotne var kalpot kā laba alternatīva barotne HS standarta barotnei BC iegūšanai. Pētījumā ar *Acetobacter xylinum* KU-1 uz manitola barotnes tika iegūts 2,8 g/L BC (Oikawa et al. 1995). Melases barotne kā alternatīva barotne uzrādīja zemākus BC sintēzes rezultātus nekā manitola barotne, kas arī ir alternatīva barotne standarta HS barotnei. Apskatot 14. attēlu ir iespējams konstatēt, ka saharoze un tās hidrolīzes produkti ir piemērots oglekļa avots BC iegūšanai. Kā arī ir iespējams novērot to, ka BC sintēze producentam ir paralēla skābju sintēzei visās barotnēs. Pēc iegūtajiem rezultātiem tika noskaidrots, ka melases barotnei ir nepieciešama modifikācija, lai BC sintēze uz tās būtu vismaz tik pat efektīva kā uz standarta HS un manitola barotnēm.

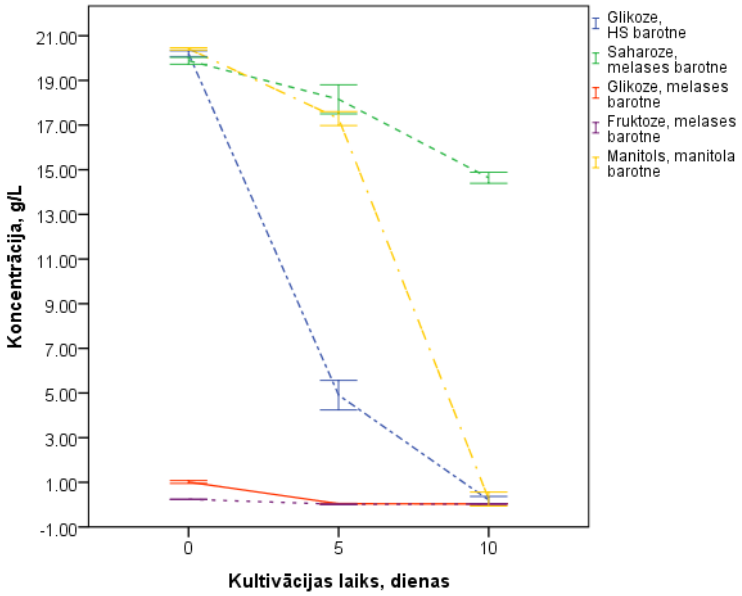


12. attēls. BC sausais svars uz standarta HS barotnes, manitola barotnes un melases barotnes, izmantojot *K. hansenii* B-22 celmu pēc 10 kultivācijas dienām.

Ogļhidrātu (saharozes, glikozes un fruktozes) un manitola koncentrāciju izmaiņas ir attēlotas 14. attēlā. Analizējot saharozes un tās hidrolīzes produktu izmaiņas, var secināt, ka saharozes, glikozes un fruktozes patēriņš melases barotnē nav būtiski (p = 0,05) atšķirīgs, salīdzinot ar iepriekšējiem eksperimentiem.

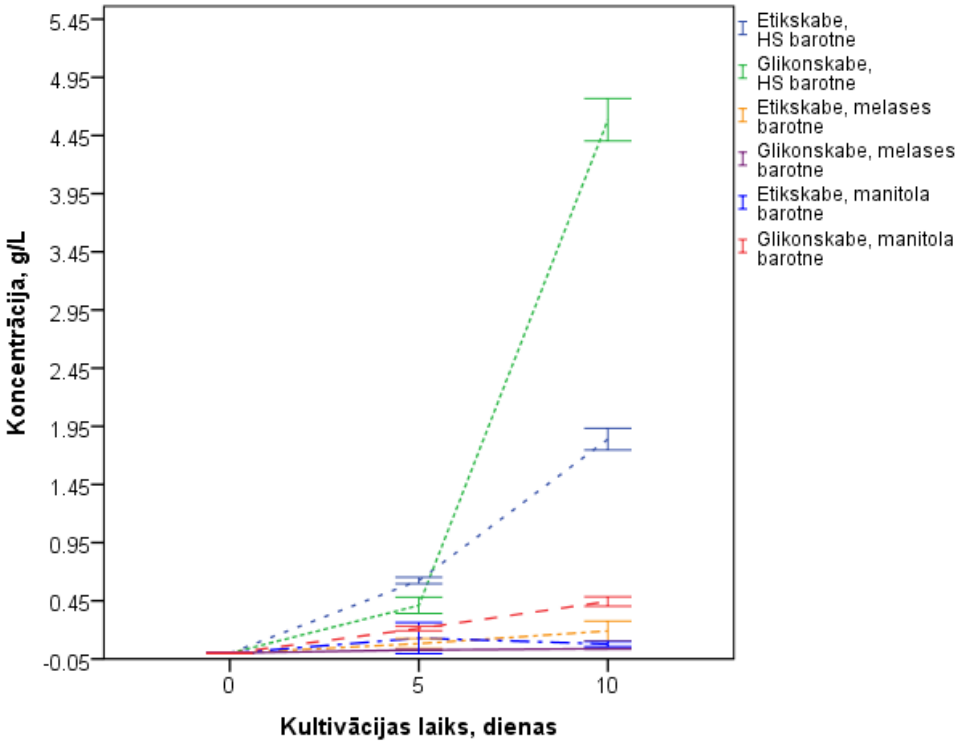


13. attēls. Glikozes pierādīšana barotņu paraugos.



14. attēls. Ogļhidrātu (saharozes, glikozes un fruktozes) un manitola izmaiņas standarta HS barotnē, manitola barotnē un melases barotnē, izmantojot *K. hansenii* B-22 celmu eksperimenta laikā.

Organisko skābju izmaiņas ir apkopotas 15. attēlā. Pēc iegūtiem datiem var redzēt, ka standarta HS barotnē tika novērota ievērojami lielāka organisko skābju uzkrāšanās eksperimenta laikā nekā melases barotnē un manitola barotnē. Kultivācijas beigās standarta HS barotnes etiķskābes koncentrācija bija 1,95 ± 0,15 g/L un glikonskābes koncentrācija 4,78 ± 0,15 g/L. Melases barotnē etiķskābes un glikonskābes koncentrācijas bija mazākas nekā manitola barotnē. Melases barotnē pēc kultivācijas etiķskābes koncentrācija bija 0,50 ± 0,05 g/L un glikosnkābes koncentrācija 0,92 ± 0,05 g/L. Manitola barotnē etiķskābes koncnetrācija bija 0,08 ± 0,01 g/L un glikonskābes koncentrācija 0,44 ± 0,05 g/L. Ir vērojams, ka etiķskābes koncentrācija strauji pieaug pēc eksperimenta piektās dienas, bet glikonskābes koncentrācija sāk pieaugt jau no eksperimenta pirmās dienas, bet, sākot no piektās dienas, tās pieaugums palēlinās.



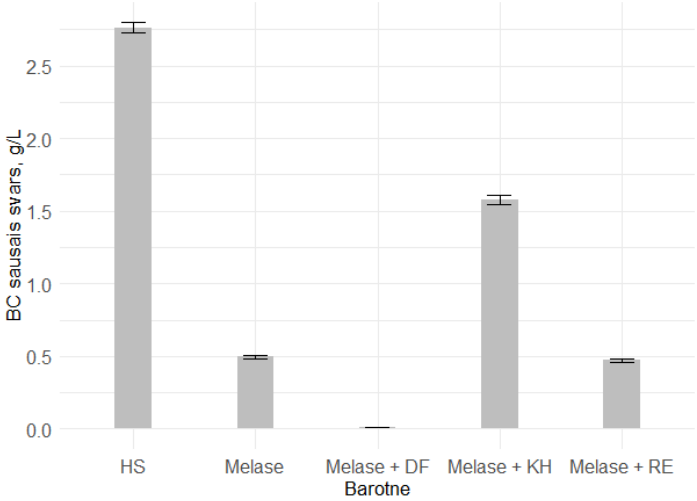
15. attēls. Organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrācijas izmaiņas standarta HS barotnē, manitola barotnē un melases barotnē, izmantojot *K. hansenii* B-22 celmu eksperimenta laikā.

Melases barotnes sastāva optimizēšana

Šajā eksperimentā tika modificēta melases barotne, tai pievienojot dažādus slāpekļa un augšanas faktoru avotus. Melases barotnei tika pievienots: rauga ekstrakts (RE), diamonija fosfāts (DF) un kazeīna hidrolizāts (KH). Datu statistiskā analīze parādīja, ka lielākā BC sintēze uz modificētas melases barotnes bija novērota, pievienojot barotnei kazeīna hidrolizātu, kas atbilst 1,58 ± 0,05 g/L BC, kas ir par 70,25% vairāk nekā uz tīras melases barotnes (17. attēls). Pievienojot melases barotnei rauga ekstraktu, BC sintēzes iznākums būtiski (p = 0,05) neatšķīrās no melases barotnes bez piedevām – 0,47 ± 0,05 g/L. BC sintēze netika novērota, melases barotnei pievienojot diamonija fosfātu.

Šajā eksperimentā izmantoja optimālo melases koncentrāciju 20 mL/L un optimālo BC producentu *K. hansenii* B-22. Kazeīna hidrolizāta pievienošana būtiski (p = 0,05) palielināja BC sintēzi, jo kazeīna hidrolizāts kalpo kā optimāls N avots (Yodsuwan et al. 2012). Pievienojot rauga ekstraktu melases barotnei, BC sintēze nepalielinājās un rauga ekstrakts nekalpoja kā optimāls N avots. Pievienojot melases barotnei diamonija fosfātu, BC sintēze netika novērota, kas liecina, ka diamonija fosfāts nav piemērots N avots melases barotnei. Līdzīgi kā (Yodsuwan et al. 2012) pētījumā, kurā barotnei pievienoja kazeīna hidrolizātu, tika panākts lielāks BC pieaugums. Apskatot cukuru koncentrācijas izmaiņas (18. attēls A), ir iespējams konstatēt, ka saharoze un tās hidrolīzes produkti ir piemērots oglekļa avots BC iegūšanai. Kā arī ir iespējams novērot to, ka BC sintēze producentam ir paralēla skābju sintēzei barotnē. Tiek veikti tālākie pētījumi par melases un kazeīna barotnes optimizāciju.

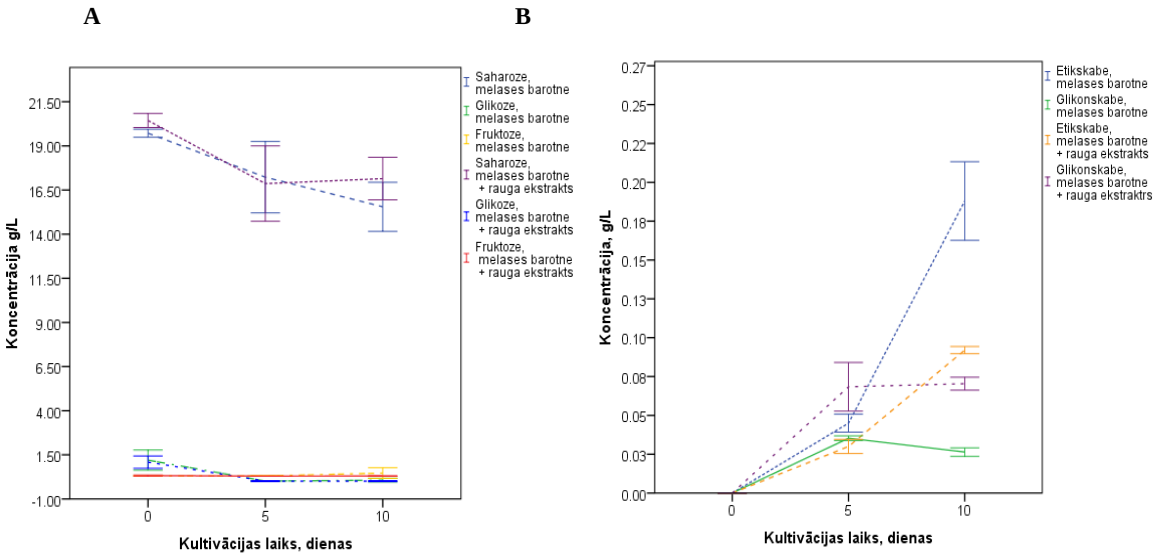
16. attēls. BC statiska audzēšana melases barotnēs ar piedevām.



17. attēls. BC sausais svars uz standarta HS barotnes, melases barotnes un melases barotnēm ar piedevām (DF – diamonija fosfāts, KH – kazeīna hidrolizāts un RE – rauga ekstrakts) pēc 10 kultivācijas dienām.

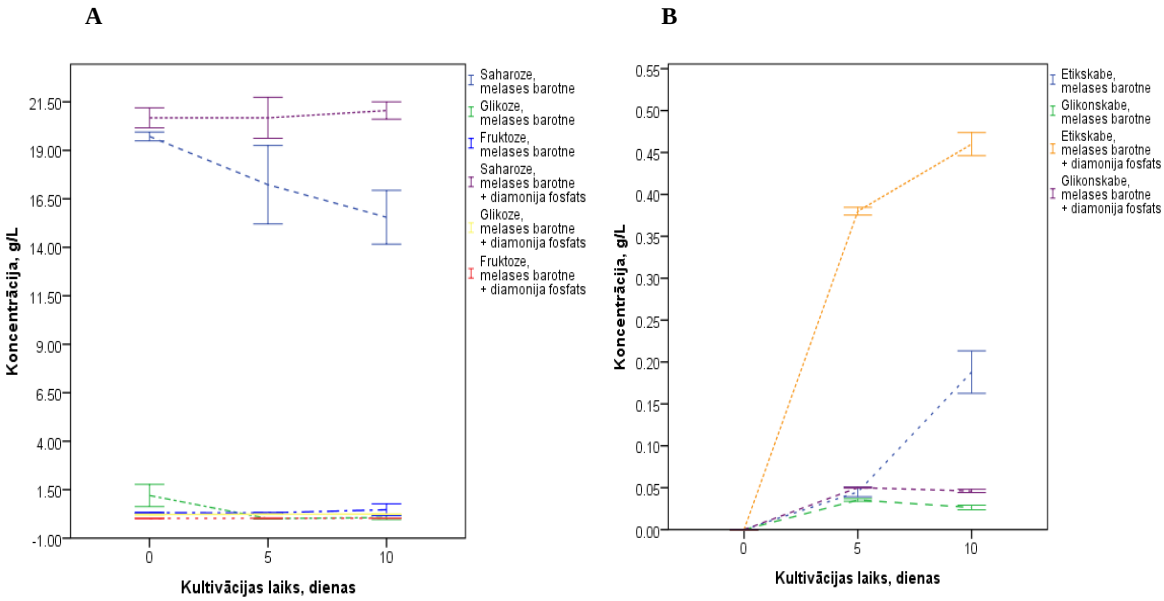
Ogļhidrātu (saharozes, glikozes un fruktozes) un organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrāciju izmaiņas ir apkopotas 18. attēlā. Analizējot saharozes un tās hidrolīzes produktu koncentrācijas izmaiņas eksperimenta laikā, var secināt,

ka melases barotnē ar RE piedevu saharozes patēriņš būtiski (p = 0,05) neatšķiras no tīras melases barotnes saharozes patēriņa līdz kultivācijas piektajai dienai, pēc tam melases barotne ar RE piedevu saharozes patēriņš apstājas. Glikozes un fruktozes patēriņš būtiski (p = 0,05) neatšķiras starp abām barotnēm. Etiķskābes sintēze melases barotnē ar RE piedevu eksperimenta beigās bija būtiski (p = 0,05) mazāks 0,09 ± 0,01 g/L nekā melases barotnē bez piedevām 0,19 ± 0,05 g/L. Glikonskābes daudzums melases barotnē ar RE piedevu bija lielāks 0,07 ± 0,01 g/L nekā melases barotnē bez piedevām 0,03 ± 0,01 g/L



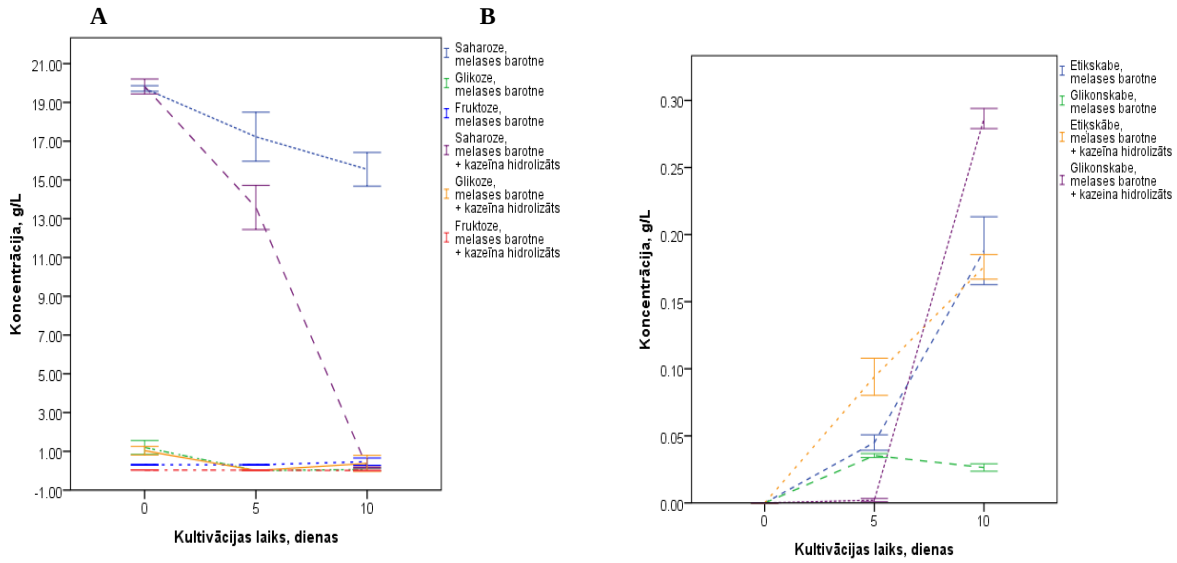
18. attēls. (A) Ogļhidrātu (saharozes, glikozes un fruktozes) koncentrācijas izmaiņas melases barotnē un melases barotnē ar rauga ekstrakta piedevu eksperimenta laikā; (B) organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrācijas izmaiņas melases barotnē un melases barotnē ar rauga ekstrakta piedevu eksperimenta laikā.

Ogļhidrātu (saharozes, glikozes un fruktozes) un organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrāciju izmaiņas ir apkopotas 19. attēlā. Analizējot saharozes un tās hidrolīzes produktu koncentrācijas izmaiņas eksperimenta laikā, var secināt, ka melases barotnē ar DF piedevu saharozes patēriņš būtiski (p = 0,05) atšķiras no tīras melases barotnes saharozes patēriņa. Melases barotnē ar diamonija fosfāta piedevu saharozes, glikozes un fruktozes koncentrācijas eksperimenta laikā nemainījās, jo nenotika BC sintēze. Etiķskābes sintēze melases barotnē ar DF piedevu eksperimenta beigās bija būtiski (p = 0,05) lielāks 0,46 ± 0,05 g/L nekā melases barotnē bez piedevām 0,19 ± 0,05 g/L. Glikonskābes daudzums melases barotnē ar DF piedevu bija nedaudz lielāks 0,05 ± 0,01 g/L nekā melases barotnē bez piedevām 0,03 ± 0,01 g/L.



19. attēls. (A) Ogļhidrātu (saharozes, glikozes un fruktozes) koncentrācijas izmaiņas melases barotnē un melases barotnē ar diamonija fosfāta piedevu eksperimenta laikā; (B) organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrācijas izmaiņas melases barotnē un melases barotnē ar diamonija fosfāta piedevu eksperimenta laikā.

Ogļhidrātu (saharozes, glikozes un fruktozes) un organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrāciju izmaiņas ir apkopotas 20. attēlā. Analizējot saharozes un tās hidrolīzes produktu koncentrācijas izmaiņas eksperimenta laikā, var secināt, ka melases barotnē ar kazeīna hidrolizāta piedevu saharozes patēriņš būtiski (p = 0,05) atšķiras no saharozes patēriņa melases barotnē bez piedevām eksperimenta laikā. Barotnei ar KH piedevu saharozes patēriņš notiek strauji no 19,9 ± 0,10 g/L līdz 0,12 ± 0,05 g/L. Glikozes patēriņš būtiski (p = 0,05) neatšķiras starp abām barotnēm. Fruktozes sākuma koncentrācijas atšķiras starp abām barotnēm, bet dinamika abām saglabājas vienāda.



20. attēls. (A) Ogļhidrātu (saharozes, glikozes un fruktozes) koncentrācijas izmaiņas melases barotnē un melases barotnē ar kazeīna hidrolizāta piedevu eksperimenta laikā; (B) organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrācijas izmaiņas melases barotnē un melases barotnē ar KH piedevu eksperimenta laikā.

Etiķskābes sintēze melases barotnē ar kazeīna hidrolizāta piedevu eksperimenta beigās bija līdzīga tam 0,17 ± 0,05 g/L, kāda tā bija melases barotnē bez piedevām 0,19 ± 0,05 g/L. Glikonskābes daudzums melases barotnē ar kazeīna hidrolizāta piedevu bija būtiski (p = 0,05) lielāks 0,29 ± 0,05 g/L nekā melases barotnē bez piedevām 0,03 ± 0,01 g/L.

Secinājumi

1. Salīdzinot BC producentus, tika konstatēts, ka celms *K. hansenii* B-22 ir vislabāk piemērots BC iegūšanai uz melases barotnes, nodrošinot BC iznākumu 0,28 ± 0,09 g/L
2. Salīdzinot dažādas melases koncentrācijas, tika konstatēts, ka BC sintēzei vislabāk piemērotākā melases koncentrācija ir 20 mL/L.
3. Nemodificēta melase bez barotnes sastāva modificēšanas nav piemērota BC iegūšanai.
4. Modificējot melases barotni ar kazeīna hidrolizāta pievienošanu, tika konstatēta par 70,25% lielāka BC sintēze nekā uz melases barotnes bez piedevām.
5. Abām kultūrām (*K. rhaeticus* P-1463 un *K. hansenii* B-22) BC sintēze ir paralēli proporcionāla skābju (etiķskābes un glikonskābes) sintēzei visās novērtētajās barotnēs.
6. Modificētā melases barotne ar kazeīna hidrolizāta piedevu nodrošina par 55,92% mazāku BC sintēzi, salīdzinot ar HS un manitola mākslīgajām barotnēm par 58,31% un 53,53%, attiecīgi.

Sūkalu skābes hidrolīzes optimizācija

Materiāli un metodes

Iepriekšējos eksperimentos tika konstatēts, ka sūkalu skābes hidrolīzes rezultātā būtiski samazinājās BC sintēze. Šajā mēģinājumā tiks optimizēta sūkalu hidrolīzes metode, kas ļaus samazināt skābes negatīvu ietekmi uz BC sintēzi.

Izmantotais celms: *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463

Sūkalu barotnes hidrolīze ar HCl

Eksperimentā H_2SO_4 skābe tika aizvietota ar HCl, kas tiek uzskatīta par piemērotāku skābi sūkalu hidrolīzei (Coughlin and Nickerson 1975). Sūkalu barotnes hidrolīzes procedūra:

1. Sūkalas vara 10 min +90°C atbilstoši izstrādātai standarta metodei;
2. Pēc karsēšanas sūkalas centrifugē 8 000 rpm 10 min, lai atdalītu izgulsnējušos proteīnus. Tas nodrošina proteīnu kopkoncentrācijas samazināšanu no ~8 g/L līdz ~3 g/L;
3. Barotnei ar pipeti pievieno HCl, līdz pH vērtība samazinās līdz pH = 3;
4. Sagatavotu šķīdumu inkubē +80°C 120 min, ik pēc 10 min sakratot;
5. Pēc hidrolīzes, HCl neitralizē ar 1M NaOH, līdz pH vērtībā sasniedz pH = 7;
6. Veic barotnes sterilizāciju (+121°C 30 min).

Baktēriju kultivācija hidrolizētajā barotnē

1. Sterilajos apstākļos sagatavo 250 mL kolbai pievieno 95 mL atbilstošas barotnes (HS kontrole, sūkalu kontrole, hidrolizētas sūkalas);
2. Barotnei pievieno 5% *K. rhaeticus* inokulātu;
3. Baktēriju kultivācija notiek statiski termostatos +30°C 10 diennaktis;
4. Pēc kultivācijas veic BC atmazgāšanu atbilstoši standarta atmazgāšanas procedūrai.

Datu statistiskā apstrāde

2. tabula

BC sausais svars atkarībā no barotnes veida – aprakstoša statistika.

Kārtas Nr.	Barotnes veids	Vidējā vērtība	Standartnovirze	Atkārtojumi
1.	HS kontrole	3,27	± 0,03	6
2.	Sūkalas - kontrole	2,11	± 0,02	6
3.	Hidrolizētas sūkalas	0,61	± 0,02	6

3. tabula

ANOVA analīzes rezultāti – BC sausais svars atkarībā no barotnes veida.

Gadījumi	Kvadrātu summa	df	Vidēja kvadratīskā vertība	F	p	η^2
Barotnes veids	16,056	2	8,028	3256,269	<0,001	0,998
Atlikums	0,027	11	0,002			

III tipa kvadrātu summa

4. tabula

Post Hoc tests (Bonferoni) – barotnes veidi.

		Vidēja starpība	SE	t	p
1	2	1,156	0,033	34,706	<0,001

	3	2,660	0,033	79,860	<0,001
2	3	1,504	0,031	47,893	<0,001

5. tabula

BC sausais svars atkarībā no hidrolīzes metodes – aprakstoša statistika.

Kārtas Nr.	Barotnes veids	Vidējā vērtība	SD	Atkārtojumi
1.	HCl pH3 120 min	0,61	± 0,02	6
2.	H_2SO_4 pH1 90 min	0,27	± 0,02	5
3.	H_2SO_4 pH1 180 min	0,17	± 0,02	5

6. tabula

ANOVA analīzes rezultāti – BC sausais svars atkarībā no hidrolīzes veida.

Gadījumi	Kvadrātu summa	df	Vidēja kvadrātiskā vērtība	F	p	η^2
Media type	0,437	2	0,218	414,467	<0,01	0,987
Residuals	0,006	11	5,268e-4			

III tipa kvadrātu summa

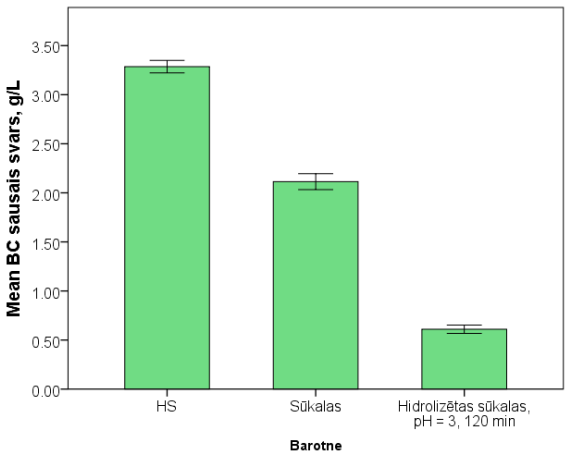
7. tabula

Post Hoc tests (Bonferoni) – hidrolīzes veidi.

		Vidēja starpība	SE	t	p
1	2	0,332	0,015	21,595	<0,01
	3	0,428	0,015	27,830	<0,01
2	3	0,096	0,015	6,613	<0,01

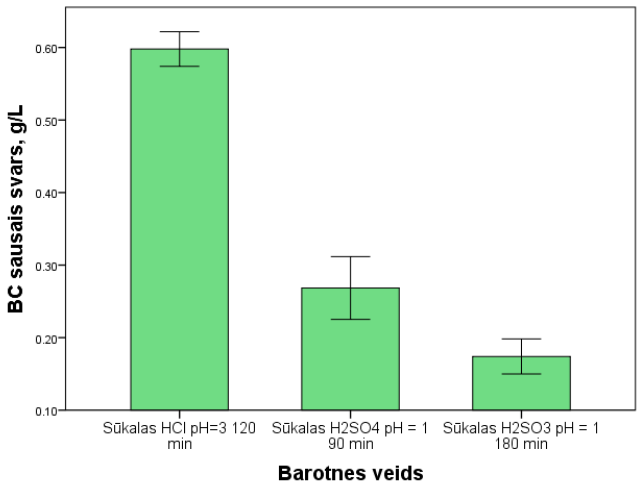
Rezultāti

Eksperimenta rezultāti tika konstatēts, ka sūkalu skābes hidrolīze joprojām nodrošina viszemāko BC sintēzi (0,61 ± 0,02 g/L BC sausa svara) salīdzinājumā ar kontroles grupām (HS un sūkalu barotnēs 3,27 ± 0,03 2,11 ± 0,02 g/L attiecīgi) (5. attēls).



5. attēls. BC sausais svars pēc 10 kultivācijas dienām *K. rhaeticus* P-1463 celmam atkarībā no izmantotas barotnes (standarta HS, nehidrolizētas sūkalas, hidrolizētas sūkalas ar HCl pH = 3).

HCl hidrolīzes procedūra būtiski uzlaboja ($p < 0,01$) BC sintēzi salīdzinājumā ar iepriekšēja eksperimenta rezultātiem (0,27 ± 0,02 g/L H_2SO_4 90 min grupai un 0,173 ± 0,02 g/L H_2SO_4 180 min grupai) (6. attēls). Hidrolizējot sūkalas pēc jaunas metodoloģijas, BC sintēze hidrolizētajā barotnē pieauga uz 54% un 72% salīdzinājumā ar H_2SO_4 90 min grupu un H_2SO_4 180 min grupu attiecīgi. HCl izmantošana sūkalu hidrolīzei ir piemērotāka nekā H_2SO_4. Papildus fermentācijas procesus ietekmēja augstāks hidrolīzes pH (pH = 3) salīdzinājumā ar pirmo eksperimentu (pH = 1). Augstāks pH ļāva neitralizēt skābi ar mazāku NaOH, rezultātā veidojot mazāku sāls (NaCl) daudzumu. Ir zināms, ka NaCl var būtiski ietekmēt baktēriju augšanu, jo tām ir raksturīga antimikrobiālā aktivitāte (Kurita and Koike 1982). Savukārt, hidrolīzes laikā temperatūra nepārsniedza +80°C, kas nepieļāva cukuru karamelizāciju, kas bija novērojama iepriekšējos mēģinājumos. Ir nepieciešams turpināt pētīt atšķirīgu hidrolīzes faktoru ietekmi uz BC sintēzi.



6. attēls. BC sausais svars pēc 10 kultivācijas dienām *K. rhaeticus* P-1463 celmam atkarībā no izmantotas barotnes (hidrolizētas sūkalas ar HCl pH = 3, hidrolizētas sūkalas ar H_2SO_4 pH = 1 90 min, hidrolizētas sūkalas ar H_2SO_4 pH = 1 180 min).

Secinājumi

HCl hidrolizētas sūkalas joprojām nenodrošina optimālu BC sintēzi. Savukārt, HCl hidrolīzes metode ļauj palielināt BC sintēzi salīdzinājumā ar iepriekš izmantotu hidrolīzes metodi ar H_2SO_4. Ir nepieciešama tālāka skābes hidrolīzes metodes optimizācija.

Ābolu sulas kā BC sintēzes substrāta novērtējums

Materiāli un metodes

Ābolu sula var kalpot kā alternatīvs substrāts BC sintēzei, galvenokārt pateicoties augstam cukuru (glikoze, fruktoze, saharoze) daudzumam (Kurosumi et al. 2009). Pašlaik ābolu sulas izmantošana BC sintēzei ir maz izpētīta. Šajā eksperimentā tiks pārbaudīta neapstrādātas ābolu sulas ietekme uz BC sintēzi.

Izmantotais celms: *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463

Ābolu sulas barotnes sagatavošana un baktēriju kultivācija

1. Ar mērcilindru nomēri 0,5 L ābolu sulas;
2. Ābolu sulu pārlej durāna stikla pudelē;
3. Barotni sterilizē (+121°C 30 min);
4. Kultivācijai izmanto 250 mL kolbas ar 47,5 mL ābolu sulas barotni un 5% inokulātu;
5. Baktērijas kultivē statiski termostatos 10 diennaktis +30°C.

Datu statistiskā apstrāde

8. tabula

BC sausais svars atkarībā no barotnes veida – aprakstoša statistika.

Kārtas Nr.	Barotnes veids	Vidējā vērtība	SD	Atkārtojumi
1.	HS kontrole	3,07	± 0,06	5
2.	Ābolu sula	0,156	± 0,01	5

9. tabula

ANOVA analīzes rezultāti – BC sausais svars atkarībā no barotnes veida

Gadījumi	Kvadrātu summa	df	Vidēja kvadrātiskā vērtība	F	p	η^2
Barotnes veids	18,870	1	18,870	10898,4	<0,001	0,999
Atlikumi	0,012	7	0,002			

III tipa kvadrātu summa

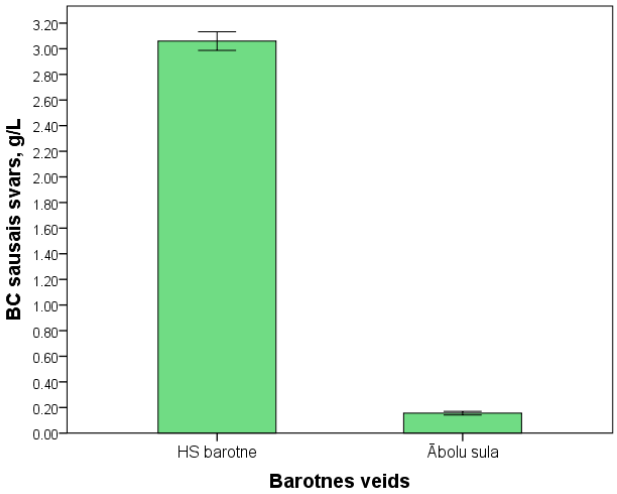
10. tabula

Post Hoc tests (Bonferoni) – barotnes veidi

		Vidēja starpība	SE	t	p
1	2	2,914	0,028	104,395	<0,001

Rezultāti

Eksperimentā tika paradīts, ka ābolu sula var nodrošināt BC sintēzi (0,156 ± 0,01 g/L BC, sausais svars). Tomēr tā ir būtiski zemāka ($p < 0,001$) salīdzinājumā ar standartu HS barotni (3,07 ± 0,06 g/L). Eksperimenta rezultāti ir apkopoti 7. attēlā.



7. attēls. BC sausais svars pēc 10 kultivācijas dienām *K. rhaeticus* P-1463 celmam atkarībā no izmantotas barotnes (standarta HS barotne un ābolu sula).

Iegūtais rezultāts sakrīt literatūrā esošiem datiem (Kurosumi et al. 2009). Par galveno ābolu sulas trūkumu uzskata zemu slāpekļa (N) saturu, kas ir nepieciešams baktēriju augšanai un eksopolisaharīdu sintēzei. Lai uzlabot BC sintēzi, ābolu sulu ir jālieto kombinācijā ar citu N avotu, piemēram, peptonu, $(NH_4)SO_4$ vai NH_4NO_3 (Sperotto et al. 2021). Papildus ābolu barotnē var trūkst citu baktērijām nepieciešamu komponentu, piemēram fosforu (P), nātriju (Na) vai magniju (Mg) (Son et al. 2003). Papildus ir nepieciešams noteikt optimālu ābolu sulas koncentrāciju, jo tai ir būtiska ietekme uz celma spēju sintezēt BC. Pārāk augsta cukuru koncentrācija var inhibēt BC produkciju. Tālākajos eksperimentos tiks veikta detalizēta ābolu sulas sastāva izpēte, ka arī sulai tiks pievienots N avots. BC sintēze alternatīvajās barotnēs ir būtiski atkarīga no izmantotas baktērijas celma (Jozala et al. 2015). Lai uzlabotu BC sintēzi, ir nepaciešams izpētīt citus BC sintezējošus celmus.

Secinājumi

Ābolu sula var kalpot kā BC sintēzes substrāts *K. rhaeticus* P-1463 celmam, sasniedzot 0,156 ± 0,01 g/L sausa svara. Tomēr BC sintēze ābolu sulas barotnē ir būtiski ($p < 0,001$) zemāka par BC sintēzi standartā HS barotnē (3,07 ± 0,06 g/L). Tālākajos eksperimentos ir nepieciešama detalizētas ābolu sulas sastāva izpēte, ka arī ir nepieciešams nodrošināt N klātbūtni barotnē.

Melases barotnes modifikācija

Materiāli un metodes

Šajā eksperimentā turpinājās darbi, kas ir saistīti ar melases barotnes modifikāciju. Līdz šīm bija konstatēts, ka N avota pievienošana melases barotnei būtiski uzlabo BC sintēzi. Šajā eksperimentā tiks izpētītas divas melases barotnes kombinācijas: melase ar kazeīna hidrolizātu un melase ar sūkalām.

Izmantotais celms: *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463

Modificētas barotnes sagatavošana un baktēriju kultivācija

1. Melases barotnei ar kazeīna hidrolizātu sagatavošanai nosver 20 mL/L melases un 2 g/L kazeīna hidrolizāta un pārnes vārglāzē;
2. Izšķīdini reaģentus ar 1 L dH_2O;
3. Melases barotnes ar sūkalām izmanto 20 mL/L melases un izšķīdini tās 0,5 L sūkalās pēc standarta pēcapstrādes;
4. Pēc tām šķīdumam pievieno 0,5 L H_2O, lai sūkalas ir divreiz atšķaidītas (nepieciešams, lai samazinātu kopēju cukuru koncentrāciju barotnē);
6. Barotni sterilizē (+121°C 30 min);
7. Kultivācijai izmanto 250 mL kolbas ar 47,5 mL ābolu sulas barotni un 5% inokulātu;
8. Baktērijas kultivē statiski termostatos 10 diennaktis +30°C.

Datu statistiskā apstrāde

11. tabula

BC sausais svars atkarībā no barotnes veida – aprakstoša statistika.

Kārtas Nr.	Barotnes veids	Vidējā vērtība	SD	Atkārtojumi
1.	HS kontrole	2,916	± 0,06	6
2.	Melase ar kazeīnu	4,047	± 0,06	6
3.	Melase ar sūkalām	4,635	± 0,05	6

12. tabula

ANOVA analīzes rezultāti – BC sausais svars atkarībā no barotnes veida

Gadījumi	Kvadrātu summa	df	Vidēja kvadrātiskā vērtība	F	p	η^2
Barotnes veids	8,204	2	4,102	1435,52	<0,001	0,995
Atlikumi	0,040	14	0,003			

III tipa kvadrātu summa

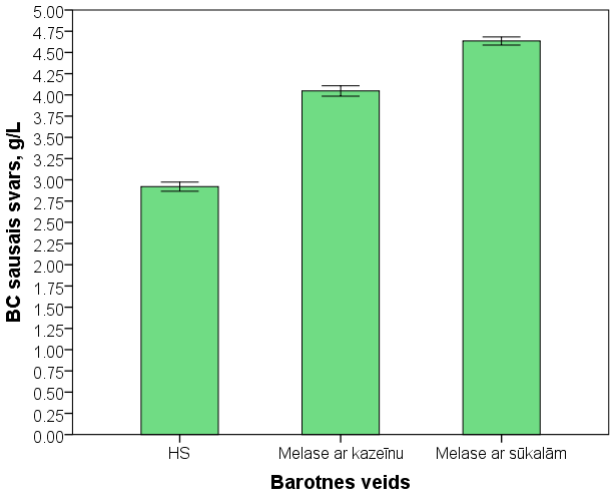
13. tabula

Post Hoc tests (Bonferoni) – barotnes veidi

		Vidēja starpība	SE	t	p
1	2	–1,131	0,032	–34,931	<0,001
	3	–1,719	0,032	–53,108	<0,001
2	3	–0,588	0,031	–19,063	<0,001

Rezultāti

BC sintēze ir apkopota 8. attēlā. Modificētas melases barotnes sasniedza būtiski lielāku ($p < 0,001$) BC sintēzi (melase ar kazeīna hidrolizātu 4,05 ± 0,06 g/L un melase ar sūkalām 4,64 ± 0,05 g/L) salīdzinājumā ar standartu HS barotni (2,92 ± 0,06 g/L). BC produktivitāte šajās barotnēs ir apkopota 14. tabulā. Šajā eksperimentā bija izstrādātas alternatīvas barotnes bija labākas salīdzinājumā ar standarta HS barotni. Tas ir var būt saistīts ar to, ka šīs barotnes nodrošina plašāku barības vielas spektru salīdzinājumā ar standarta HS barotni.

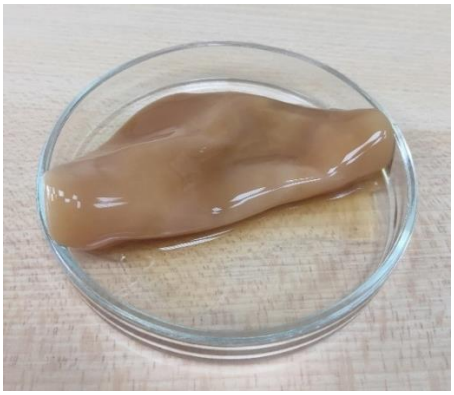


8. attēls. BC sausais svars pēc 10 kultivācijas dienām *K. rhaeticus* P-1463 celmam atkarībā no izmantotas barotnes (standarta HS barotne, melase ar kazeīna hidrolizātu un melase ar sūkalām).

14. tabula

BC produktivitāte atkarībā no izmantotas barotnes.

Barotne	BC sausais svars, g/L	Produktivitāte, g/L/d
Standarta HS barotne	2,92 ± 0,06	0,29
Melase ar kazeīnu	4,05 ± 0,06	0,41
Melase ar sūkalām	4,64 ± 0,05	0,46



9. attēls. BC plēve no melases barotnes ar kazeīna hidrolizātu (*K. rhaeticus* P-1463 celms).

Iepriekšējos eksperimentos bija konstatēts, ka kombinētajā melases/sūkalu barotnē baktērijas patērē saharozi no melases, bet nepatērē laktozi. Laktoze ir galvenā vides piesārņojoša viela sūkalās (gadījumā ja sūkalas notekūdeni netiek atbilstoši apsaimniekoti un nonāk apkārtēja vidē), tāpēc ir nepieciešams veicināt laktozes patēriņu fermentācijas procesā.

Šajā eksperimentā sūkalu koncentrācijas samazinājums uzlaboja BC sintēzi salīdzinājumā ar iepriekšēja eksperimenta BC sintēzi kombinētajā melases/sūkalu barotnē (2,7 ± 0,02 g/L). Tas var būt saistīts ar kopēju cukuru koncentrācijas samazinājumu, kas var inhibēt BC sintēzi. Tālākajos eksperimentos ir nepieciešams plašāk izpētīt cukuru sastāvu un melases/sūkalas koncentrācijas.

Secinājumi

BC sintēze uz iegūtām alternatīvām barotnēm (melase ar kazeīna hidrolizātu 4,05 ± 0,06 g/L un melase ar sūkalām 4,64 ± 0,05 g/L) pārsniedza BC sintēzi uz standarta HS barotnes (2,92 ± 0,06 g/L). Nepieciešama tālāka barotnes optimizācija un detalizētāka cukuru patēriņa izpēte.

Kukurūzas ekstrakta un ābolu sulas izmantošana BC sintēzei

Materiāli un metodes

Eksperimentā tiks pārbaudīts kukurūzas ekstrakts (KE; angl. *corn steep liqour*) – lauksaimniecības blakusprodukts, kuru potenciāli var izmantot BC sintēzei. Pašlaik trūkst pētījumu par BC sintēzi šajā barotnē. Dažos pētījumos KE tika izmantots kā N avots (Vazcuez et al. 2013; Costa et al. 2017).

Izmantotais celms: *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463

Modificētas barotnes sagatavošana un baktēriju kultivācija

Izmantotu barotņu sastāvi ir apkopoti 15. tabulā. KE koncentrācija tika ņemta atbilstoši Costa et al. 2017 pētījumam.

15. tabula

Alternatīvo barotņu sastāvi.

Barotne	Barotnes komponentes		
	KE, mL/L	Ābolu sula, mL/L	H_2O, mL/L
KE bez piedevām	40	-	960
Ābolu sula bez piedevām	-	1000	-
KE ar ābolu sulu x2	40	480	480

10. attēls. Sagatavotas alternatīvas barotnes BC sintēzei (ābolu sula un KE ar ābolu sulu).

Datu statistiskā apstrāde

16. tabula

BC sausais svars atkarībā no barotnes veida – aprakstoša statistika.

Kārtas Nr.	Barotnes veids	Vidējā vērtība	SD	Atkārtojumi
1.	HS kontrole	2,94	± 0,06	5
2.	KE bez piedevām	2,04	± 0,01	5
3.	Ābolu sula bez piedevām	0,16	± 0,01	5
4.	KE ar ābolu sulu x2	3,03	± 0,04	5

17. tabula

ANOVA analīzes rezultāti – BC sausais svars atkarībā no barotnes veida

Gadījumi	Kvadrātu summa	df	Vidēja kvadrātiskā vērtība	F	p	η^2
Barotnes veids	25,833	3	8,511	8602,28	<0,01	0,999
Atlikumi	0,015	15	0,001			

III tipa kvadrātu summa

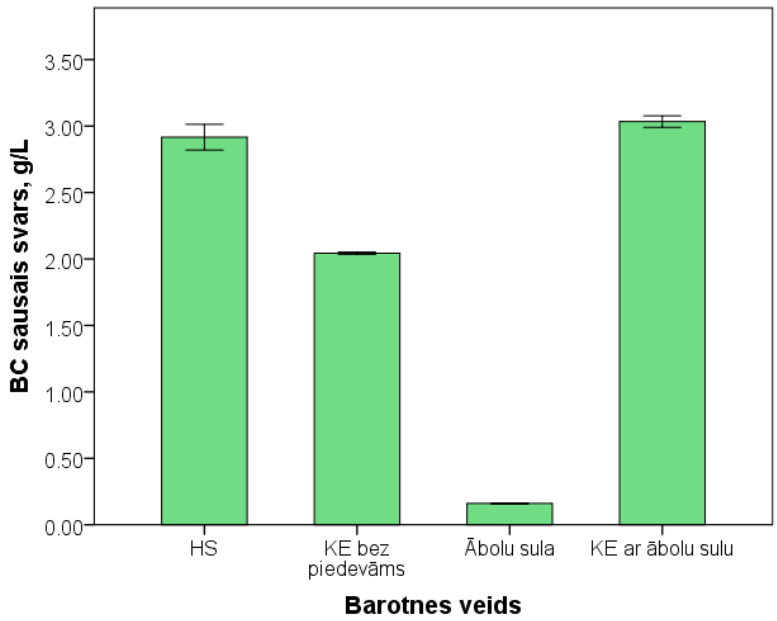
18. tabula

Post Hoc tests (Bonferoni) – barotnes veidi

		Vidēja starpība	SE	t	P
1	2	0,899	0,021	42,363	<0,001
	3	2,782	0,021	131,093	<0,001
	4	–0,091	0,020	–4,311	0,004
2	3	1,883	0,020	94,113	<0,01
	4	–0,991	0,020	–49,505	<0,01
3	4	–2,874	0,020	–143,618	<0,01

Rezultāti

BC sausie svari ir apkopoti 11. attēlā. Var redzēt, ka KE bez piedevām var nodrošināt samērā augstu BC sintēzi (2,04 ± 0,01 g/L) salīdzinājumā ar citām neapstrādātām barotnēm, piemēram, melase, ābolu sula, neapstrādātas sūkalas. Tomēr KE bez piedevām nodrošina būtiski zemāku ($p < 0,001$) BC sintēzi salīdzinājumā ar standarta HS barotni (2,94 ± 0,06 g/L). Visaugstākā BC sintēze bija novērota KE + ābolu sulas barotnē (3,03 ± 0,04 g/L). Šajā barotnē ābolu sula kalpoja kā C avots un KE kā N avots. BC produktivitāte dienā ir apkopota 19. tabulā.



11. attēls. BC sausais svars pēc 10 kultivācijas dienām *K. rhaeticus* P-1463 celmam atkarībā no izmantotas barotnes (standarta HS barotne, KE bez piedevām, KE ar glikozi, KE ar ābolu sulu).

19. tabula

BC produktivitāte atkarībā no izmantotas barotnes.

Barotne	BC sausais svars, g/L	Produktivitāte, g/L/d
HS kontrole	2,94 ± 0,06	0,29
KE bez piedevām	2,04 ± 0,01	0,20
Ābolu sula bez piedevām	0,16± 0,01	0,02
KE ar ābolu sulu x2	3.03± 0,04	0,30

Šajā eksperimentā netika pārbaudīta cukuru koncentrācija, tomēr tas ir svarīgs faktors BC sintēzes procesā. Pārāk augsta ogļhidrātu koncentrācija (gan no ābolu sulas, gan no KE) samazina BC sintēzi. Tālākajos eksperimentos ir nepieciešams detalizētāk izpētīt un optimizēt kombinētu KE + ābolu sulu barotni.

Secinājumi

Visaugstāko BC sintēzi nodrošina KE + ābolu sulas barotnē (3,03 ± 0,04 g/L), kurā ābolu sula kalpoja kā C avots un KE kā N avots. Tomēr ir nepieciešams turpināt barotnes optimizāciju, jo izmantotie alternatīvie substrāti vēl nav pietiekami izpētīti.

Kukurūzas ekstrakta un melases izmantošana BC sintēzei

Materiāli un metodes

Iepriekšējā eksperimentā bija paradīts, ka KE var kalpot kā optimāls N avots alternatīvajās barotnēs. Šajā mēģinājumā tiks pārbaudītas alternatīvas barotnes ar melasi un glikozi kā C avotu un KE kā N avots.

Izmantotais celms: *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463

Modificētas barotnes sagatavošana un baktēriju kultivācija

Izmantotu barotņu sastāvi ir apkopoti 20. tabulā

20. tabula

Alternatīvo barotņu sastāvi.

Piedeva	KE ar melasi	KE ar glikozi
KE, mL/L	40	40
Glikoze, g/L	-	20
Melase, mL/L	25	-
H_2O, mL/L	940	960

Datu statistiskā apstrāde

21. tabula

BC sausais svars atkarībā no barotnes veida – aprakstoša statistika.

Kārtas Nr.	Barotnes veids	Vidējā vērtība	SD	Atkārtojumi
1.	HS kontrole	2,85	± 0,05	4
2.	CSL ar melasi	2,99	± 0,07	4
3.	CSL ar glikozi	5,93	± 0,07	4

22. tabula

ANOVA analīzes rezultāti – BC sausais svars atkarībā no barotnes veida

Gadījumi	Kvadrātu summa	df	Vidēja kvadrātiskā vērtība	F	p	η^2
Barotnes veids	22,940	2	11,470	2768,71	<0,001	0,996
Atlikumi	0,033	8	0,004			

III tipa kvadrātu summa

23. tabula

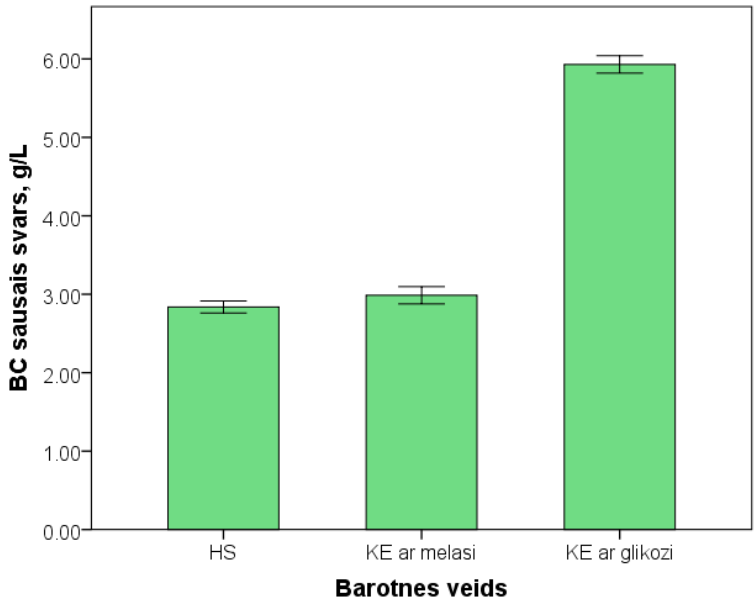
Post Hoc tests (Bonferoni) – barotnes veidi

		Vidēja starpība	SE	t	P
1	2	–0,134	0,049	–2,729	0,078
	3	–3,077	0,049	–62,582	<0,001
2	3	–2,942	0,046	–64,653	<0,001

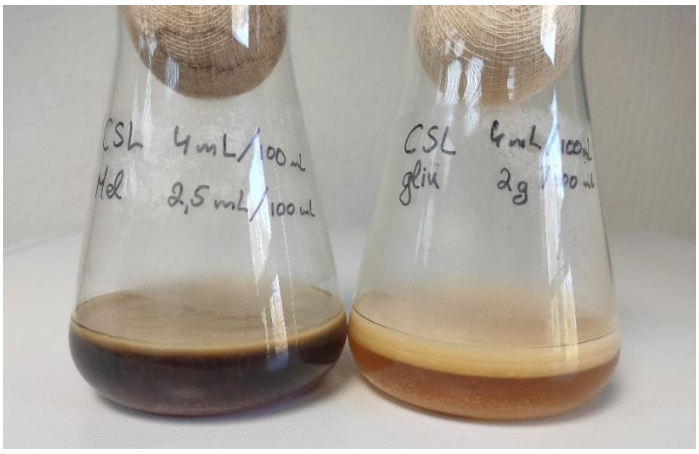
Rezultāti

Statistiskā analīze parāda, ka starp standartu HS barotni (2,85 ± 0,05 g/L) un kombinētu KE barotni ar melasi (2,99 ± 0,07) nav statistiski būtiskas atšķirības (p = 0,078). Savukārt, BC sintēze barotne ar KE un glikozi 20 g/L sasniedza 5,93 ±

0,07 g/L. Uz dotu brīdi ir visaugstākais BC sintēzes rezultāts, kas tika sasniegts pētījumu ietvaros. Produktivitāte šajā barotnē sasniedz 0,59 g/L/d.



12. attēls. BC sausais svars pēc 10 kultivācijas dienām *K. rhaeticus* P-1463 celmam atkarībā no izmantotas barotnes (standarta HS barotne, KE ar melasi un KE ar glikozi 20 g/L).



13. attēls. BC plēves uz alternatīvo barotņu virsmas (*K. rhaeticus* P-1463 celms).

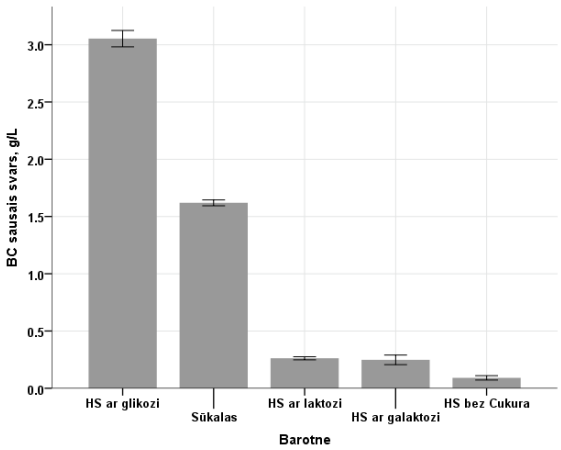
Secinājumi

Visaugstākā BC sintēze tika sasniegta KE barotnē ar 20 g/L glikozi (5,93 ± 0,07 g/L). Tālākajos eksperimentos ir nepieciešams aizvietot tīru glikozi ar alternatīvu C avotu ar optimālu koncentrāciju.

Alternatīvu substrātu novērtējums bakteriālās celulozes iegūšanai

BC sintēze ar K. Rhaeticus P 1463 uz standarta HS (ar glikozi), modificētas HS (glikoze aizstāta ar galaktozi vai laktozi) un sūkalām

Šajā eksperimentā tika noteikts vai *K. rhaeticus* P 1463 ir spējīgs augt standarta HS barotnē, izmantojot kā vienīgos C avotus laktozi vai galaktozi. No iegūtajiem rezultātiem ir iespējams secināt, ka BC sintēze notiek barotnēs, kur kā vienīgais C avots ir laktoze vai galaktoze (3. attēls). Standarta HS barotnē ar laktozi BC sausais svars bija 0,26 ± 0,01 g/L un standarta HS barotnē ar galaktozi BC sausais svars bija 0,25 ± 0,03 g/L. Kā salīdzinājums tika izmantota arī standarta HS barotne bez pievienotiem cukuriem un HS barotne ar glikozi, kur BC sausais svars bija 0,09 ± 0,01 g/L un 3,05 ± 0,06 g/L. Salīdzinot ar literatūras datiem, šis celms sasniedz mazu BC sauso svaru. Salīdzinājumam, izmantojot *Gluconabacter sucrofermentans* B 11267 celmu uz sūkalu barotnes, tika iegūts BC sausais svars 5,45 g/L (Revin et al. 2018). Ir pētījumi, kuros izmantotie BC celmi sniedz mazāku BC sauso svaru. Salīdzinot BC iznākumu *Komagataeibacter hansenii* B 22, Komagataeibacter hansenii DSM 5602 un K. rhaeticus P 1463, tika novērots, ka K. hansenii B 22 un K. hansenii DSM 5602 BC sintēze ir zemāka nekā K. rhaeticus P 1463 celmam, respektīvi 1,42 ± 0,13 g/L, 1,26 ± 0,15 g/L un 1,95 ± 0,15 g/L (Koļesovs 2021, Semjonovs et al. 2017). Izmantojot *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973, iegūtais BC sausais svars bija 1,6 g/L (Tsouko et al. 2015) un izmantojot *Acetobacter xylinum*, tika iegūts līdzīgs rezultāts 1,62 g/L (Embuscado et al. 1994). Kā arī izmantojot Gluconacetobacter xylinus, BC sintēze barotnē, kas saturēja laktozi, praktiski nenotika. Tika iegūts BC sausais svars 0,07 g/L (Nguyen et al. 2008). Šie rezultāti liecina par to, ka ne visi BC sintezējošie celmi ir spējīgi efektīvi izmantot laktozi kā vienīgo pieejamo C avotu augšanas barotnē. Kā arī daudzi celmi vispār nespēj patērēt laktozi BC sintēzei (Thompson and Hamilton 2001).



3. attēls. BC sausais svars standarta HS (ar glikozi) un modificētā HS (ar laktozi vai galaktozi), izmantojot K. rhaeticus P 1463 celmu pēc 10 kultivācijas dienām.

Cukuru (glikozes, galaktozes un laktozes) koncentrācijas ir apkopotas 7. tabulā. Augstākais cukura patēriņš tika novērots standarta HS barotnei ar glikozi. Šajā barotnē tika patērēts pilnīgi viss cukurs. Standarta HS barotnē, kur glikoze ir aizvietota ar laktozi vai galaktozi, tika novērots pavisam neliels cukuru patēriņš. Barotnei ar pievienoto galaktozi, cukura koncentrācija samazinājās no 20,59 ± 0,21 g/L līdz 16,84 ± 0,19 g/L. Barotnei ar pievienotu laktozi cukura patēriņš tika novērots līdzīgs kā barotnei ar galaktozi – no 21,74 ± 0,32 g/L līdz 18,38 ± 0,18 g/L. Augstāks galaktozes patēriņš salīdzinot ar laktozi būtu skaidrojams ar to, ka galaktoze ir monosaharīds, bet laktoze ir disaharīds. Baktērijām vieglāk ir patērēt monosaharīdus nekā disaharīdus, jo nav nepieciešamības veikt disaharīdu šķelšanu (Keshk and Sameshima 2005). Standarta HS barotnē bez cukura novērotais glikozes daudzums ir saistīts ar inokulāta ienešanu barotnē. Inokulāts tiek audzēts standarta HS ar glikozi, tāpēc cukuru analīzēs uzrādās neliels glikozes daudzums barotnē bez cukura. Novērotais cukura samazinājums salīdzinot ar pētījumu, kur tika izmantos Gluconabacter sucrofermentans B-11267 celms, ir mazs. Eksperimentā laktozes

koncentrācijas samazinājums bija gandrīz puse no kopējā cukura daudzuma – no 42,10 g/L līdz 22,40 g/L respektīvi (Revin et al. 2018).

1. tabula

Cukuru koncentrācijas izmaiņas kultivācijas laikā (10 dienas) standarta HS barotnē, HS barotnē glikozi aizvietojot ar laktozi vai galaktozi, sūkalu un standarta HS bez cukura barotnēs izmantojot K. rhaeticus P 1463. (S0 – koncentrācijas pirmajā dienā; S1 – koncentrācija desmitajā dienā; ΔS – starpība).

Barotne	Cukurs	S_0, g/L	S_1, g/L	Δ_S, g/L
HS – glikoze	Glikoze	20,31 ± 0,04	0,03 ± 0,05	20,28 ± 0,06
HS – laktoze	Laktoze	21,74 ± 0,32	18,38 ± 0,18	3,36 ± 0,39
HS – galaktoze	Galaktoze	20,59 ± 0,21	16,84 ± 0,19	3,75 ± 0,25
Sūkalas	Glikoze	1,32 ± 0,07	0,01 ± 0,01	1,31 ± 0,05
	Galaktoze	1,02 ± 0,05	0,03 ± 0,04	0,99 ± 0,04
	Laktoze	50,21 ± 0,23	46,21 ± 0,18	4,00 ± 0,22
HS bez cukura	Glikoze	1,02 ± 0,01	0,02 ± 0,03	1,00 ± 0,02

Organisko skābju koncentrācijas izmaiņas ir apkopotas 8. tabulā. Pēc iegūtajiem datiem var secināt, ka vairāk organisko skābju veidojas standarta HS barotnē, kur kā vienīgais C avots ir izmantota laktoze vai galaktoze, kā arī sūkalu barotnē. Standarta HS barotnē ar glikozi, kā vienīgo C avotu, veidojās mazāk organisko skābju. Kultivācijas beigās standarta HS barotnē ar laktozi etiķskābes un glikonskābes daudzums bija lielākais, 0,19 ± 0,05 g/L un 0,35 ± 0,08 g/L respektīvi. Viszemākais etiķskābes daudzums tika novērots standarta HS barotnē ar glikozi 0,17 ± 0,03 g/L, bet zemākais glikonskābes daudzums tika novērots standarta HS bez pievienotiem cukuriem 0,03 ± 0,02 g/L.

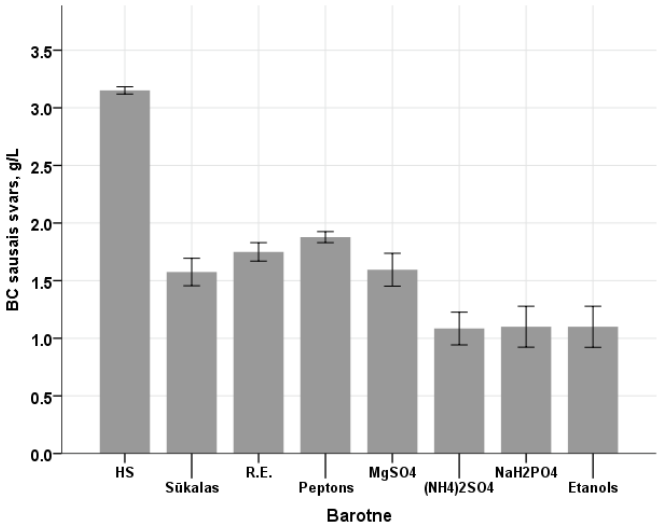
8. tabula

Organisko skābju (etiķskābes un glikoskābes) koncentrācijas izmaiņas kultivācijas laikā (10 dienas) standarta HS, modificētajā HS kur glikoze aizvietota ar laktozi vai galaktozi, sūkalu un HS bez cukura barotnēs izmantojot K. rhaeticus P 1463. (S0 – koncentrācijas pirmajā dienā; S1 – koncentrācija desmitajā dienā; ΔS – starpība).

Barotne	Skābe	S_0, g/L	S_1, g/L	Δ_S, g/L
HS – glikoze	Etiķskābe	0,01 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,03
	Glikonskābe	0,12 ± 0,07	0,31 ± 0,06	0,19 ± 0,07
HS – laktoze	Etiķskābe	0,01 ± 0,02	0,19 ± 0,05	0,18 ± 0,04
	Glikonskābe	0,02 ± 0,13	0,35 ± 0,08	0,33 ± 0,12
HS – galaktoze	Etiķskābe	0,02 ± 0,02	0,19 ± 0,09	0,17 ± 0,07
	Glikonskābe	0,03 ± 0,02	0,32 ± 0,06	0,29 ± 0,05

BC sintēzi limitējošais faktors sūkalās

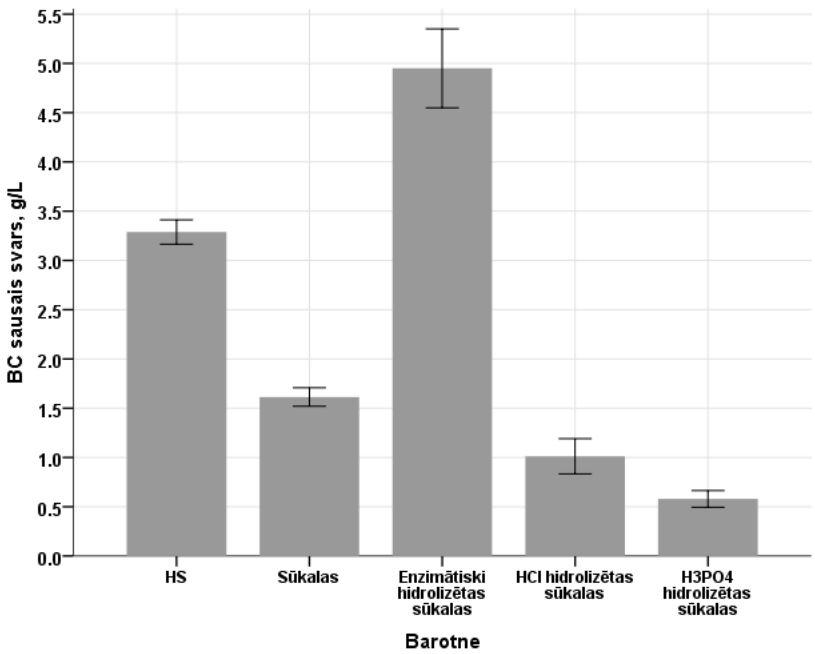
Šajā eksperimentā tika novērota dažādu neorganisko komponentu ietekme uz sūkalu barotni. BC sintēzes būtisku ($p<0,01$) palielinājumu deva rauga ekstrakta un peptona pievienošana sūkalu barotnei, 1,75 ± 0,08 g/L un 1,88 ± 0,04 g/L, attiecīgi, kas ir 55,56% un 59,68% no sniegtā BC sausā svara uz standarta HS barotnes 3,15 ± 0,03 g/L (4. attēls). MgSO4 pievienošana sūkalu barotnei nedeva rezultātu un BC sausais svars bija vienāds ar sūkalu barotni bez piedevām – 1,59 ± 0,17 g/L un 1,57 ± 0,10 g/L. Pretēju efektu sniedza (NH4)2SO4, NaH2PO4 un etanola pievienošana, rezultējoties BC sausajam svaram būtiski mazākam ($p<0,01$) nekā sūkalu barotnei bez pievienotām piedevām. Datu analīze norāda uz to, ka sūkalu barotnē ir pietiekams daudzums N, jo, pievienojot papildus N avotus, BC sausā svara pieaugums ir neliels vai tieši pretēji samazinās. Tas ir skaidrojams ar to, ka pārlieku liela kādas vielas koncentrācija var arī inhibēt baktēriju augšanu, tādējādi samazinot BC sauso svaru. Visticamāk, galvenais faktors, kas inhibē BC sintēzi, ir laktoze (Thompson and Hamilton 2001; Nguyen et al. 2008). Salīdzinot ar literatūras avotiem, dažādu neorganisko sāļu (MgSO4, (NH4)2SO4, NaH2PO4) un etanola pievienošana BC augšanas barotnei palielināja BC sausā svara iznākumu attiecībā pret standarta HS barotni (Son et al. 2003).



4. attēls. BC sausais svars uz standarta HS, nemodificētām sūkalām un sūkalām ar piedevām (rauga ekstrakts, peptons, $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NaH_2PO_4 un etanols) izmantojot *K. rhaeticus* P 1463 pēc 10 kultivācijas dienām.

Sūkalu hidrolītiskās apstrādes ietekme uz BC produktivitāti

Šajā eksperimentā tika salīdzinātas dažādas sūkalu hidrolīzes procedūras. Tika izmantota sūkalu enzimātiskā hidrolīze ar β-galaktozidāzes enzīmu un sūkalu skābā hidrolīze ar HCl un HPO_4 (5. attēls). Pēc datu analīzes tika secināts, ka laktoze sūkalās visvairāk tika hidrolizētas enzimātiski, salīdzot ar skābes hidrolīzi Kā arī ar sūkalu enzimātisko hidrolīzi tika sasniegts lielākais BC sausais svars 4,95 ± 0,25 g/L, kas ir par 33,53% vairāk nekā uz standarta HS barotnes 3,29 ± 0,12 g/L un par 67,47% vairāk nekā uz nehidrolizētām sūkalām 1,61 ± 0,10 g/L. Barotnēm, kas tika hidrolizētas ar skābi, BC sausais svars bija būtiski ($p<0,01$) mazāks nekā nehidrolizētām sūkalām. Respektīvi hidrolizējot ar HCl 1,01 ± 0,14 g/L un hidrolizējot ar H_3PO_4 0,58 ± 0,06 g/L. Enzimātiski hidrolizējot sūkalas tika hidrolizēta gandrīz puse no laktozes satura sūkalās, ļaujot veiksmīgāk notikt BC sintēzei baktērijām uzņemot monosaharīdus. Hidrolizējot ar skābi, procesa laikā barotnē iespējams sāka veidoties attiecīgo skābju sāļi, kas inhibēja BC sintēzi, samazinot BC sausā svara iznākumu. Salīdzinot ar literatūras avotiem. Pētījumos, izmantojot citus BC celmus kā *Acetobacter xylinum,* ir iegūti augstāki BC sausie svari 7,05 ± 0,14 g/L (Lappa et al. 2021). Citā pētījumā, veicot sūkalu hidrolīzi, izmantojot BC celmu *G. xylinus* PTCC 1734, tika iegūts BC sausais svars 3,55 g/L (Salari et al. 2019). Lai arī sūkalu hidrolizēšana ir lieliska metode kā palielināt BC sausā svara iznākumu, tajā pašā laikā šīs metodes izmantošana palielina izmaksas jau esoši dārgajam BC sintēzes procesam (Amaro et al. 2019).



5. attēls. BC sausais svars uz standarta HS barotnes, sūkalu barotnes un hidrolizētu (enzimātiski un skābes) sūkalu barotnēm izmantojot K. rhaeticus, pēc 10 kultivācijas dienām.

Cukuru (glikozes, galaktozes un laktozes) koncentrācijas izmaiņas var redzēt 9. tabulā. Veicot sūkalu hidrolīzi ar enzīmu β-galaktozidāzi, tika iegūts labākais rezultāts laktozes hidrolizēšanā par galaktozi un glikozi – 17,36 ± 0,25 g/L un 18,95 ± 0,08 g/L. Hidrolizējot sūkalas ar skābi (sērskābi un ortofosforskābi) laktozes hidrolīze bija vāja. Attiecīgi, iegūtais monosaharīdu daudzums hidrolizējot ar sērskābi: glikoze 0,85 ± 0,09 g/L; galaktoze 0,25 ± 0,05 g/L un ar ortofosforskābi: glikoze 0,84 ± 0,03 g/L; galaktoze 0,22 ± 0,02 g/L. Veicot sūkalu hidrolīzi tiek iegūts lielāks monosaharīdu daudzums, ko baktērijas var efektīvāk asimilēt. Palielinot efektīvi asimilējamu cukuru daudzumu barotnē, tiek palielināts arī BC sausā svara iznākums (Keshk and Sameshima 2005).

9. tabula

Cukuru (glikozes, galaktozes un laktozes) koncentrācijas izmaiņas kultivācijas laikā (10 dienas) sūkalu, hidrolizētu (β-galaktozidāzes, sērskābes, ortofosforskābes) sūkalu barotnēs izmantojot K. rhaeticus P 1463. (S0 – koncentrācijas pirmajā dienā; S1 – koncentrācija desmitajā dienā; ΔS – starpība).

Barotne	Cukurs	S_0, g/L	S_1, g/L	Δ_S, g/L
Sūkalas	Glikoze	0,99 ± 0,15	0,02 ± 0,01	0,97 ± 0,09
	Galaktoze	1,20 ± 0,06	0,04 ± 0,03	1,16 ± 0,05
	Laktoze	49,66 ± 0,68	46,03 ± 0,47	3,63 ± 0,74
	Glikoze	18,95 ± 0,08	0,13 ± 0,09	18,82 ± 0,10
	Galaktoze	17,36 ± 0,25	1,24 ± 0,12	16,12 ± 0,26
Sūkalas – Enzimātiska hidrolīze	Laktoze	12,04 ± 0,28	10,92 ± 0,19	1,12 ± 0,27
Sūkalas – HCl	Glikoze	0,85 ± 0,09	0,15 ± 0,11	0,70 ± 0,09
	Galaktoze	0,25 ± 0,05	0,01 ± 0,01	0,24 ± 0,05
	Laktoze	48,84 ± 1,17	46,55 ± 0,65	2,29 ± 0,84
Sūkalas – H_3PO_4	Glikoze	0,84 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,72 ± 0,02
	Galaktoze	0,22 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,21 ± 0,03
	Laktoze	47,93 ± 0,86	45,01 ±0,68	2,92 ± 1,07

Organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrācijas ir apkopotas 10. tabulā. Augstāko etiķskābes un glikoskābes pieaugumu uzrādīja enzimātiski hidrolizētu sūkalu barotne, respektīvi 0,26 ± 0,05 g/L un 0,45 ± 0,04 g/L. Zemākais organisko skābju pieaugums tika novērots nemodificētā sūkalu barotnē, kur etiķskābe bija 0,13 ± 0,04 g/L un glikoskābe 0,04 ± 0,03 g/L. Augstais organisko skābju koncentrāciju pieaugums enzimātiski hidrolizētu sūkalu barotnē būtu skaidrojams ar palielinātu monosaharīdu daudzumu. Tas liecina par to, ka baktērijām patērējot vairāk substrātu, veidojas vairāk arī blakusprodukta, kas ir organiskās skābes.

10. tabula

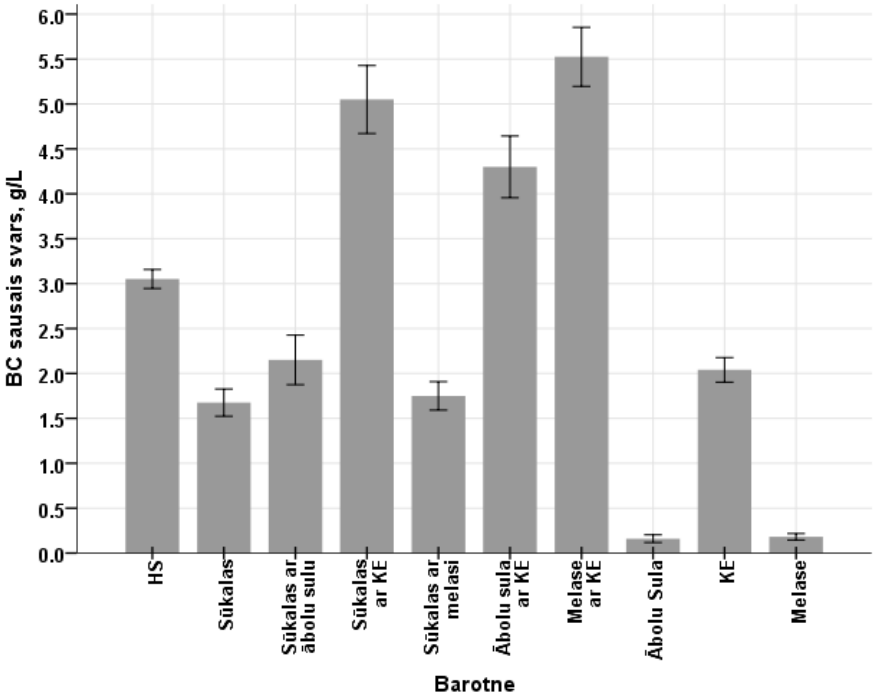
Organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrācijas izmaiņas kultivācijas laikā (10 dienas) sūkalu, hidrolizētu (β-galatozidāes, sērskābes, ortofosforskabes) sūkalu barotnēs izmantojot K. rhaeticus P 1463. (S0 – koncentrācijas pirmajā dienā; S1 – koncentrācija desmitajā dienā; ΔS – starpība).

Barotne	Skābe	S_0, g/L	S_1, g/L	Δ_S, g/L
Sūkalas	Etiķskābe	0,02 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,03
	Glikonskābe	0,01 ± 0,02	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,05
Sūkalas – enzimātiskā hidrolīze	Etiķskābe	0,04 ±0,03	0,26 ± 0,05	0,22 ± 0,02
	Glikonskābe	0,06 ± 0,04	0,45 ± 0,04	0,39 ± 0,06
Sūkalas – HCl	Etiķskābe	0,02 ± 0,01	0,22 ± 0,06	0,20 ± 0,03
	Glikonskābe	0,02 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,31 ± 0,04
Sūkalas – H_3PO_4	Etiķskābe	0,08 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,12 ± 0,02
	Glikonskābe	0,02 ± 0,02	0,34 ± 0,04	0,32 ± 0,05

Sūkalu un citu alternatīvo barotņu kombinācijas

Tika pārbaudītas atšķirīgas alternatīvo barotņu kombinācijas. Sūkalu barotnei tika pievienota melase, ābolu sula un KE. Kā arī tika apskatītas ābolu sulas, melases un KE barotnes bez cita pievienota alternatīva substrāta (6. attēls). Analizējot datus ir redzams, ka ābolu sulas barotne un melases barotne bez pievienotiem citiem alternatīviem substrātiem sniedz zemākos.

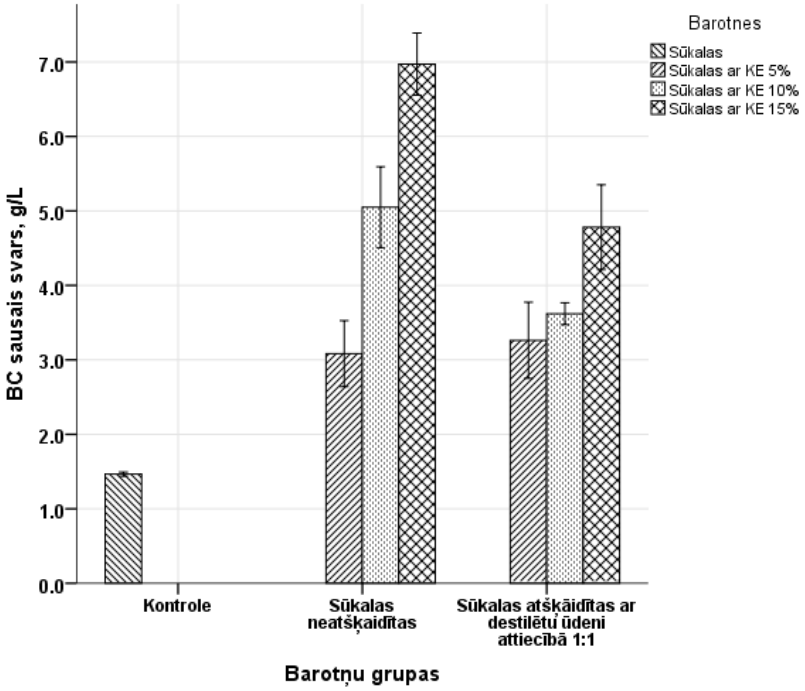
BC sausā svara rezultātus, 0,16 ± 0,03 g/L un 0,18 ± 0,02 g/L respektīvi. Kukurūzas ekstrakta barotne bez pievienotiem citiem alternatīviem substrātiem sniedza būtiski ($p<0,01$) lielāku BC sausā svara rezultātu nekā sūkalu barotne – 2,04 ± 0,08 g/L un 1,68 ± 0,09 g/L. Lielākos BC sausā svara rezultātus uzrādīja sūkalu barotne ar kukurūzas ekstraktu un melases barotne ar kukurūzas ekstraktu 5,05 ± 0,23 g/L un 5,53 ± 0,21 g/L respektīvi. Kas ir par 39,60% un 44,85% vairāk nekā uz standarta HS barotnes (3,05 ± 0,07 g/L) kā arī par 66,73% un 69,62% vairāk nekā uz sūkalu barotnes. Tālākam eksperimentam, kur tiktu optimizēta iegūtā barotne ar augstāko BC sauso svaru, tika izvēlēta sūkalu barotne ar kukurūzas ekstraktu, jo šī grupa uzradīja vislielāku BC sintēzi. Savukārt, nebija statistiski būtiskas atšķirības no melases ar KE grupas. Sūkalu iesaiste alternatīvajā barotnē ir svarīga, lai nākotnē samazinātu sūkalu apjomus un negatīvo ietekmi uz apkārtējo vidi. Salīdzinot ar literatūras avotiem, iespējamais iemesls tam, kāpēc barotnēs, kurām tika pieveinots KE, tika sasniegts lielākais BC sausais svars, ir KE sastāvā esošā metionīna klātbūtnes dēļ. Metionīna klātbūtne barotnē palīdz samazināt lag fāzi, kā arī veicina augšanas fāzes sākumu (Matsuoka et al. 1996) un KE piemīt buferējošas īpašības (Noro et al. 2004). KE buferējošās īpašības palīdz augšanas barotnē uzturēt ilgāk nemainīgu pH līmeni. Iespējami noturīgākais pH līmenis ir svarīgs etiķskābes baktēriju augšanā, jo kā blakusprodukti tiek izdalītas organiskās skābes, kas samazina barotnes pH un baktērijas, vairs nespēj augt (Keshk and Sameshima 2005) un sintezēt BC. No augšanu veicinošiem faktoriem var izslēgt papildus viegli metabolizējamu cukuru (glikozes) ienešanu kopā ar KE, tā kā pievienotā koncentrācija ir zema, ienestais glikozes daudzums ir 1 – 1,5 g/L, kas būtiski neietekmē BC augšanu. Ar KE ienestais glikozes koncentrācijas ir redzamas 11. tabulā. Kādā pētījumā tika apskatītas barotnes ar dažādiem cukuriem tika noskaidrots, ka BC sintēze ir visintensivāka kombinācijās, kur ir gan monosaharīds, gan disaharīds (Hungund 2013).



6. attēls. BC sausais svars uz standarta HS, sūkalu, sūkalu un ābolu sulas, sūkalu un KE, sūkalu un melases, ābolu sulas un KE, melases un KE, ābolu sulas, KE un melases barotnes, izmantojot K. rhaeticus P 1463 pēc 10 kultivācijas dienām.

Alternatīvās barotnes sastāva optimizācija

Tika veikta barotnes optimizācija, lai noskaidrotu optimālo sūkalu un KE koncentrāciju (7. attēls). Sūkalu barotnei pievienoja KE koncentrācijā no 5% līdz 15%. Kā arī sūkalas tika atšķaidītas 1:1 ar destilētu ūdeni un pievienots KE tādās pašās koncentrācijās. Augstāko BC sauso svaru uzrādījā neatšķaidīta sūkalu barotne ar 15% KE piedevu 6,97 ± 0,17 g/L. Salīdzinot 7. attēlā iegūtos datus grupās, neatšķaidītu sūkalu un atšķaidītu sūkalu tendence ir līdzīga. Abās grupās lielāko BC sauso svaru deva barotne ar 15% KE piedevu. Iegūtais BC susais svars sūkalu barotnē ar 15% KE piedevu ir 78,91% vairāk nekā uz sūkalu barotnes (1,47 ± 0,01 g/L). Atšķaidītu sūkalu ar 15% KE piedevu BC sausais svars (4,78 ± 0,23 g/L) ir 69,25% vairāk nekā uz sūkalu barotnes. Tālākos eksperimentos būtu jāveic optimizētās barotnes tālāka modifikācija, pievienojot klāt EB nepieciešamos vitamīnus, aminoskābes vai palielinot vēl KE koncentrāciju barotnē. Kā arī būtu jāapsver esošā celma salīdzināšana specifiski ar citiem BC sintezējošiem celmiem, kas ir spējīgi patērēt laktozi kā vienīgo C avotu barotnē. Nākotnē varētu apsvērt esošā celma ģenētisku modifikāciju, tādā veidā uzlabojot tā potenciālu asimilēt laktozi BC sintezēšanai.



7. attēls. BC sausais svars uz sūkalu barotnes, sūkalu barotnes ar KE piedevu (5%, 10% un 15%), atšķaidītas sūkalas 1:1 ar destilētu ūdeni, izmantojot K. rhaeticus P 1463 pēc 10 kultivācijas dienām.

Cukuru (glikozes, galaktozes un laktozes) koncentrācijas ir apkopotas ir 11. tabulā. Laktozes un galaktozes koncentrācijas ietekmēja tikai sūkalu daudzums barotnē. Glikoze nelielā koncentrācijā (1 – 1,5 g/L) sūkalu barotnē tika ienesta ar KE. Lielākais laktozes patēriņš bija novērojams sūkalu barotnēs ar pievienotu KE 15% koncentrācijā. Iespējams lielāks cukuru patēriņš, it īpaši laktozes patēriņš, ir iespējams KE sastāvā esošās metionīna un citu augšanas faktoru klātbūtnes dēļ, kas iespējams ir uzlabojis BC sintēzi. Kā arī KE sastāvā ir daudzas citas aminoskābes, makro un mikro elementi, kas var stimulēt baktēriju augšanu un līdz ar to arī cukuru izmantošanu (Matsuoka et al. 1996).

11. tabula

Cukuru (glikozes, galaktozes un laktozes) koncentrācijas izmaiņas kultivācijas laikā (10 dienas) sūkalu, sūkalu ar (5%, 10% un 15%) KE piedevu, atšķaidītu sūkalu 1:1 ar destilētu ūdeni ar KE piedevu (5%, 10% un 15%) izmantojot *K. rhaeticus* P 1463. (S0 – koncentrācijas pirmajā dienā; S1 – koncentrācija desmitajā dienā; ΔS – starpība).

Barotne	Cukurs	S_0, g/L	S_1, g/L	Δ_S, g/L
Sūkalas	Glikoze	1,04 ± 0,05	0,02 ± 0,01	1,02 ± 0,02
	Galaktoze	1,32 ± 0,04	0,04 ± 0,02	1,28 ± 0,05
	Laktoze	49,85 ± 0,61	46,04 ± 0,53	3,81 ± 0,75
Sūkalas + KE 5%	Glikoze	1,80 ± 0,03	0,01 ± 0,01	1,79 ± 0,03
	Galaktoze	1,50 ± 0,05	0,03 ± 0,02	1,47 ± 0,06
	Laktoze	49,00 ± 1,15	43,94 ± 0,66	5,06 ± 0,97
Sūkalas + KE 10%	Glikoze	2,42 ± 0,14	0,02 ± 0,01	2,30 ± 0,12
	Galaktoze	1,03 ± 0,06	0,03 ± 0,02	1,00 ± 0,04
	Laktoze	48,21 ± 0,54	41,35 ± 0,77	6,86 ± 0,88
Sūkalas + KE 15%	Glikoze	2,97 ± 0,03	0,04 ± 0,01	2,93 ± 0,06
	Galaktoze	1,29 ± 0,05	0,05 ± 0,03	1,24 ± 0,02
	Laktoze	49,53 ± 0,68	39,91 ± 0,83	9,62 ± 0,77
Sūkalas 1:1 + KE 5%	Glikoze	0,93 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,89 ± 0,04
	Galaktoze	0,69 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,67 ± 0,05
	Laktoze	25,93 ± 1,11	21,21 ± 0,59	4,72 ± 1,26
Sūkalas 1:1 + KE 10%	Glikoze	1,24 ± 0,03	0,02 ± 0,01	1,22 ± 0,04
	Galaktoze	0,73 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,71 ± 0,03
	Laktoze	26,07 ± 0,44	20,70 ± 0,52	5,37 ± 0,67
Sūkalas 1:1 + KE 15%	Glikoze	1,68 ± 0,05	0,03 ± 0,02	1,65 ± 0,03
	Galaktoze	0,84 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,82 ± 0,04
	Laktoze	24,74 ± 0,65	18,43 ± 0,51	6,31 ± 0,66

Organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrācijas apkopotas 12. tabulā. Apskatītajās sūkalu un KE barotņu kombinācijās organisko skābju pieaugums bija līdzīgs un netika novērota būtiska ($p<0,01$) atšķirība starp kādu no barotnes kombinācijām. Tas iespējams būtu skaidrojams ar to, ka baktērijas atrodas tām optimālā vidē. Veicot BC sintēzi baktērijas visu savu enerģiju novirza uz disaharīdu šķelšanu BC sintēzei, nevis uz blakusproduktu sintēzi (Keshk and Sameshima 2005).

12. tabula

Organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) koncentrācijas izmaiņas barotnēs kultivācijas laikā (10 dienas) sūkalu, sūkalu ar 5%, 10% un 15% KE piedevu, atšķaidītu sūkalu 1:1 ar destilētu ūdeni ar (5%, 10% un 15%) KE piedevu izmantojot K. rhaeticus P 1463. (S0 – koncentrācijas pirmajā dienā; S1 – koncentrācija desmitajā dienā; ΔS – starpība).

Barotne	Skābe	S_0, g/L	S_1, g/L	Δ_S, g/L
Sūkalas	Etiķskābe	0,01 ± 0,01	0,11 ± 0,04	0,10 ±0,03
	Glikonskābe	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,02
Sūkalas + KE 5%	Etiķskābe	0,01 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,04
	Glikonskābe	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,03
Sūkalas + KE 10%	Etiķskābe	0,02 ± 0,01	0,14 ± 0,05	0,12 ± 0,04
	Glikonskābe	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Sūkalas + KE 15%	Etiķskābe	0,05 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,10 ± 0,04
	Glikonskābe	0,05 ± 0,03	0,07 ± 0,04	0,02 ± 0,05
Sūkalas 1:1 + KE 5%	Etiķskābe	0,01 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,03
	Glikonskābe	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,04	0,03 ± 0,02
Sūkalas 1:1 + KE 10%	Etiķskābe	0,01 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,04
	Glikonskābe	0,05 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,06 ± 0,05
Sūkalas 1:1 + KE 15%	Etiķskābe	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,04	0,04 ± 0,03
	Glikonskābe	0,11 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,02 ± 0,02

Biotehnoloģisku parametru noteikšana labākām alternatīvām barotnēm

Balstoties uz BC sintēzes rezultātiem, tika aprēķināti biotehnoloģiskie radītāji izvēlētām barotnēm – standarta HS barotnei, nemodificētai sūkalu barotnei, enzimātiski hidrolizētai sūkalu barotnei un kombinētai sūkalu un 15% koncentrācijā KE barotnei. Analizējot iegūtos datus, būtiski ($p<0,01$) lielākie rezultāti ir iegūti kombinējot sūkalas ar KE koncentrācijā 15%, kur BC sausais svars bija 6,97 ± 0,17 g/L, BC iznākums no patērētā substrāta 50,50 ± 3,01 % un BC produktivitāte 0,70 ± 0,02 g/L/d. Kombinētajā barotnē (sūkalas ar KE piedevu 15% koncentrācijā) iespējams bija citi cukuri, kas netika konstatēti ar ENRK. Otrs lielākais BC iznākums no patērētā substrāta bija nemodificētai sūkalu barotnei (28,19 ± 1,54 %), kas, iespējams, būtu skaidrojams ar to, ka nemodificētā sūkalu barotnē substrāta konversija par BC salīdzinot ar standarta HS (15,39 ± 0,85 %) un enzimātiski hidrolizētu sūkalu barotni (13,73 ± 2,28 %) notiek efektīvāk. BC iznākums no patērētā substrāta enzimātiski hidrolizētu sūkalu barotnei ir būtiski ($p<0,01$) zemāks nekā nemodificētai sūkalu barotnei. Iespējams tas ir skaidrojams ar to, ka enzimātiski hidrolzētu sūkalu barotnē substrāts tika vairāk patērēts biomasas un organisko skābju veidošanai (10. tabula).

13. tabula

BC sintēzes biotehnoloģiskie rādītāji celmam *K. rhaeticus* P 1463.

Barotne	BC sausais svars, g/L	BC iznākums no patērēta substrāta ($Y_{P/S}$), %	Skābju iznākums no patērētā substrāta ($Y_{P/S}$), %	BC produktivitāte (Q_x), g/L/d
Standarta HS barotnei	3,11 ± 0,06	15,39 ± 0,85	1,73 ± 0,32	0,31 ± 0,01
Sūkalu barotnei	1,61 ± 0,10	28,19 ± 1,54	2,43 ± 0,74	0,16 ± 0,01
Enzimātiski hidrolizētai sūkalu barotnei	4,95 ± 0,25	13,73 ± 2,28	1,69 ± 0,55	0,50 ± 0,03
Kombinētai sūkalu un KE (15%) barotnei	6,97 ± 0,17	50,50 ± 3,01	1,91 ± 0,41	0,70 ± 0,02

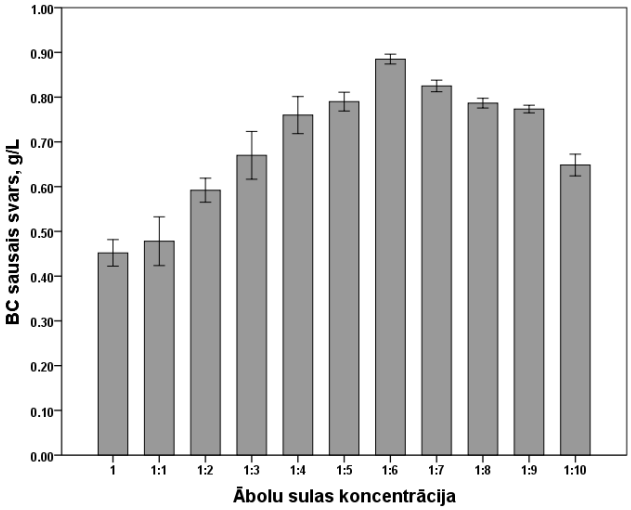
Secinājumi

1. *K. rhaeticus* P-1463 izmanto laktozi un galaktozi kā vienīgos C avotus standarta HS barotnē, sasniedzot BC sauso svaru attiecīgi 0,26 ± 0,01 un 0,25 ± 0,03 g/L.
2. Neorganisko slāpekļa avotu pievienošana nedeva vai deva minimālu BC produktivitātes uzlabojumu sūkalu barotnē.
3. Enzimātiskā hidrolīze tika novērtēta kā efektīvākais sūkalu apstrādes veids, kas deva BC sauso svaru 4,95 ± 0,25 g/L, tas ir, par 67,47% vairāk nekā uz nehidrolizētu sūkalu barotnes.
4. Kukurūzas ekstrakta pievienošana sūkalu barotnei deva visaugstāko BC sintēzes pieaugumu, salīdzinot ar kontroli starp izvērtētajām piedevām, būtiski paaugstinot BC iznākumu sūkalu barotnēs.
5. Optimizējot sūkalu barotnes sastāvu, vislielāko efektivitāti izrādīja 15% kukurūzas ekstrakta piedeva, nodrošinot 6,97 ± 0,17 g/L BC sausa svara un 50,50 ± 3,01 % iznākumu no patērēta substrāta.

Ābolu sulas izmantošana bakteriālās celulozes iegūšanai

Dažādu ābolu sulas koncentrāciju ietekmes novērtējums uz BC sintēzi

Pirmajā eksperimentā tika salīdzinātas dažādas ābolu sulas koncentrācijas, lai noteiktu vispiemērotāko atšķaidījumu BC sintēzei. Eksperimentā tika izmantots *K. hansenii* B22 celms. Tika noteikts, ka ābolu sulas optimālā koncentrācija ir 1:6 (ābolu sula : dH2O) un kopējā cukuru koncentrācija šajā atšķaidījumā bija 19,12 ± 0,56 g/L un tika iegūts 0,89 ± 0,01 g/L sausā BC svara.

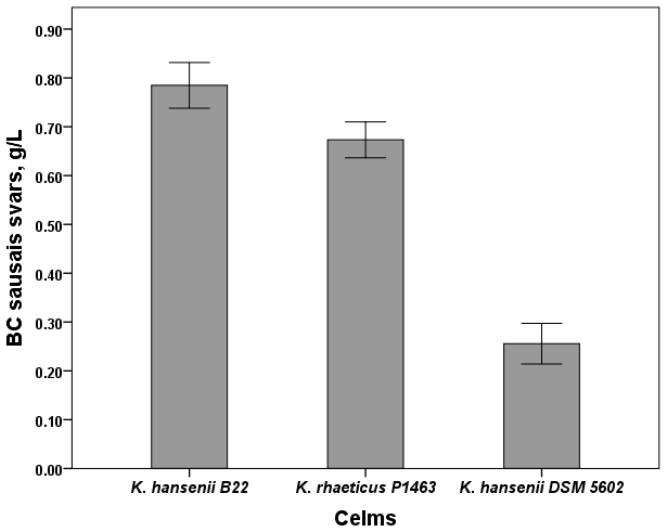


2.attēls. BC sintēze atkarībā no dažādām ābolu sulas koncentrācijām (ābolu sula : dH2O) 10 dienu kultivācijas laikā (K. hansenii B22).

Visvājākā BC sintēze tika novērota neatšķaidītai ābolu sulai. Šādas atšķirības BC sintēzē ir skaidrojamas ar to, ka pārlieku liela cukuru koncentrācija veicina organisko skābju sintēzi barotnē, kas samazina barotnes pH un būtiski ietekmē šūnu dzīvotspēju un BC sintēzi. Ir zināms, ka D-glikoze kā C avots tiek izmantota enerģijas ieguvei un pāri palikusī glikoze tiek pārveidota glikonskābē ar dehidrogenāžu palīdzību, tāpēc, ja sākotnēji ir augsta glikozes koncentrācija, tā nepalielinās BC ieguvi, bet to samazinās. (Vandamme et al.1997). Tādējādi pārlieku liela cukuru koncentrācija neveicinās BC sintēzi, bet tieši pretēji, to samazinās. Savukārt, lielāki ābolu sulas atšķaidījumi izraisīja barības vielu trūkumu un BC netika pilnvērtīgi sintezēta, radot mazākus BC iznākumus. Tālākiem eksperimentiem tika izmantota 1:6 ābolu sulas koncentrācija.

Efektīvākā BC producenta noteikšana ābolu sulas barotnei

BC sintēze uz atšķirīgiem substrātiem dažādiem baktēriju celmiem var būtiski atšķirties, tāpēc ir svarīgi novērtēt vairāku celmu BC sintēzes efektivitāti izvēlētajai barotnei (Kolesovs un Semjonovs 2020). Eksperimenta laikā tika salīdzināti trīs celmi *K. hansenii* B22, *K. rhaeticus* P 1463 un *K. hansenii* DSM 5602, lai noteiktu to efektivitāti BC ieguvei kā substrātu izmantojot ābolu sulu. Vislielākā BC sintēze bija novērojama *K. hansenii* B22 celmam, ar to tika iegūti 0,79 ± 0,03 g/L sausā BC svara, bet visvājāk BC sintezēja K. hansenii DSM 5602 (0,26 ± 0,03 g/L). Eksperimentā tika izmantota ābolu sula ar koncentrāciju 1:6 (ābolu sula : dH2O), kas iepriekšējā eksperimentā tika noteikta, kā visefektīvākā koncentrācija BC sintēzei. Pēc šajā eksperimentā iegūtajiem rezultātiem arī turpmākajos eksperimentos tika izmantots *K. hansenii* B22 celms.

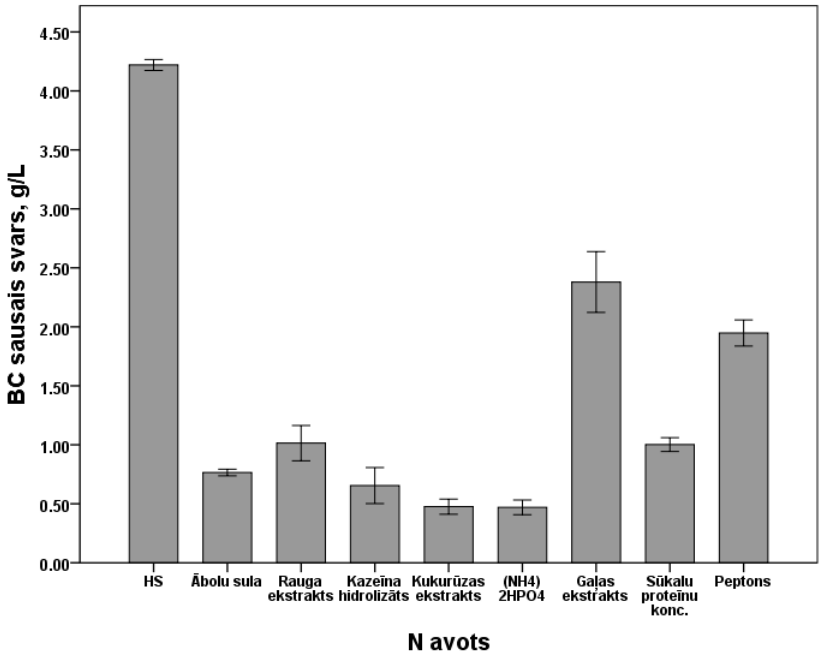


3. attēls. BC sintēze atkarībā no dažādiem EB celmiem (*K. rhaeticus* P 1463, *K. hansenii* B22, *K. hansenii* DSM 5602) 10 dienu kultivācijas laikā.

Salīdzinot ar literatūrā izmantotajiem BC producentiem *K. hansenii* B22 uz ābolu sulas spēja visefektīvāk sintezēt BC. Ir ziņots, ka vienā no pētījumiem tika izmantots *Acetobacter xylinum* NBRC 13693 uz nemodificētas ābolus sulas un tika iegūts 0,15 g/L BC sausā svara, savukārt citā pētījumā tika izmantots *Gluconobacter xylinum* CCM 3611T un BC sausai svars bija 0,2 g/L (Kurosumi et al. 2009; Bandyopadhyay et al. 2018). BC sausā svara rezultāti atšķīrās, lai gan abos pētījumos tika izmantota nemodificēta ābolu sula ar līdzīgu cukuru koncentrāciju, un viens no šiem iemesliem varētu būt celmu izvēle specifiskajai barotnei.

Ābolu sulas barotnes sastāva optimizācija ar dažādiem N avotiem

Šajā eksperimentā tika salīdzinātas vairākas N avotu piedevas optimālai modificētas ābolu sulas barotnes izveidei un kā tās ietekmēja BC sintēzi. Ābolu sulas barotnei (1:6) tika pievienots rauga ekstrakts, kazeīna hidrolizāts, kukurūzas ekstrakts, (NH4)2HPO4, gaļas ekstrakts, sūkalu proteīni un peptons. Vislabākā BC sintēze tika novērota modificētajai ābolu sulas barotnei ar 5 g/L gaļas ekstraktu, kas atbilst 2,38 ± 0,21 g/L BC, tomēr salīdzinot ar kontroles grupu – HS barotni, kuras BC sausai svars bija 4,22 ± 0,03 g/L, modificētajai barotnei bija būtiski ($p < 0,001$) mazāks.



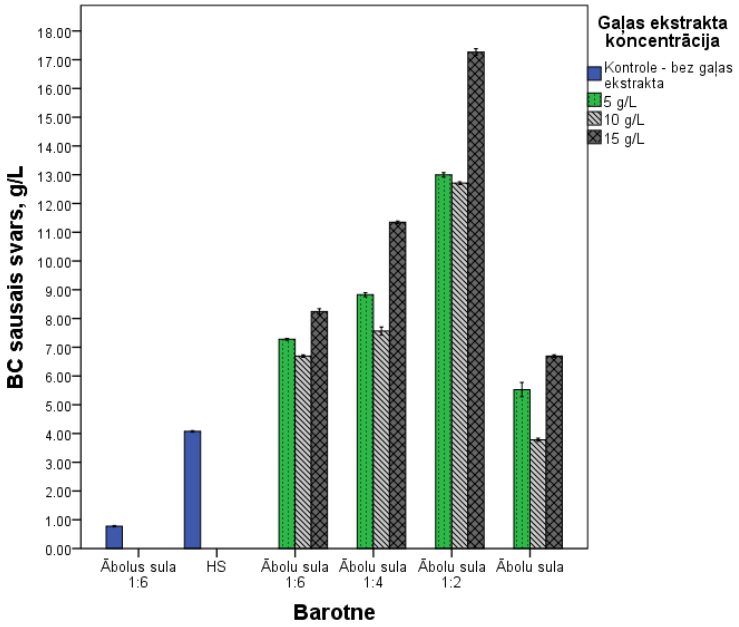
4.attēls. *K. hansenii* B22 BC sintēze atkarībā no dažādām N piedevām (rauga ekstrakts, kazeīna hidrolizāts, kukurūzas ekstrakts, (NH4)2HPO4, gaļas ekstrakts, sūkalu proteīnu koncentrāts, peptons) ābolu sulas (1:6) barotnei 10 dienu kultivācijas laikā.

Gaļas ekstrakts kalpo kā optimāls N avots BC sintēzei un parasti tieši organiskā N avoti ir ieteicami efektīvai BC sintēzei (Hungund et al. 2010). Minētajā pētījumā izmantojot Gluconacetobacter persimmonis GH-2 celmu glikozes barotnē arī gaļas ekstrakts (0,5%) bija vislabākais N avots, kas deva 6,25 g/L sausā BC svara. Gaļas ekstrakts nodrošināja barotni ar dažādiem minerālvielu, uzturvielu, vitamīnu un aminoskābju avotiem, kas uzlaboja šūnu biosintēzi un augšanu. Tika sasniegts optimālais N daudzums, kas neietekmēja citu uzturvielu uzņemšanu baktēriju šūnām, jo pārlieku liela N koncentrācija var pasliktināt BC sintēzi (Hungund et al. 2010). Kukurūzas ekstrakta un (NH4)2HPO4 pievienošana, salīdzinot ar kontroli – nemodificētu ābolu sulas barotni, BC sintēzi samazināja.

Citos pētījumos ar ābolu sulas barotni norāda arī, ka barotnei nepieciešami papildus N avoti. Ir ziņots, ka ābolu sulai ar *Acetobacter xylinum* NBRC 13693 tika pievienoti papildus N avoti, tādi kā peptons 20 g/L, rauga ekstrakts 5 g/L, un BC sausais svars salīdzinot ar nemodificētu barotni uzlabojās par 3,7 g/L, citā pētījumā ar *Gluconobacter xylinum* CCM 3611T, pievienojot N avotu - amonija sulfātu 8 g/L, uzlabojās par 0,2 g/L (Kurosumi et al. 2009; Bandyopadhyay et al. 2018). Atšķirības starp šiem iegūtajiem BC sausajiem svariem norāda uz to, ka labāks ir organiskais N avots nevis neorganiskais.

Gaļas ekstrakta koncentrācijas izvērtējums dažādās ābolu sulas barotnes koncentrācijās

Šajā eksperimentā tika noteikta optimālā ābolu sulas un piedevas – gaļas ekstrakta koncentrācija BC ieguvei. Savstarpēji tika salīdzinātas četras ābolu sulas koncentrācijas (1:0, 1:2, 1:4, 1:6) un katrai no tām tika pievienota piedeva dažādās koncentrācijās – 5 g/L, 10 g/L un 15 g/L gaļas ekstrakta. Iegūtie rezultāti liecina, ka vislabākā BC sintēze tika novērota ar gaļas ekstrakta koncentrāciju 15 g/L un 1:2 ābolu sulas atšķaidījumu, kas deva 17,27 ± 0,07 g/L sausā svara BC iznākumu. Šajā eksperimentā visefektīvākā modificētās ābolu sulas koncentrācija atšķīrās no pirmajā eksperimentā noteiktās nemodificētās ābolu sulas koncentrācijas, kas skaidrojams ar to, ka palielinoties N daudzumam barotnē, tas ietekmēja šūnu metabolismu, tādējādi palielinot šūnu aktivitāti, spēju augt un attīstīties ātrāk un tām bija nepieciešams lielāks oglekļa avotu daudzums gan šūnu augšanai, gan BC ražošanai (Som-ord et al. 2012).

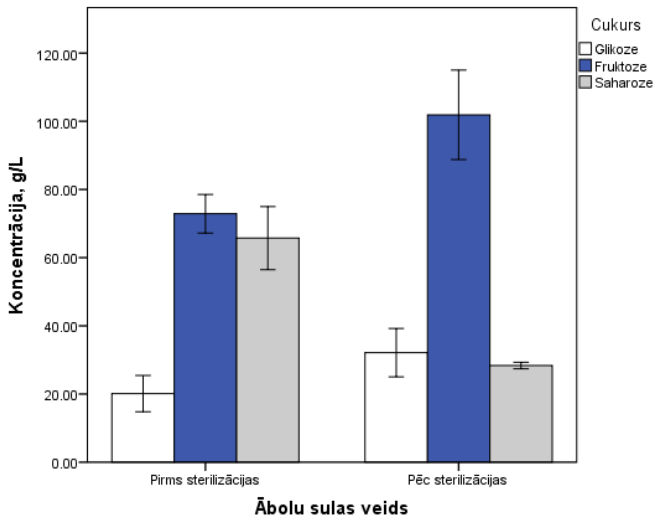


5.attēls. K. hansenii B22 BC sintēze atkarībā no modificētās ābolu sulas barotnes gaļas ekstrakta koncentrācijas 10 dienu kultivācijas laikā.

Salīdzinot ar kontroles variantiem (HS, nemodificēta ābolu sula) iegūtais BC sausais svars būtiski atšķīrās ($p < 0,001$). Ar HS barotni tika iegūts 4,07 ± 0,02 g/L, bet ar nemodificētu ābolu sulu 0,78 ± 0,02 g/L sausā BC svara, kas ir ievērojami mazāk par ābolu sulas barotni ar papildus pievienotu 15 g/L gaļas ekstraktu. Salīdzinot ar citām alternatīvajām barotnēm, piemēram, vairākām norādītajām 7.tabulā, BC sausais svars arī ievērojami atšķīrās, uzrādot daudz labāku rezultātu par citām izmantotajām barotnēm, kas liecina par to, ka tā varētu būt laba alternatīvā barotne mākslīgai HS standartbarotnei.

Ābolu cukuru sastāva izmaiņas pirms un pēc sterilizācijas

Ābolu sulas barotne sākotnēji lielākoties sastāvēja no fruktozes un saharozes, bet veicot barotnes sterilizāciju var secināt, ka ir notikusi saharozes daļēja hidrolīze, jo pēc sterilizācijas barotnē ir palielinājies fruktozes un glikozes daudzums, toties samazinājies saharozes. Sterilizācijas procesa ietekmē notika daļēja saharozes hidrolīze, kā rezultātā saharozes koncentrācija vidēji samazinājās no 65,73 ± 3,73 g/L līdz 28,37 ± 0,38 g/L. Glikozes koncentrācija palielinājās no 20,10 ± 2,14 g/L līdz 32,57 ± 4,46 g/L un fruktozes koncentrācija no 72,88 ± 2,28 g/L līdz 101,89 ± 8,23 g/L. Tādējādi arī izmainījās sākotnējā glikozes : fruktozes : saharozes attiecība no (2 : 7,3 : 6,5) par (3,3 : 10 : 2,8).



6.attēls. Cukuru (glikozes, fruktozes, saharozes) koncentrācijas izmaiņas pirms un pēc barotnes sterilizācijas (*K. hansenii* B22).

Saharoze paaugstinātās temperatūrās, kā, piemēram, autoklāvēšanas apstākļos un zema pH apstākļos, var hidrolizēties, veidojot glikozi un fruktozi (Staden et al. 1999). *K. hansenii* celmi BC sintēzē izmanto monosaharīdus, kā glikozi, fruktozi (Uzyol et al. 2016), tāpēc saharozes hidrolīze netraucē BC sintēzei. Visvairāk izmantotie oglekļa avoti BC iegūšanai ir glikozi un fruktozi saturošās izejvielas (Hungund et al. 2010).

Secinājumi

1. Salīdzinot dažādas ābolu sulas koncentrācijas, tika konstatēts, ka nemodificētas ābolu sulas optimālā atšķaidīšanas attiecība ir 1:6 (ābolu sula : dH2O) ar kopējo cukuru koncentrāciju 19,12 ± 0,56 g/L, kas ļāva iegūt 0,89 ± 0,01 g/L BC sausās masas.
2. Salīdzinot dažādus BC producentu celmus, tika noteikts, ka Komagataeibacter hansenii B22 celms ir vispiemērotākais BC sintēzei ābolu sulas barotnē.
3. Starp novērtētajām N avotu piedevām ābolu sulas barotnei vislabākos rezultātus deva gaļas ekstrakts, kuru pievienojot ābolu sulai (1:6) 5 g/L koncentrācijā tika iegūts 2,38 ± 0,21 g/L BC sausā svara.
4. Optimizējot ābolu sulas barotnes sastāvu tika noteikts, ka visefektīvākā ābolu sulas koncentrācija ir 1:2 kopā ar 15 g/L gaļas ekstrakta piedevu, kas ļauj iegūt 17,27 ± 0,07 g/L BC sausās masas, iznākums no substrāta (YP/S) sasniedzot 36,52 ± 0,97 %, kas ievērojami vairāk salīdzinot ar nemodificētās ābolu sulas barotni.

AVEŅU KVALITĀTES RAKSTUROJOŠO PARAMETRU IZVĒRTĒJUMS (2020)

Rudens Avenes

Valters Dambe (D)

SIA "Skoru Dārzi" (S)

Uzglabātas dzesētavā +4 ±1 º C RH 75±2%, t=72st.

K - kontrole

Koncentrācija

L1-1% levāna šķīdums+1% dekstrāna šķīdums

L3-3% levāna šķīdums+2% glicerīna šķīdums

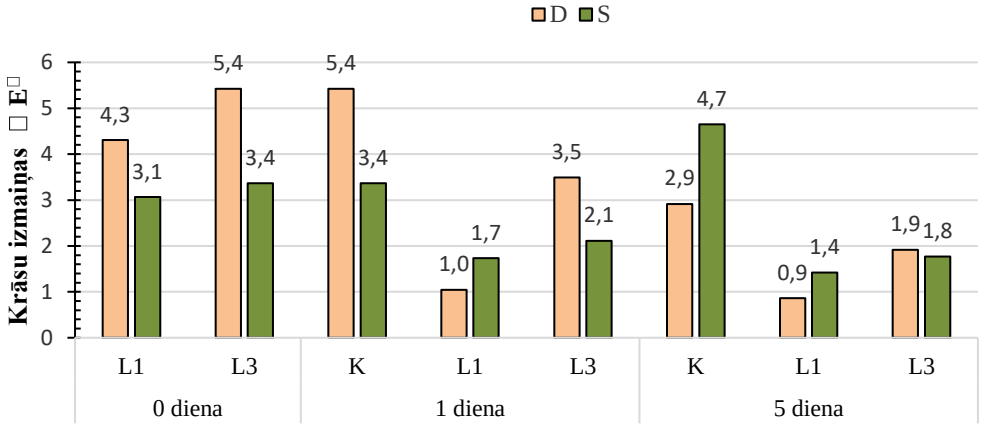
Lai pārbaudītu un novērtētu biopolimeru pārklājumu efektivitāti uz aveņu kvalitāti uzglabāšanas laikā, mērīta aveņu virsmas L* a* b* krāsas ogu paraugiem telpā un dzesētavā (1.tabula). Aveņu virsmas sarkanā krāsa pēc apstrādes ar biopolimēriem kļuva izteiktāka pēc vienas dienas uzglabāšanas, salīdzinot ar kontroles paraugiem, par to varēja secināt pēc krāsas a* vērtības palielināšanās (DL 3.1 14,3%; DL1.1. 18,1% un SL1.1 15,2%; SL3.1. 15,5%).

1.tabula

Aveņu virsmas krāsas izmaiņas uzglabāšanas laikā

Uzglabāšanas laiks	Paraugi	L*		a*		b*	
		D	S	D	S	D	S
0 diena	K	24.44	21.88	20.66	16.48	8.23	6.70
	L3	25.00	21.98	24.12	19.44	10.73	7.49
	L1	26.01	20.81	25.23	19.50	10.69	7.73
1 diena	K	25.25	22.61	21.23	18.04	8.57	6.51
	L1	24.93	22.05	23.68	18.58	9.91	6.80
	L3	24.44	21.96	23.16	20.86	9.73	8.26
5 dienas	K	25.20	22.95	20.25	17.32	8.22	6.30
	L1	25.11	22.36	22.35	18.17	8.83	6.92
	L3	24.22	21.69	22.58	19.38	9.24	7.13

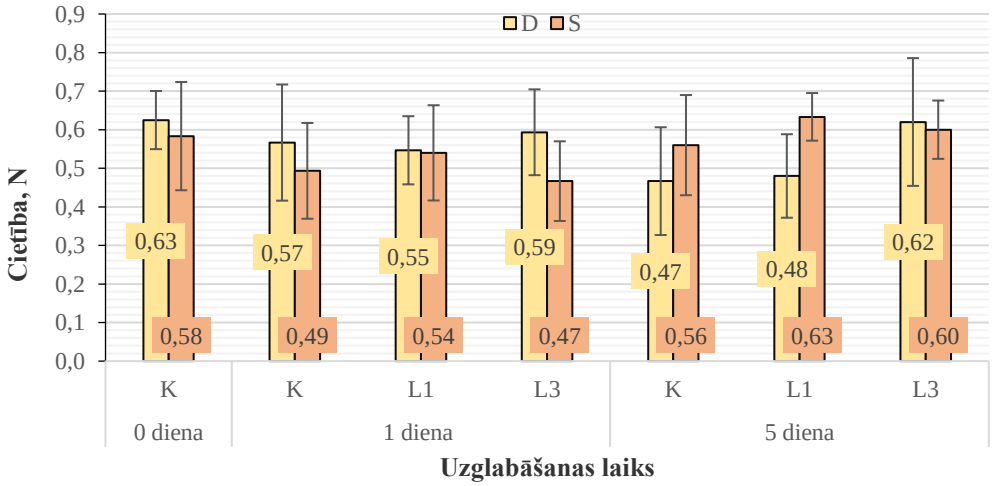
Aveņu ogu virsmas krāsu L^*, a^* un b^* vērtības komponentu kopējās izmaiņas uzglabāšanas laikā atspoguļo diferenču summa ΔE^*(1. att.).



1. Att. Krāsu kopējās izmaiņas Δ E* uzglabāšanas laikā

Mazākās krāsu komponentu Δ E*, konstatējām ar biopolimēriem apstrādātajiem D L1 0,9 un S L1 1,4 paraugiem pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā. Analizējot datus, konstatējām, ka mazākās aveņu virsmas krāsu izmaiņas ir pēc apstrādes ar biopolimēriem L1.

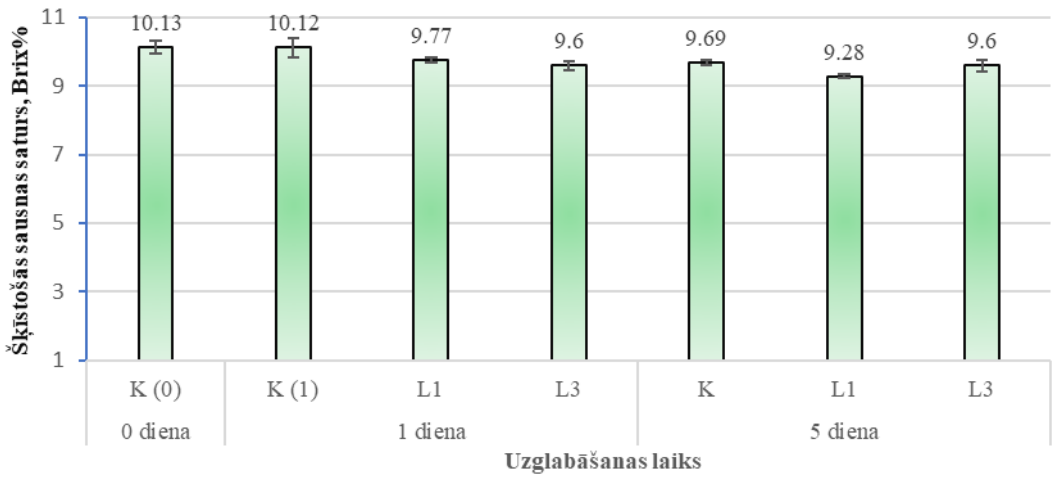
Pēc apstrādes ar biopolimēriem aveņu ogu cietība uzglabāšanas laikā būtiski nemainījās, salīdzinot ar kontroles paraugiem (2.att.).



2. att. Aveņu ogu cietības izmaiņas uzglabāšanas laikā

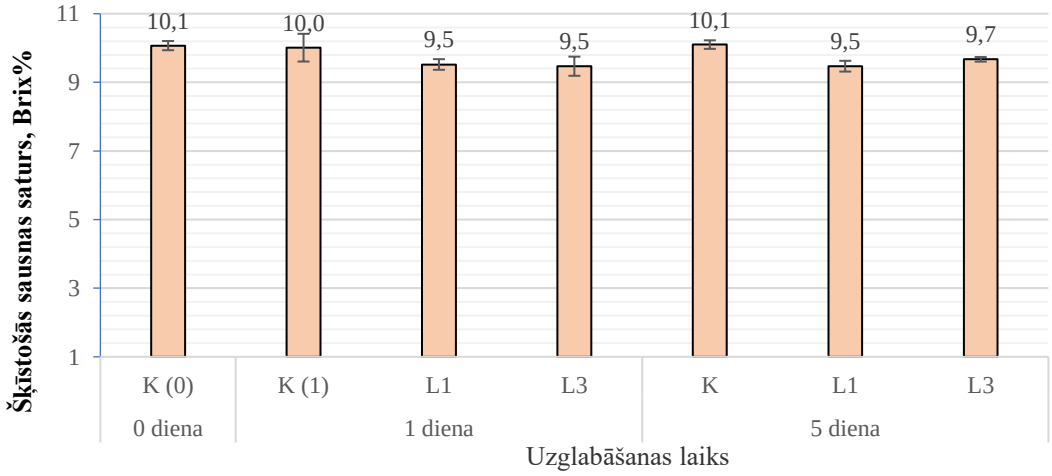
Izvērtējot, cietības rezultātus uzglabāšanas laika beigās, ir vērojama pārklājuma efektivitātes ietekme, jo pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā visiem ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem cietībai bija tendence paaugstināties. Tā bija nedaudz lielāka, salīdzinot ar kontroles paraugiem (DK 0,47 attiecīgi DL1 0,48N un DL3 0,62N; SK 0,56N attiecīgi SL1 0,63N un SL3 0,60N).

Uzglabāšanas laikā šķīstošās sausnas saturs avenēm būtiski nemainījās, kuras bija ievāktas SIA "Skoru Dārzos", taču pēc apstrādes ar biopolimēriem tas nedaudz samazinājās, salīdzinot ar aveņu kontroles paraugiem. Aveņu (S) paraugu šķīstošās sausnas satura izmaiņas apkopotas 3.attēlā.



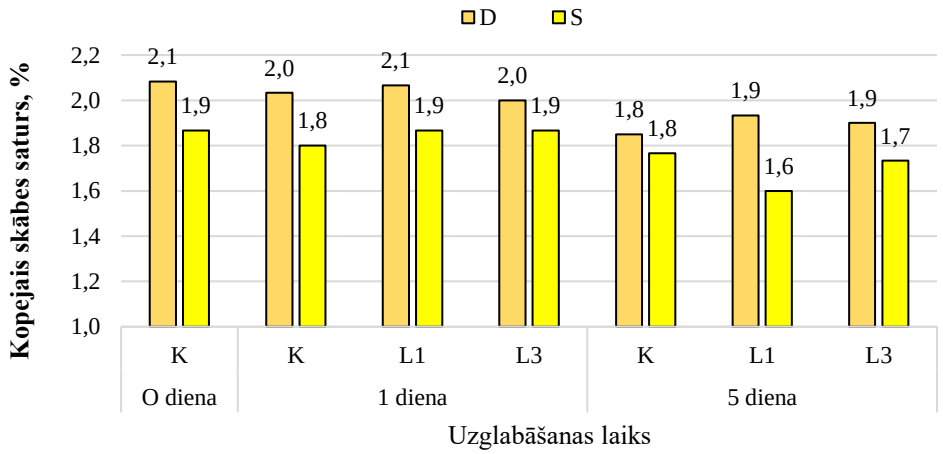
3.att. Aveņu ogu (D) šķīstošās sausnas satura izmaiņas uzglabāšanas laikā

Izvērtējot otra aveņu pētījuma (Dambe) šķīstošās sausnas rezultātus, redzams, ka šāda šķīstošās sausnas satura samazināšanās tendence saglabājās (4.att.). Pēc vienas dienas uzglabāšanas DK 10,1Brix%; DL1 9,5Brix%; DL3 9,7 Brix%



4. att. Aveņu ogu (D) šķīstošās sausnas satura izmaiņas uzglabāšanas laikā

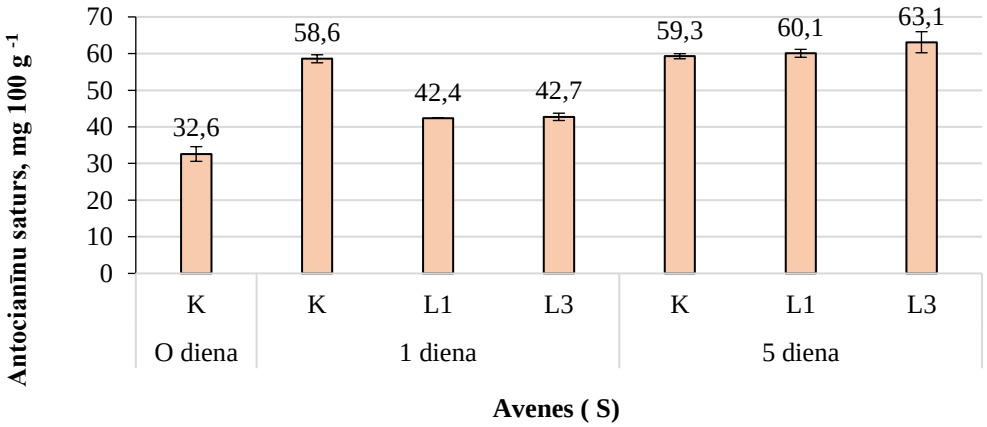
Kopējā skābes satura daudzums avenēm pētījuma laikā samazinājās visos paraugos (5.att.).



5.att. Kopējā skābes satura izmaiņas aveņu paraugos

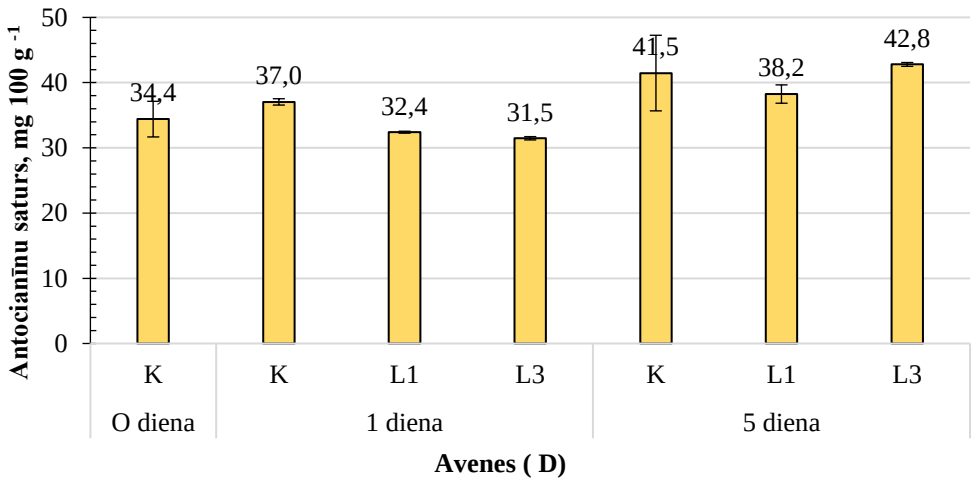
Kopējais skābes daudzums aveņu paraugos (Dambe) pēc dienas uzglabāšanas samazinājās nedaudz 1-4% (attiecīgi ar biopolimēriem apstrādātajos paraugos L1 1%;L3 4%; K 2,4 %), bet pēc piecu dienu uzglabāšanas K 12,2% un L1 7,2%; L3 8,8%. Attiecīgi "Skoras Dārzos" vākto aveņu paraugos skābes saturs pēc piecām dienām samazinājās K par 5,4%, L1 14,3% un L3 7,1%.

Antocianīnu saturs aveņu paraugos pētījuma laikā mainījās (6. un 7 att.). Aveņu (S) kontroles paraugos uzglabāšanas laikā (pirmajā un piektajā dienā) antocianīnu saturs palielinājās salīdzinot ar (0) dienas kontroli (attiecīgi par 79,7%, 59,3%). Izvērtējot antocianīnu satura izmaiņas ar biopolimēriem apstrādātajos paraugos, secinām, ka pēc apstrādes pirmajā dienā antocianīnu saturs palielinājās salīdzinoši mazāk nekā K paraugiem (vidēji par 24 %), un arī pēc piecām uzglabāšanas dienām vairāk (vidēji par 50 %).



6.att. Antocianīnu satura izmaiņas aveņu paraugos

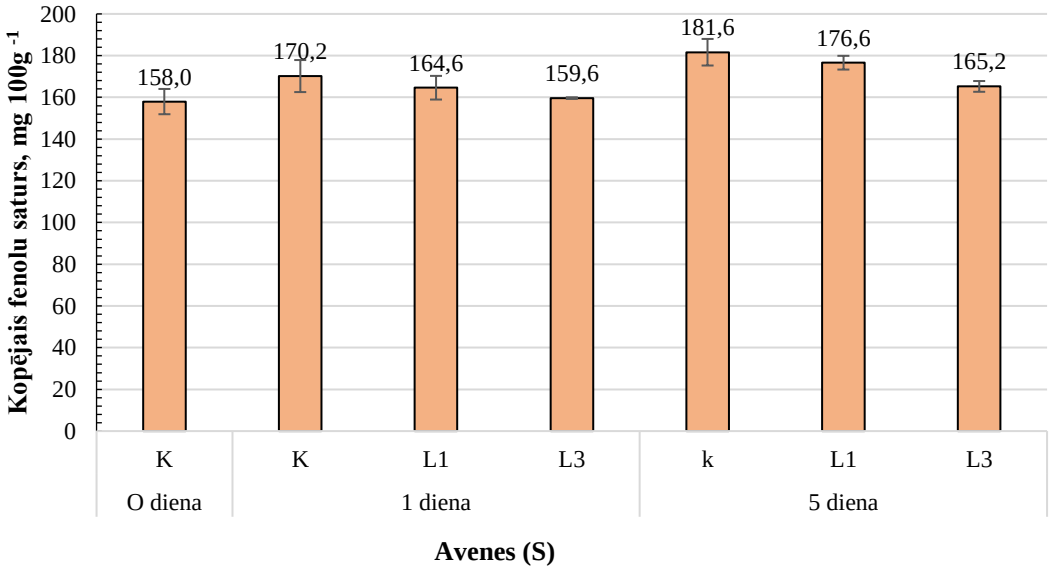
Antocianīnu satura izmaiņas uzglabāšanas laikā varēja ietekmēt arī sākotnējā ogu gatavības pakāpe. Antocianīnu saturs un tā izmaiņas pētījuma laikā starp abiem aveņu paraugiem (šķirni no Dambes (D) un SIA Skoras Dārzi (S)) bija atšķirīgas (7.att.).



7.att. Antocianīnu satura izmaiņas aveņu paraugos

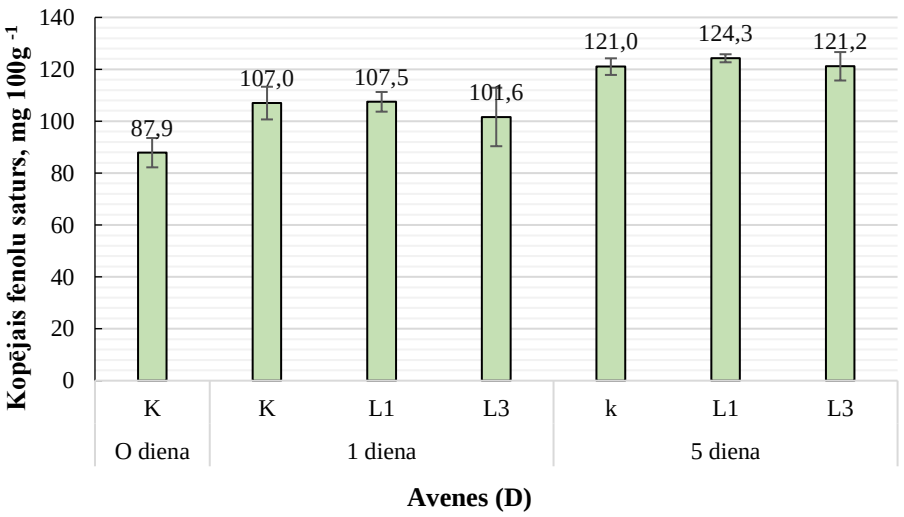
Otrās šķirnes kontroles aveņu D paraugiem antocianīnu satura palielinājums nebija izteikts pēc vienas dienas uzglabāšanas (7,7%), bet pēc piecu dienu uzglabāšanas (20,5%). Biopolimēru apstrāde šķiet apturējusi antocianīnu satura izmaiņas uzglabāšanas laikā, jo pēc dienas uzglabāšanas tas nepaaugstinājās, bet pat nedaudz samazinājās attiecīgi (L1 5.8 % un L3 8.5 %). Antocianīnu saturs pētījuma beigās paraugiem, kas bija apstrādāti ar biopolimēriem tomēr paaugstinājās salīdzinājumā ar kontroli K0 (L 11.17%; L24.4%).

Kopējā fenolu satura izmaiņas pētījuma laikā redzamas 8. attēlā (Skoras Dārzi). Kopējo fenolu saturs aveņu kontroles paraugos visā uzglabāšanas laikā nedaudz palielinājās (pirmajā dienā 7%, piektajā dienā 13%)). Savukārt ar biopolimēriem apstrādātajos paraugos uzglabāšanas laikā konstatētas vēl zemākas kopējo fenolu satura izmaiņas. Tās bija nelielas pirmajā dienā L1 4%; L3 1% un piektajā nedaudz lielākas L1 10% un L3 4%.



8.att. Kopējā fenolu satura izmaiņas aveņu (S) paraugos

Otrās saimniecības (Dambe) aveņu paraugu izmaiņas pētījuma laikā redzamas 9.attēlā. Izanalizējot datus, konstatējām, ka nav būtisku atšķirību uzglabāšanas laikā starp kontroles un ar biopolimēriem apstrādātajiem aveņu paraugiem. Kopējo fenolu daudzums uzglabāšanas laikā palielinās visos paraugos.



9.att. Kopējā fenolu satura izmaiņas aveņu paraugos

Pēc vienas dienas uzglabāšanas kopējais fenolu saturs palielinājās K par 17,9 % un ar biopolimēriem apstrādātajos paraugos līdzīgi L1 18,2%, L3 13.5%, pēc piecām dienām K par 27.4 % un ar biopolimēriem attiecīgi L1 29.3%; L3 27

Uzglabāšanas laikā konstatēti mitruma zudumi visos aveņu paraugos, kas apkopoti 2.tabulā. Izvērtējot aveņu masas (mitruma) zudumus, ir redzams, ka ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem tie ir nedaudz lielāki, salīdzinot ar kontroles paraugiem. Pēc vienas diena uzglabāšanas K paraugos masa samazinājās minimāli no o,45-0,50%. Ar biopolimēriem apstrādātajiem aveņu paraugiem masas zudumi bija nedaudz lielāki Dambe paraugiem L1 0,50 Un L3 0,53%, Skoras Dārzi" attiecīgi L1 0,54% un L3 0,64%.

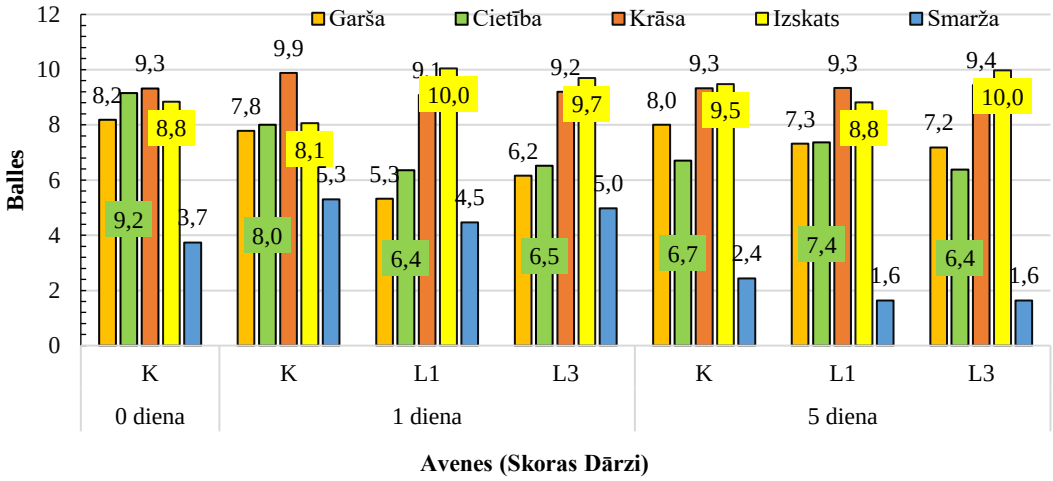
2.tabula

Aveņu masas zudumi procentos uzglabāšanas laikā

Laiks	K (D)	K (S)	L1 (D)	L1 (S)	L3 (D)	L3 (S)
1 diena	0.45	0.50	0.50	0.54	0.53	0.64
2 diena	0.78	0.96	0.84	0.99	1.07	1.23
5 diena	1.17	1.40	1.24	1.43	1.54	1.56

Izvērtējot rezultātus secināms, pirmkārt, ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem mitruma zudumi ir nedaudz augstāki salīdzinājumā ar K paraugiem, otrkārt L3 apstrādātiem paraugiem mitruma zudumi ir lielāki salīdzinājumā ar L1 (attiecīgi D L1 1,24; S L1 1,43 un D L3 1,54; S L3 1,56).

Līnijskalas sensorā novērtējuma garšas, cietības, krāsas, izskata un smaržas rezultāti redzami 9.attēlā. Par aveņu (Skoras Dārzi) ar biopolimēriem apstrādāto paraugu **izskatu** vērtētāju domas dalījās, sākumā tas bija novērtēts augstāk, salīdzinot ar kontroli (K 8,1; L1 10; L3 9.7), uzglabāšanas piektajā dienā nedaudz zemāk, bet pētījuma beigās augstāk paraugs L3 10.

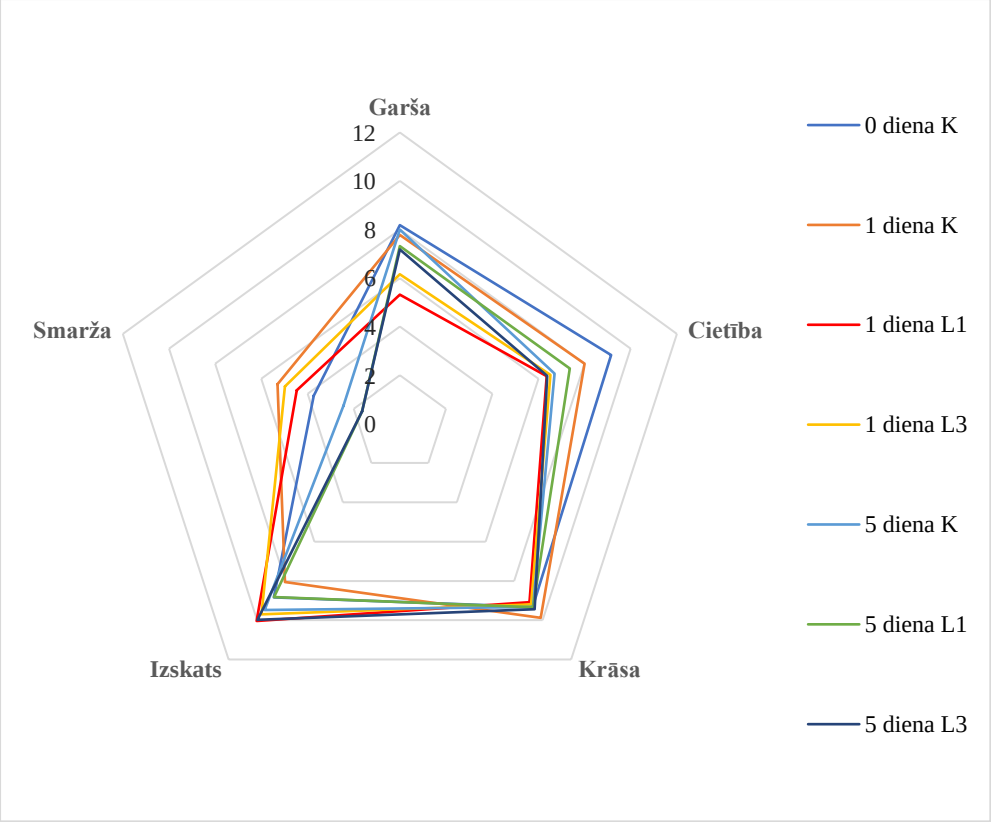


9.att. Līnijskalas (garšas, cietības, krāsas, izskata, smaržas) sensorais novērtējums

Uzglabāšanas laikā **smarža** augstāk novērtēta kontroles paraugiem. Pētījuma pēdējā dienā vērtētāji būtiski zemāk novērtējuši ar biopolimēriem apstrādātos L1 un L3 paraugus 1,6,bet K 2,4. Pēc krāsas pētījuma laikā K paraugi visas dienas bija novērtēti bija novērtēti augstāk, bet uzglabāšanas beigās piektajā dienā L3 bija novērtēts nedaudz augstāk (9,4).

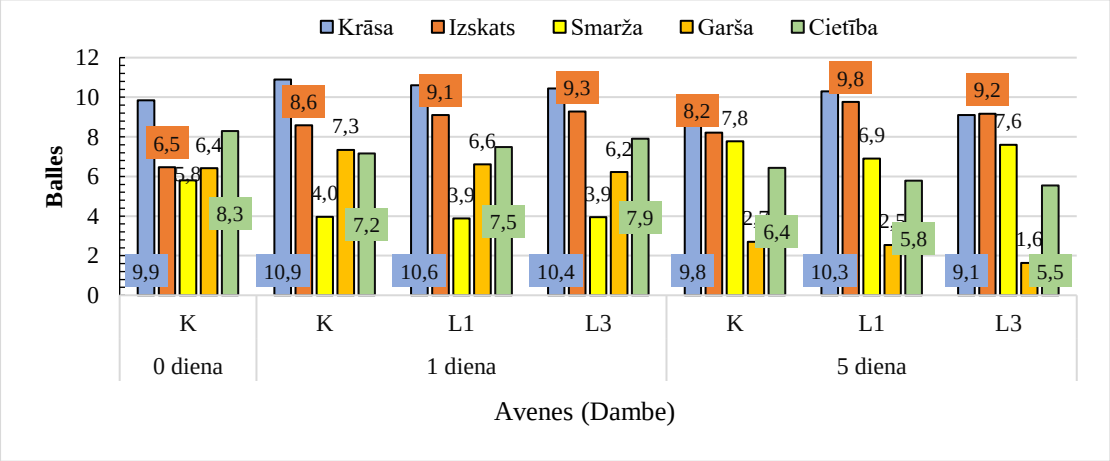
Pēc sensorās vērtēšanas rezultātiem, augstāko **garšas** novērtējumu saņēmuši K paraugi pētījuma sākumā un beigās. Pētījuma sākumā kontroles paraugu cietība tika novērtēta augstāk, bet pētījuma beigās ar biopolimēriem apstrādātajam paraugam L1 7,4.

Staru diagrammā 10 attēlā, redzams aveņu (S) pētījuma Līnijskalas garšas, cietības, krāsas, izskata un smaržas sensorā novērtējuma rezultātu apkopojums.



10.att. Aveņu paraugu (S) sensorais novērtējums

Otras saimniecības (Dambe) K aveņu paraugu **krāsa** pirmajās pētījuma dienās vērtētajiem patikusi labāk, bet pētījuma beigās – piektajā dienā ar biopolimēriem apstrādātā parauga L1 krāsa bija novērtēti augstāk 10,3 (10.att.).

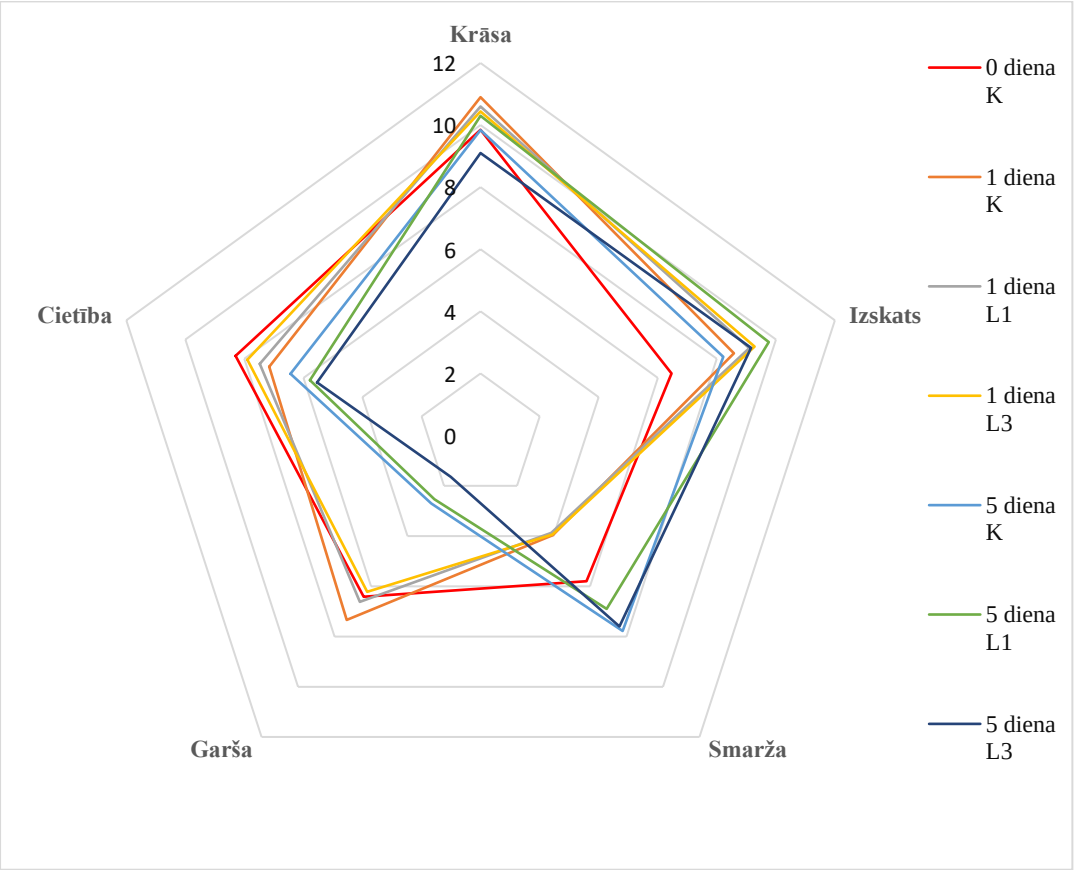


11. att. Līnijskalas sensorais novērtējums

Pēc **izskata** uzglabāšanas laikā aveņu kontroles paraugi bija novērtēti augstāk, bet pētījuma beigās ar biopolimēriem apstrādātie aveņu paraugi (L1 9,8; L3 9,2). Uzglabāšanas laikā augstākais **smaržas** novērtējums bija kontroles paraugiem. Pētījuma otrā dienā smaržas novērtējums starp K un ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem būtiski neatšķīrās.

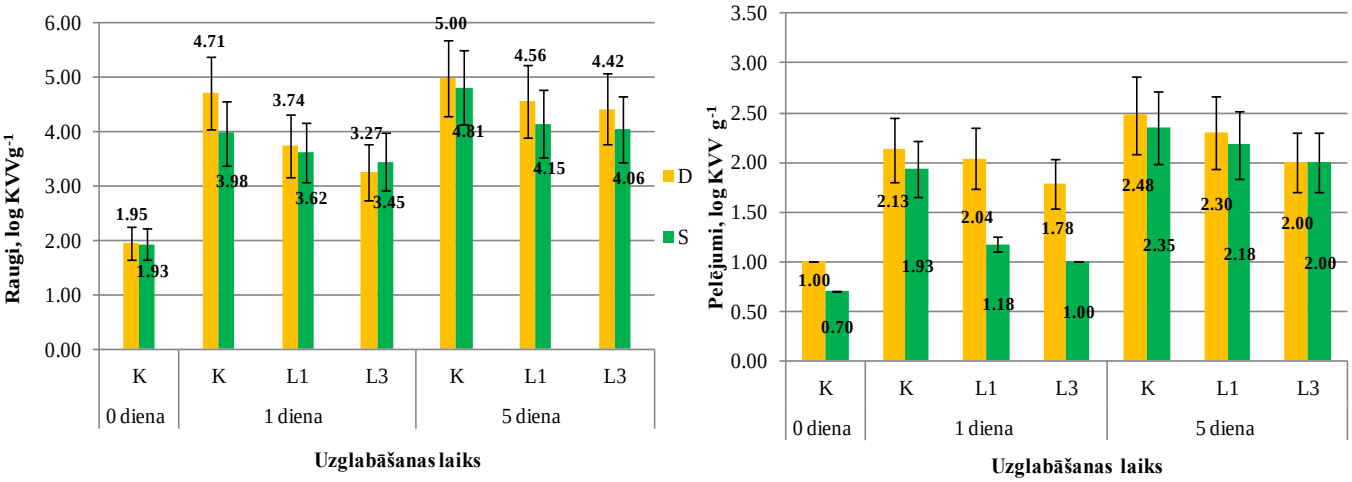
Pēc sensorā novērtējuma garša novērtēta nedaudz augstāk pirmajā uzglabāšanas dienā (DK 7,3; DL1 6,6; DL3 6,2), salīdzinot ar pētījuma sākumu vai beigām. Pētījuma beigās (piektajā dienā) paraugi novērtēti ievērojami zemāk K 2,7; L1 2,5; L3 1,6. Paraugu cietības sensorais novērtējums pētījuma sākuma K bija augstāks, kas uzglabāšanas laikā samazinājās no 8,3

līdz 6,4. Izvērtējot cietības sensoros vērtējumus, redzams, ka pirmajā dienā ar biopolimēriem apstrādāto paraugu cietība bija novērtēta salīdzinoši augstāk L1 7,5; L3 7,9 kā K parauga K 7,2. Staru diagrammā 12 attēlā, redzams aveņu (D) pētījuma Līnijskalas garšas, cietības, krāsas, izskata un smaržas sensorā novērtējuma rezultātu apkopojums.



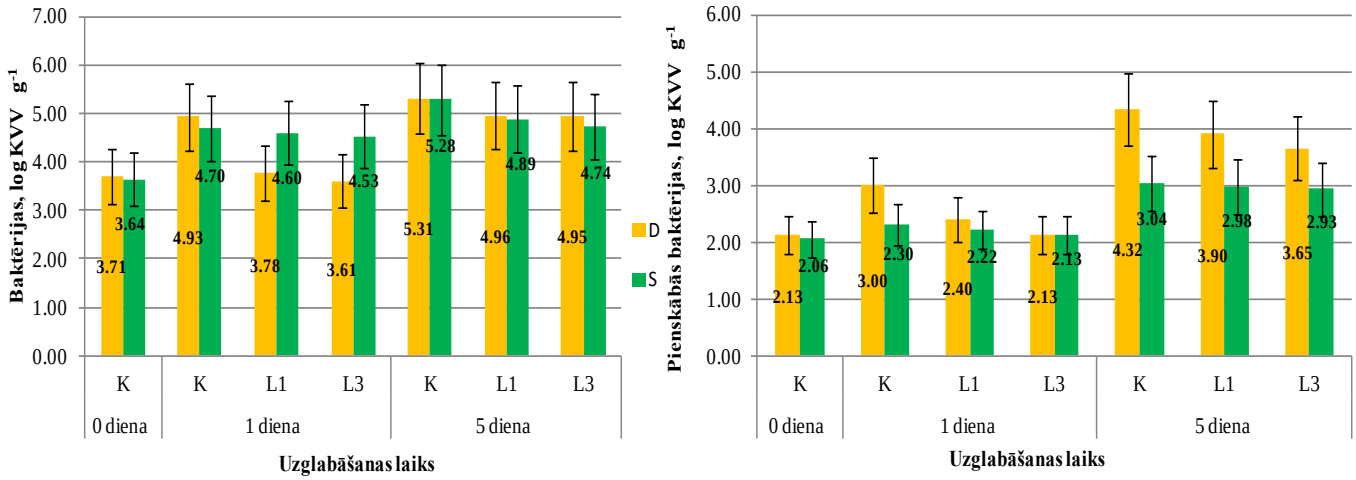
12.att. Aveņu paraugu (D) sensorais novērtējums

Izvērtējot raugu un pelējuma kopskaita izmaiņas aveņu paraugos uzglabāšanas laikā redzamas, ka augstāks piesārņojums konstatēts kontroles paraugos 1. un 5. uzglabāšanas dienā (13. att.). Būtiska atšķirība tika novērota raugu un pelējumu kopskaita izmaiņām starp uzglabāšanas dienām un paraugu piegādes saimniecībām.



13.att.Raugu un pelējuma kopskaita izmaiņas avenēm uzglabāšanas laikā (2020. pētījuma gada)

Izvērtējot baktēriju un pienskābes baktēriju kopskaita izmaiņas uzglabāšanas laikā redzams, ka augstāki baktēriju radītāji bija kontroles variantā pēc uzglabāšanas (14. att.). Būtiska atšķirība baktēriju kopskaitā starp apstrādes veidiem netika konstatēta (14. att., baktērijas). Savukārt pienskābo baktēriju skaits būtiski pieauga 5 uzglabāšanas dienā, atšķirība starp apstrādes veidiem netika konstatēta, bet no mikrobioloģiskā viedokļa svaigākas ogas bija no S saimniecības, jo pienskābes baktēriju kopskaits bija būtiski zemāks salīdzinoši ar saimniecību D (14. att., pienskābes baktērijas).



14.att.Baktēriju kopskaita izmaiņas avenēm uzglabāšanas laikā (2020. pētījuma gada)

AVENES (2021.GADS)

Projekta uzdevumu ietvaros 8. un 21. septembrī veikts komplekss pētījums aveņu uzglabāšanas laika pagarināšanai, izmantojot apstrādi ar biopolimēriem un biopolimēru ieliktņus. Lai novērtētu biopolimeru pārklājumu apstrādes un ieliktnīšu efektivitāti uz aveņu kvalitāti uzglabāšanas laikā, testēta aveņu kvalitāte, noteikti fizikālie rādītāji (krāsa, cietība, masas zudumi), ķīmiskie un sensorie rādītāji.

Testēta aveņu ogu virsmas krāsa. Noteiktas krāsu L* a* b* vērtības ogu paraugiem, kuri bija uzglabāti telpā (dzesētavā (4±1°C). Krāsu vērtības CIE L∗a∗b∗ krāsu sistēmā: L* vērtība-intensitāte (0 = melns, 100 = balts); a∗ vērtība (–a∗ = zaļš, +a∗ = sarkans) un b∗ vērtība (–b∗ = zils, +b∗ = dzeltens). Aveņu krāsu L^*, a^* un b^* vērtības komponentu kopējās izmaiņas uzglabāšanas laikā atspoguļo diferenču summa ΔE^*.

Pētījuma laikā testētās ogu virmas krāsu vērtības un aprēķinātās krāsu izmaiņas apkopotas tabulās. Pirmajā tabulā norādīti aveņu paraugu virsmas krāsu L* a* b* rādītāju testēšanas rezultāti, kas iegūti testējot avenes, kuras ievāktas Dambes saimniecībā, bet otrā tabulā avenes, kuras ievāktas saimniecībā "Skoras Dārzi". Pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā novērotas pirmā vākuma aveņu virsmas krāsas izmaiņas, tā kļuvusi tumšāka, krāsojums un sarkanāks. K paraugam a* vērtība (sarkanā krāsa) palielinājās par 13,8%, bet apstrādātajam A paraugam par 21,1%. Būtiski lielākās krāsas izmaiņas konstatētas kontroles paraugam par to norādīja diferenču summa ΔE*(4,6). Aveņu virmas krāsojums uzglabāšanas laikā mainījās, kļuva piesātinātāks, tumšāks. Par to norāda krāsas piesātinātība C*ab pirmajā dienā K 21,4, bet pēc 5 dienām 24,6.

1. Tabula

Aveņu (D) virsmas krāsu rādītāju L* a* b* izmaiņas (C ΔE*) uzglabāšanas laikā

Testēšanas laiks	Paraugi	Krāsu L*a*b*vērtības							
		L*		a*		b*		ΔE*Lab	**C*** $_{ab}$
		VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	VID
0 diena	K	25,5	1,4	19,9	2,4	7,9	3,0	-	21,4
5 dienas	K	22,2	2,2	22,6	2,6	9,5	1,3	4,6	24,6
	A	25,2	1,7	24,1	2,3	9,7	1,6	4,6	26,0
	I	26,5	1,7	23,8	2,8	9,8	1,6	4,5	25,7
	1R	26,3	1,7	22,9	3,1	9,7	1,6	3,6	24,8
	1RA	25,8	1,7	24,0	2,7	9,7	1,4	4,5	25,9
	IA	25,2	3,5	23,8	4,3	10,1	2,1	4,5	25,9
	2RA	24,8	1,9	22,2	2,1	9,0	1,4	2,7	24,0
	2R	27,1	1,2	24,6	3,3	10,3	1,9	5,5	26,7
7 dienas	1RSL	24,4	1,5	23,9	3,2	9,0	1,8	4,3	25,5
	KSL	22,7	1,1	23,8	2,2	8,6	1,4	4,9	25,3
	ISL	21,9	1,5	23,5	3,0	8,2	1,7	5,1	24,9
	2RSL	25,1	1,9	24,7	2,8	8,9	1,4	5,0	26,3

Pēc 5 dienu uzglabāšanas dzesētavā aveņu paraugiem (S) ogu virmas krāsa kļuva tumšāka (2.tabula). a* vērtība palielinājās K paraugam 10,6%, bet pārējiem paraugiem līdz 15,2%. Izvērtējot ogu paraugus, kuri glabājās SHELF LIFE (SL) telpas temperatūrā redzams, ka ir krāsu diferenču summa izmaiņas ΔE* atšķirīgas. Biopolimēru apstrādes un ieliktņu efektivitāte (diferenču summa ΔE*Lab būtiski mazāka) novērota paraugiem:1RSL 2,6; 2RSLA2,4; 1ISL 2,5, bet kontroles paraugiem (diferenču summa ΔE*Lab augstāka) KSL 4,4 KSLA4,8.

2. tabula.

Aveņu (S) virsmas krāsu rādītāju L* a* b* izmaiņas (C ΔE*) uzglabāšanas laikā

Testēšanas laiks	Paraugi	Krāsu L* a* b* vērtības							
		L*		a*		b*		ΔE*Lab	C* ab
		VID	Stdev	VID	Stdev	VID	Std	VID	VID
0 diena	K	24,2	1,4	18,5	2,2	18,5	1,2	-	18,5
5 diena	K	22,4	1,4	20,5	1,9	20,5	0,9	3,4	20,5
	A	22,6	1,0	19,9	1,8	19,9	1,0	2,6	19,9
	I	21,2	0,9	20,4	2,1	20,4	1,1	4,1	20,4
	1R	21,9	2,0	20,9	3,1	20,9	1,5	4,2	21,0
	1RA	20,5	2,6	21,3	3,4	21,3	1,5	5,5	21,3
	IA	21,8	1,2	20,8	2,4	20,8	1,2	4,1	20,8
	2RA	22,0	1,4	20,0	2,9	20,0	1,4	3,1	20,0
	2R	23,1	1,1	20,4	1,5	20,4	0,7	2,9	20,4
7 diena	1RSL	21,7	1,6	18,4	2,9	18,4	1,5	2,6	18,5
	1RSLA	20,9	1,6	18,0	2,3	18,0	0,9	3,4	18,1
	2RSL	21,9	1,1	19,6	1,8	19,6	1,0	2,8	19,6
	2RSLA	21,9	1,3	18,9	2,3	18,9	1,1	2,4	18,9
	KSL	21,6	1,6	17,9	2,8	17,9	1,3	4,4	18,0
	KSLA	20,3	2,3	16,6	2,7	16,6	1,1	4,8	16,6
	ISL	21,8	1,9	18,3	2,4	18,3	1,1	2,5	18,3
	IASL	21,2	1,2	18,0	1,2	18,0	0,8	3,2	18,0

Pētījuma laikā D un S veņu paraugu viena daļa ogu paraugu uzglabāti SHELF LIFE apstākļos, un to masas zudumi aprēķināti un apkopoti 3.tabulā.

3.tabula

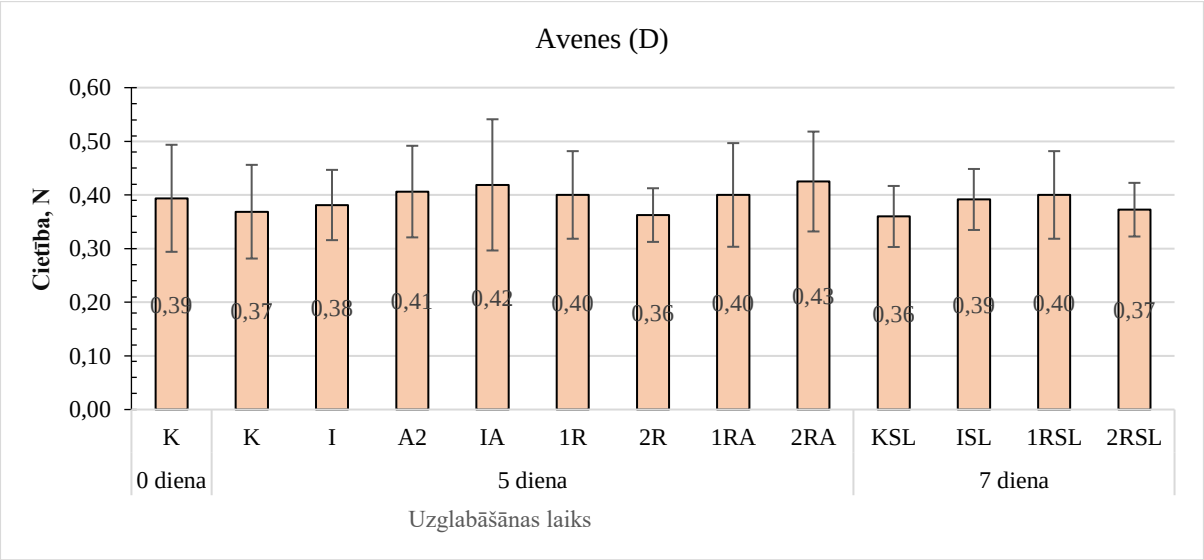
Masas zudumi procentos

Paraugi	Avenes (D)			Avenes (S)		
	5 dienas	7 dienas	9 dienas	5 dienas	7 dienas	9 dienas
KSL	**2,3**	**3,3**	4,1	2,1	3,2	4,4
ISL	1,7	2,6	3,4	1,7	2,6	4,1
KSLA	2,1	3,0	3,8	2,0	2,8	4,4
IASL	2,1	3,1	4,1	2,0	2,9	5,7
1RSL	2,0	2,8	3,6	1,8	2,6	3,8
2RSL	1,9	2,8	3,5	1,6	2,3	3,9
1RSLA	**2,3**	**3,3**	**4,3**	1,7	2,7	4,7
2RSLA	2,1	2,9	3,9	**2,3**	**3,4**	5,2

D aveņu paraugiem, lielākie ogu masas zudumi pēc piecu dienu uzglabāšanas telpas temperatūrā 2,3% KSL un 1RSLA paraugam, bet mazākie 1,7% ISL. Savukārt S aveņu

paraugiem lielākie zudumi pēc apstrādes 2RSLA 2,3%, bet mazākie 2RSL 1,6%.

Aveņu cietības izmaiņas nebija būtiskas, tikai parādījās tendence, kas varbūt norāda par apstrādes efektivitāti ar biopolimēriem (1. att.).

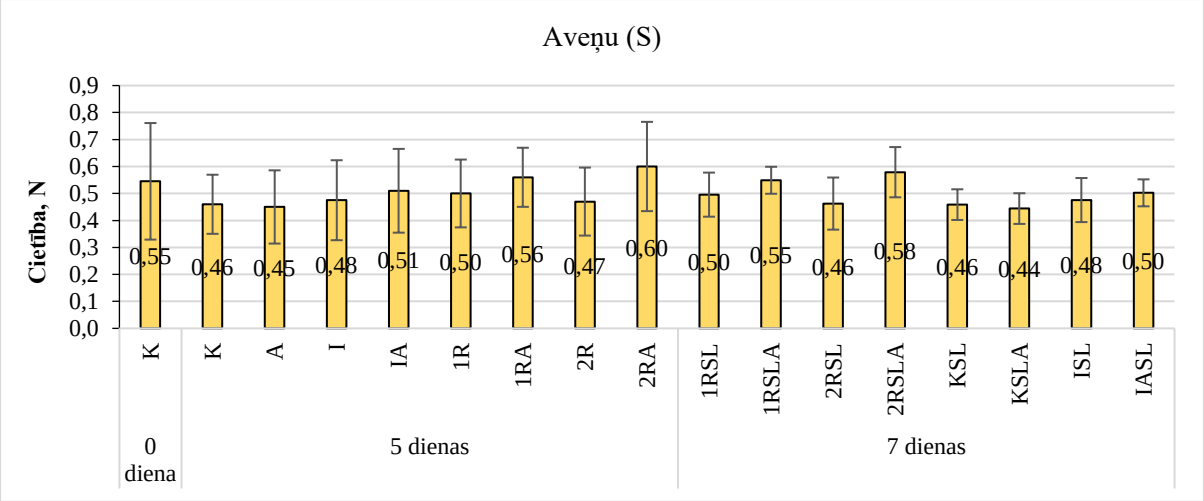


1.att. Aveņu cietības izmaiņas pētījuma laikā

Aveņu cietība būtiski nemainījās pētījuma laikā pirmā vākuma ogām. K un I paraugiem pēc piecu dienu uzglabāšanas tā minimāli samazinājās (no 0,39N līdz 0,37N un 0,38N). Savukārt ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem tā nedaudz paaugstinājās salīdzinot ar pirmo dienu no 2 līdz 7% (1RA un 2RA), izņemot 2R (kur samazinājās par 8%).Pētījuma beigas parauga 1RSL (4,0 N) ar biopolimēriem apstrādāto aveņu cietība bija augstāka salīdzinājuma ar K (0,36N) paraugu.

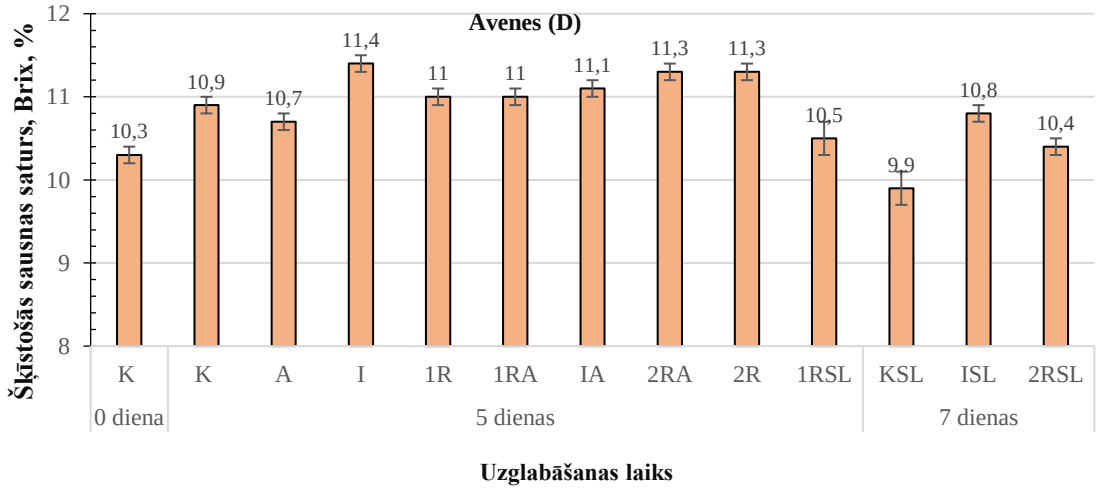
Aveņu (S) paraugu cietības testēšanas rezultāti un izmaiņas redzamas 2. attēlā. Aveņu (S) ogām (***vērojama tendence)*** cietība uzglabāšanas laikā (pēc piecām dienām) samazinājās. Lielākais samazinājums novērots avenēm pēc apstrādes A(21%) un 2R (17%). Nedaudz mazāks cietības samazinājums bija paraugiem K (16%), I (13%), 1R (9%) un IA (7%). Savukārt paraugiem 1RA un 2RA ***vērojama tendence uz ogu cietības palielināšanos.***

5.tabula



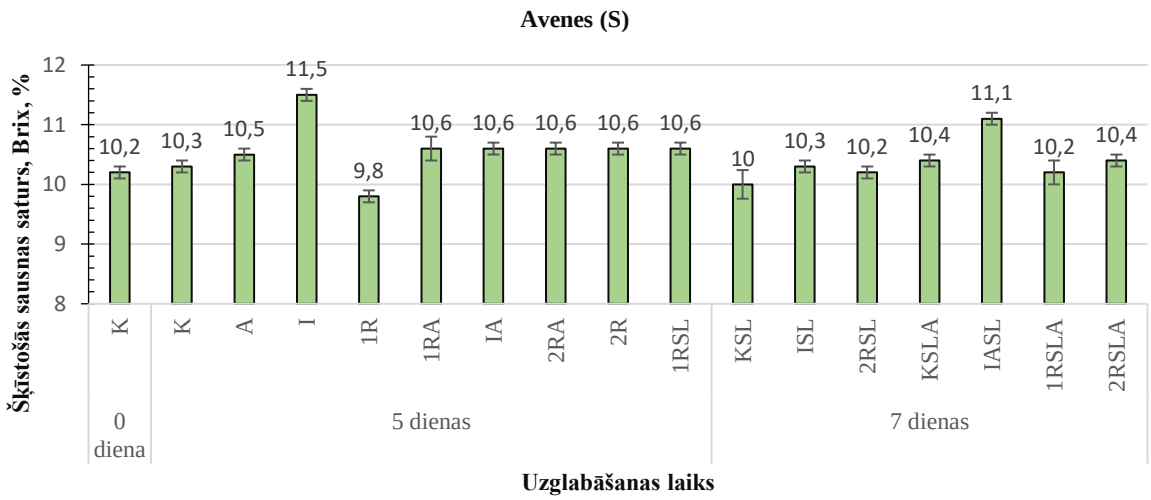
2. att. Aveņu cietības izmaiņas pētījuma laikā

Šķīstošās sausnes saturs pētījuma laikā D un S avenēm mainījās. Pēc piecām aveņu D paraugu uzglabāšanas dienām dzesētavā tas palielinājās no 4,6% (A) līdz 10,6% (I) paraugos, bet 0,6% (K) līdz 11,9% (I) aveņu S paraugos (3.attēls).



3. att. Šķīstošās sausnas satura izmaiņas pētījuma laikā

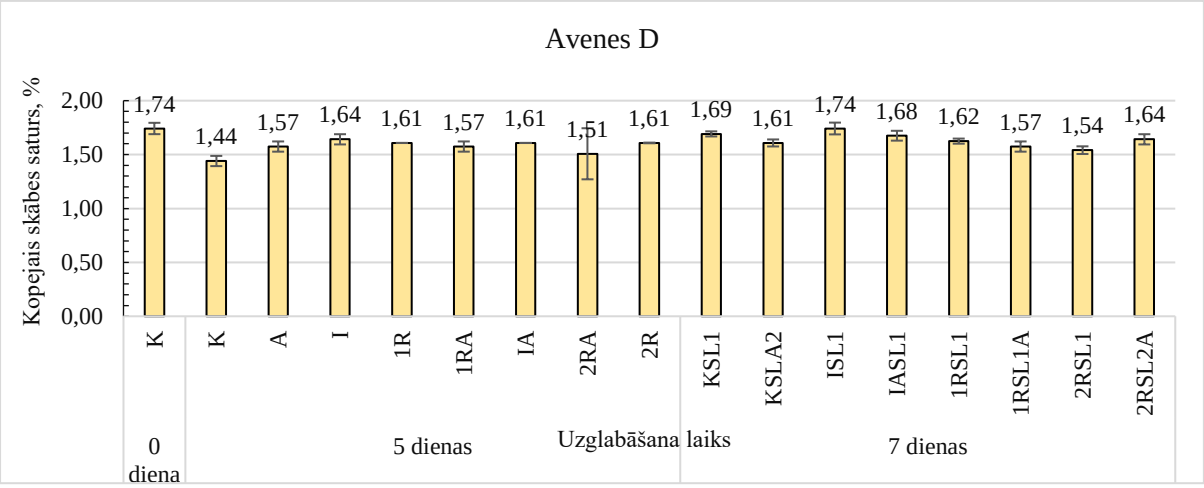
Savukārt D un S aveņu ogu paraugiem, kas uzglabāti SHELF LIFE apstākļos, šķīstošās sausnes saturs, palielinājās salīdzinoši mazāk, attiecīgi 1,7 līdz 5,6% (avenes D) un 0,1% līdz 8,2% ((avenes S).



4. att. Šķīstošās sausnas satura izmaiņas pētījuma laikā

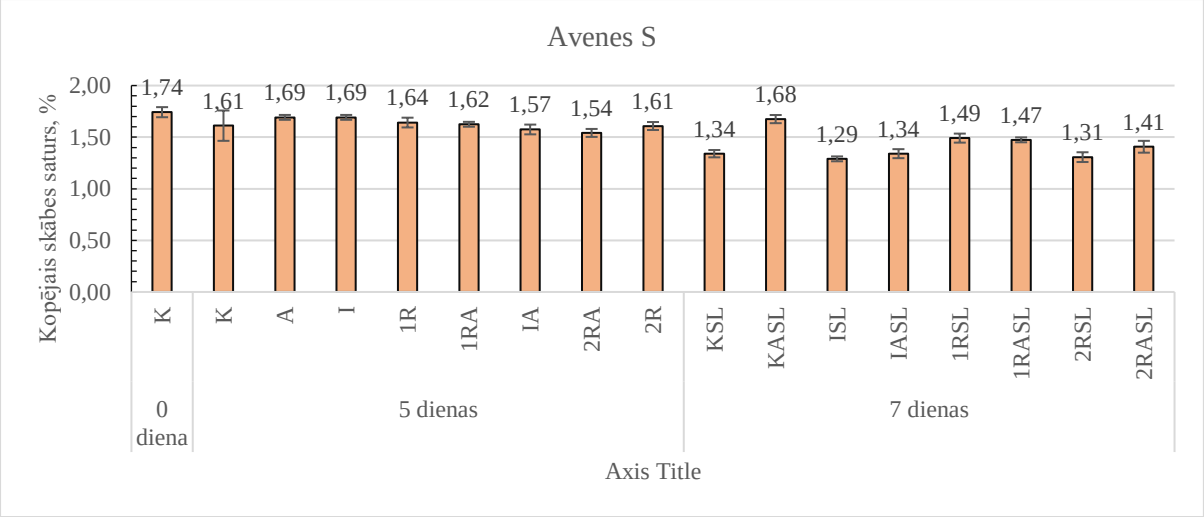
Starp paraugiem sausnas saturs nebija būtiski atšķirīgs, bet pēc apstrādes ar biopolimēriem tas nedaudz palielinājās, kas skaidrojams ar biopolimēru ķīmisko sastāvu. Šķīstošās sausnes saturs abu vākumu K paraugiem samazinājās 3.15 un 9,7%, kas saistīts ar ogu pārgatavošanos.

Aveņu (D) paraugu kopējās skābes satura testēšanas rezultāti apkopoti 5.attēlā. Pēc piecu dienu uzglabāšanas kopējās skābes saturs aveņu D kontroles bija samazinājies attiecīgi par 17,3% .Izvērtējot pirmā vākuma ar biopolimēriem apstrādātos ogu paraugus, vērojama *neliela apstrādes ietekmes efektivitāte* gan pēc piecu dienu uzglabāšanas, gan SHELF LIFE periodā.



5. att. Kopējās skābes satura izmaiņas pētījuma laikā

Aveņu (S) paraugu kopējās skābes satura testēšanas rezultāti apkopoti 6.attēlā. Pēc piecu dienu uzglabāšanas kopējās skābes saturs aveņu S kontroles bija samazinājies attiecīgi par 7,5%.



6. att. Kopējās skābes satura izmaiņas pētījuma laikā

Abos gadījumos kopējās skābes satura samazinājums ir mazāks, nekā K paraugam izņemot ISL paraugu.

Antocianīnu satura izmaiņas aveņu D paraugiem pētījuma laikā apkopotas 4. tabulā. Antocianīnu saturs uzglabāšanas laikā aveņu K paraugā palielinājās (vidēji par 22,2 %), salīdzinot ar kontroli 0 dienā. Izvērtējot ar biopolimēriem apstrādātajos paraugus, secinām, ka pēc paraugu piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā, antocianīnu saturs paraugos palielinājās līdzīgi (vidēji par 22,8 %). Izvērtējot paraugus, kuri uzglabājās Shelf Life, redzams, ka antocianīnu saturs tajos palielinājās vairāk. K 31,4%, bet apstrādātajos 1RSL (47,2%);2RSL (46,4%), bet ar ieliktni ISL 58,8%.

Pētījuma laikā kopējā fenolu satura palielinājuma izmaiņas pēc 5 dienu uzglabāšanas dzesētavā K paraugos (11,4%) līdzīgas ar biopolimēriem apstrādāto paraugu fenolu satura izmaiņām, kas ir nedaudz augstākas (vidēji 14,1%) (4.tabula). Izvērtējot paraugus, kuri uzglabājās Shelf Life, redzams, ka kopējais fenolu saturs ar biopolimēriem apstrādātajos paraugos palielinājās vairāk (līdz 22,3%), salīdzinot ar K (vidēji 12,1%). Kopējais fenolu satura palielinājums (vidēji 17,7%) pēc apstrādes varētu būt skaidrojamas ar pašu biopolimēru ķīmisko sastāvu.

4. tabula.

Kopējā antocianīnu un fenolu satura izmaiņas uzglabāšanas laikā D avenēs

Datums	Paraugs	*Kopējais antocianīnu saturs, mg 100 g^{-1}		Izmaiņas	*Kopējais fenolu saturs, mg 100 g^{-1}		Izmaiņas
		Vid.	Stdev	%	Vid.	Stdev	%
0 diena	K	20,1	0,8		105,9	3,4	
5 diena	K	24,5	0,0	22,2	117,9	5,2	11,4
	A	23,9	0,5	19,0	114,3	6,5	8,0
	I	24,9	0,2	24,0	117,8	8,2	11,3
	1R	24,2	1,7	20,4	115,5	8,4	9,1
	1RA	25,4	1,6	26,8	124,3	4,9	17,4
	IA	24,8	1,0	23,6	125,6	2,9	18,7
	2RA	24,3	0,5	20,9	124,0	6,9	17,2
	2R	25,1	0,2	24,9	123,7	0,7	16,8
7 diena	KSL	26,4	0,6	31,4	118,7	2,0	12,1

	1RSL	29,5	1,1	47,2	122,7	1,9	15,9
	ISL	31,9	0,7	58,8	129,5	1,7	22,3
	2RSL	29,4	0,5	46,4	121,6	11,4	14,9

*Kopējais antocianīnu saturs izteikts cianidīn 3glikozīda ekv. mg100 g^{-1}

*Kopējais fenolu saturs, izteikts ar galluskābes ekv. mg 100 g^{-1}

Antocianīnu un kopējā fenolu satura izmaiņas aveņu S paraugiem pētījuma laikā apkopotas 5.tabulā.

5. tabula

Kopējā antocianīnu un fenolu satura izmaiņas uzglabāšanas laikā S avenēs

Datums	Paraugs	*Kopējais antocianīnu saturs, mg 100 g^{-1}		Izmaiņas	*Kopējais fenolu saturs, mg 100 g^{-1}		Izmaiņas
		Vid.	Stdev	%	Vid.	Stdev	%
0 diena	K	31,0	0,6		146,8	8,6	
5 diena	K	31,8	0,3	2,8	128,1	5,3	-12,7
	A	39,5	2,5	27,5	130,5	9,0	-11,1
	I	36,3	1,8	17,0	178,9	13,9	21,9
	1R	37,6	1,9	21,4	163,3	3,2	11,3
	1RA	41,8	2,0	35,0	148,7	12,8	1,3
	IA	38,5	5,3	24,3	175,3	0,5	19,4
	2RA	44,7	1,8	44,3	199,0	2,0	35,6
	2R	38,7	1,2	25,0	155,1	3,9	5,7
7 diena	KSL	43,2	0,7	39,3	156,2	0,7	6,4
	KSLA2	45,5	1,7	46,8	157,7	1,8	7,4
	ISL	46,7	0,6	50,6	170,8	5,2	16,4
	IASL	45,0	0,3	45,2	159,9	5,5	9,0
	1RSL1	46,4	0,3	49,8	165,6	9,5	12,8
	1RSL1A	44,2	0,4	42,7	154,5	0,5	5,3
	2RSL	45,3	2,6	46,3	152,3	8,4	3,8
	2RSL2A	42,9	0,1	38,4	154,1	1,9	5,0

*Kopējais antocianīnu saturs izteikts cianidīn 3glikozīda ekv. mg100 g^{-1}

*Kopējais fenolu saturs, izteikts ar galluskābes ekv. mg 100 g^{-1}

Antocianīnu saturs aveņu K paraugā pēc piecām dienām palielinājās pavisam nedaudz 2,8%, salīdzinot ar pētījuma pirmo dienu (0), bet ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem antocianīnu saturs palielinājās būtiski vairāk vidēji par 27,8%. Lielākais palielinājums bija pēc apstrādes ar biopolimēriem 2RA (44,3%) un 1RA (35%).Izvērtējot antocianīnu saturu pēc ShelfLife uzglabāšanas (septiņām dienām), apstrādājos paraugos ISL un IASL ir līdzīgs (45,5 un 46,7mg 100 g^{-1}), bet nedaudz augstāks, kā paraugam K (43,2 mg 100 g^{-1}).

Pēc piecu dienu uzglabāšanas kopējais fenolu saturs K paraugam (vid. 128,1 mg 100 g^{-1}), bet pēc apstrādes ar biopolimēriem ievērojami paaugstinājās 2RA līdz 199 mg 100 g^{-1} starp apstrādātajiem paraugiem vidējais 166,01 mg 100 g^{-1}. Shelf Life uzglabāšanas laikā fenolu saturs starp apstrādātajiem paraugiem būtiski neatšķīrās tas bija vidēji 156,7 mg 100 g^{-1}; ar ieliktni bija nedaudz augstāks ISL 170,8 mg 100 g^{-1}, bet ar ieliktni un apstrādi IASL 159,2 mg 100 g^{-1}.

Sensorā vērtēšana.

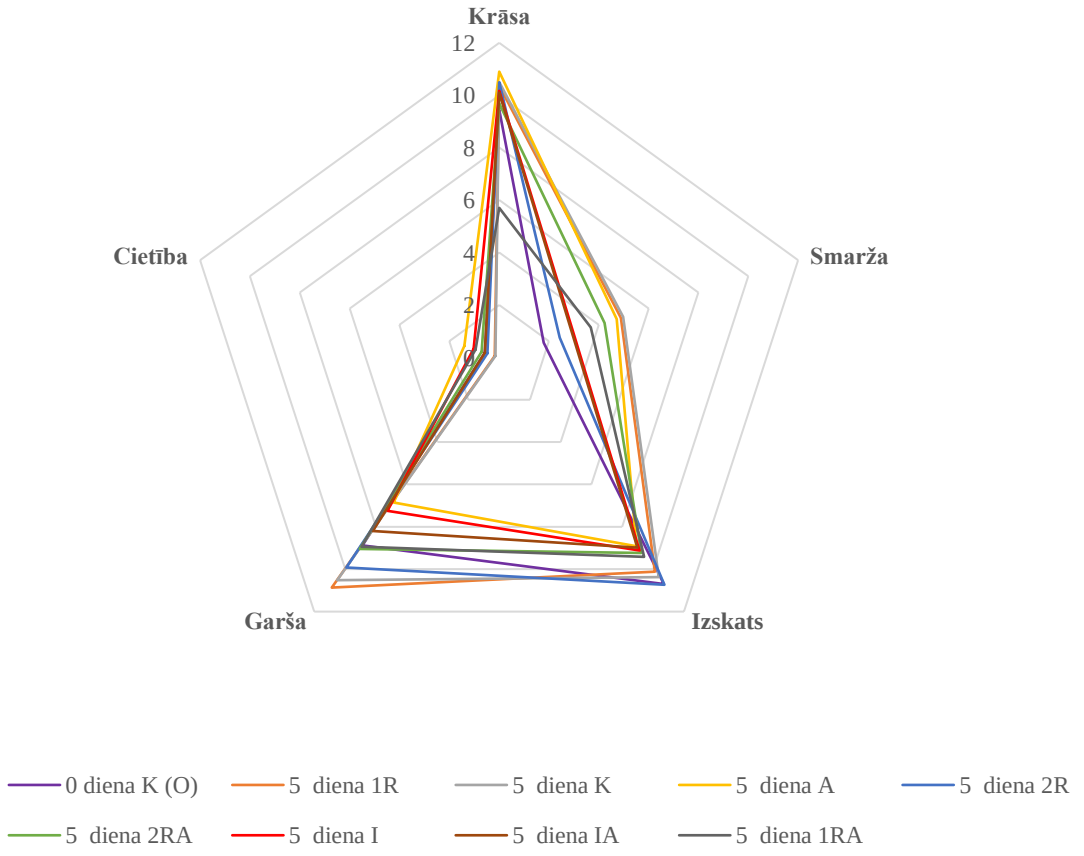
Aveņu (D) sensorā vērtēšanas rezultāti pēc līnijskalas apkopoti 6.tabulā. K(0) ir pirmā avenes ir degustētas pētījuma uzsākšanas dienā, K un pārējie aveņu paraugi ir testēti pētījuma piektajā dienā. Pēc sensorās vērtēšanas rezultātiem secināms, ka vērtētājiem pēc **krāsas**, pēc piecu dienu aveņu (D) uzglabāšanas, vislabāk patikuši paraugi A (10,9), kā nākošie bija K un 2R (10,5), kas bija novērtēti vienādi. Pēc **izskata** augstāk novērtēti paraugi K(0) un 2R vienādi ar 10,7. Pēc **garšas** vērtētājiem vislabāk paticis paraugs pēc1R novērtēts (10,9), bet mazāk patikuši paraugi pēc citu receptūru apstrādes. Tie novērtēti no intervālā 6,9 (A) līdz 9,9 (2R). Pēc smaržas - aromātiskākās un cietākās ir bijušas K ogas (vērtējums attiecīgi 5,0 un 8,7), bet no apstrādātajam 1R (attiecīgi 4,9 un 8,5).

6. tabula

Pirmā vākuma aveņu sensoro īpašību intensitātes novērtējums

Laiks	Paraugs	Krāsa		Smarža		Izskats		Garša		Cietība	
		Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.
0 diena	K (O)	9.4	0.7	1.8	0.6	**10.7**	0.4	8.9	7.8	0.6	1.2
5 diena	1R	10.4	0.3	4.9	1.2	10.1	0.5	10.9	8.5	0.2	0.8
	K	10.5	0.2	5.0	1.5	10.4	0.3	10.5	8.7	0.2	0.6
	A	10.9	0.3	4.7	1.2	8.9	0.4	6.9	8.1	1.4	0.6
	2R	10.5	0.2	2.4	0.8	**10.7**	0.1	9.9	7.7	0.5	0.7
	2RA	9.7	0.3	4.2	0.6	9.2	0.6	9.1	6.7	0.7	0.9
	I	10.2	0.3	3.0	1.1	9.1	0.5	7.3	7.6	1.0	0.7
	IA	10.1	0.4	2.9	1.2	9.0	0.4	8.2	6.6	0.6	1.2
	1RA	5.7	1.3	3.7	0.7	9.4	0.9	8.9	6.9	0.9	0.8

Aveņu D paraugu sensoro īpašību: izskata, krāsas, smaržas, cietības un garšas vērtēšanas rezultāti pēc līnijskalas apkopoti 7.attēlā.



7.att. Aveņu (D) paraugu līnijskalas sensorais novērtējums

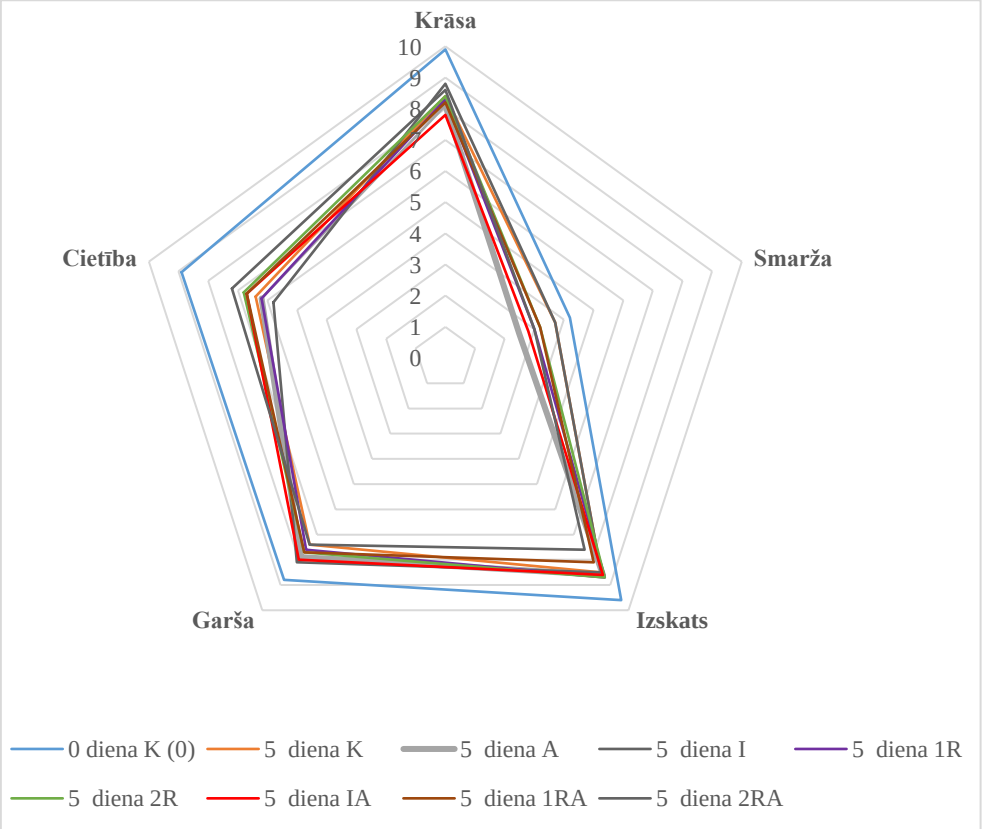
Izvērtējot otrās šķirnes aveņu (S) paraugu Līnijskalas sensorā novērtējuma rezultātus, mēs redzam, ka vislabākais novērtējums ir K(0) paraugam visām īpašībām (7.tabula). Analizējot, aveņu (S) paraugu rezultātus, pēc piecu dienu uzglabāšanas, ar biopolimēriem apstrādātos paraugus un pārējos paraugus, redzams, ka pēc krāsas augstākais novērtējums I (8,8) un 2RA (8,6), bet pēc izskata 1R un 2R (8,7). Vērtētāji kā aromātiskākās pēc smaržas atzinuši I un K (3,7), bet kā garšīgākās I (8,1) paraugu ogas. Savukārt kā stingrākās un cietākās bijušas 2R (6,8) ogas.

7. tabula

Otrā vākuma aveņu sensoro īpašību intensitātes novērtējums

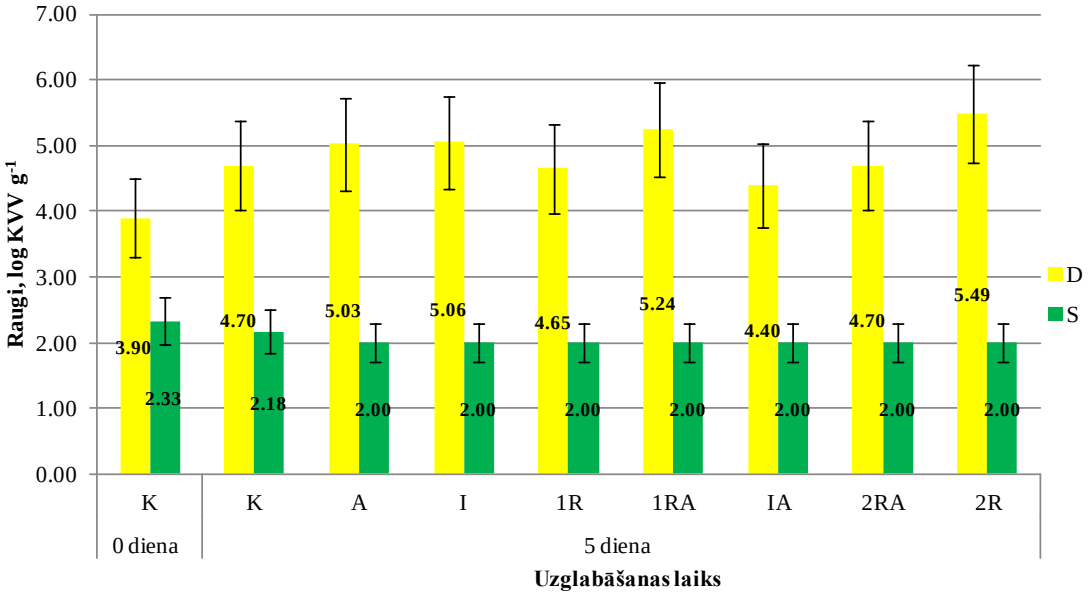
Laiks	Paraugs	Krāsa		Smarža		Izskats		Garša		Cietība	
		Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.
0 diena	K (O)	**9,9**	0,9	**4,2**	0,9	**9,6**	1,0	**8,8**	0,9	**8,9**	1,1
5 diena	1R	8,4	1,1	3,7	1,0	8,5	1,1	7,4	1,1	6,4	1,0
	K	8,1	1,2	2,5	0,8	8,6	1,0	7,9	1,0	6,2	0,8
	A	8,8	1,1	3,7	0,8	8,5	1,0	8,1	0,8	5,8	0,9
	2R	8,3	1,1	3,0	0,9	8,7	1,0	7,6	1,2	6,2	1,0
	2RA	8,4	1,1	3,2	0,6	8,7	1,1	7,7	1,0	6,8	0,9
	I	7,8	1,2	2,8	0,8	8,6	0,9	8,0	0,8	6,7	0,9
	IA	8,2	1,2	3,2	0,5	8,1	1,0	7,7	0,9	6,7	0,9
	1RA	8,6	1,0	3,0	0,6	7,6	1,0	7,4	1,0	7,2	0,9

Pētījuma aveņu S paraugu sensoro īpašību: izskata, krāsas, smaržas, cietības un garšas vērtēšanas rezultāti uzglabāšanas laikā pēc līnijskalas apkopoti 7.attēlā.



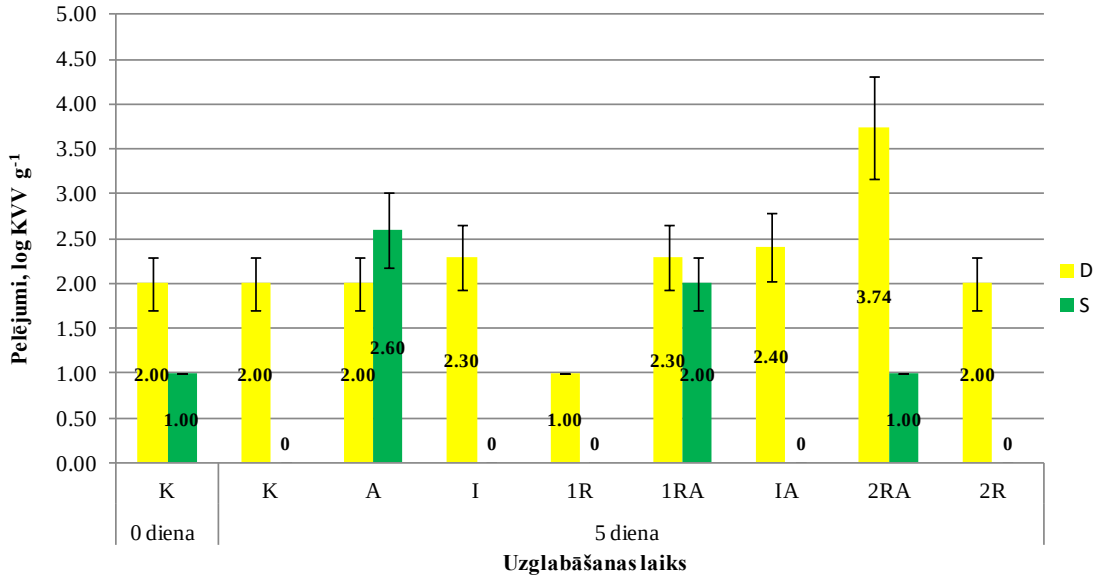
7.att. Aveņu (D) paraugu līnijskalas sensorais novērtējums

Būtiski zemāks raugu kopskaits novērots aveņu paraugiem no saimniecības S (8. att.). Būtiska atšķirība starp paraugu veidiem avenēm netika novērota. Būtiska atšķirība novērota starp paraugu piegādes saimniecībām.



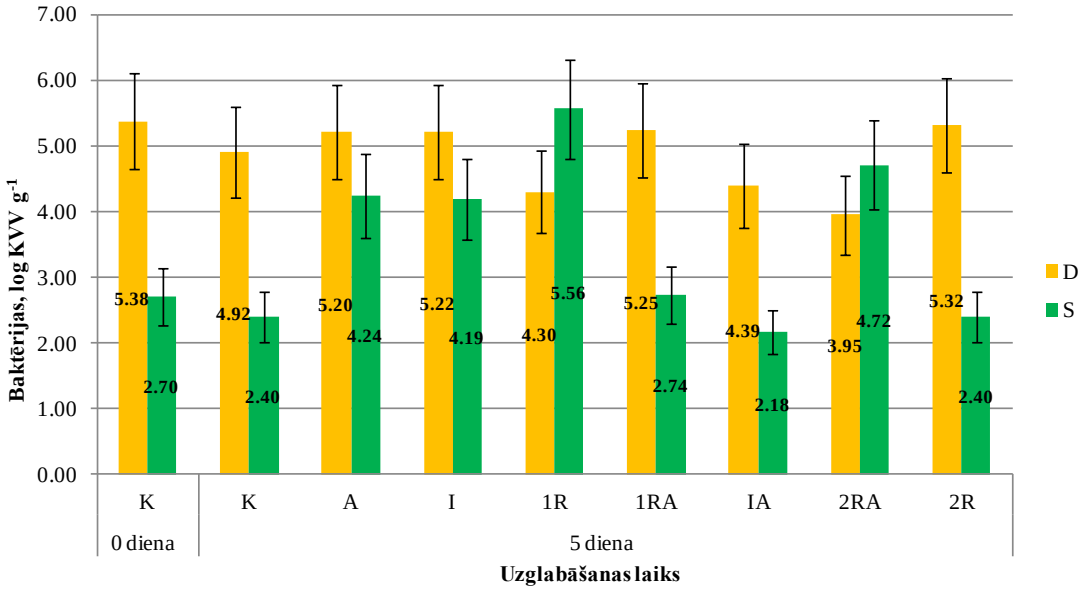
8. att. Raugu kopskaita izmaiņas avenēm uzglabāšanas laikā (2021. pētījuma gada)

Pētījuma sākuma (0 diena) kontroles (K) paraugam konstatētas mikroskopiskas sēnes (9. att.). Savukārt uzglabāšanas laika dažiem paraugiem to skaits samazinājās savukārt citiem pieauga (9. att.). Līdz ar to vēl reiz gribas uzsvērt, ka pētījums jāturpina trešo gadu.



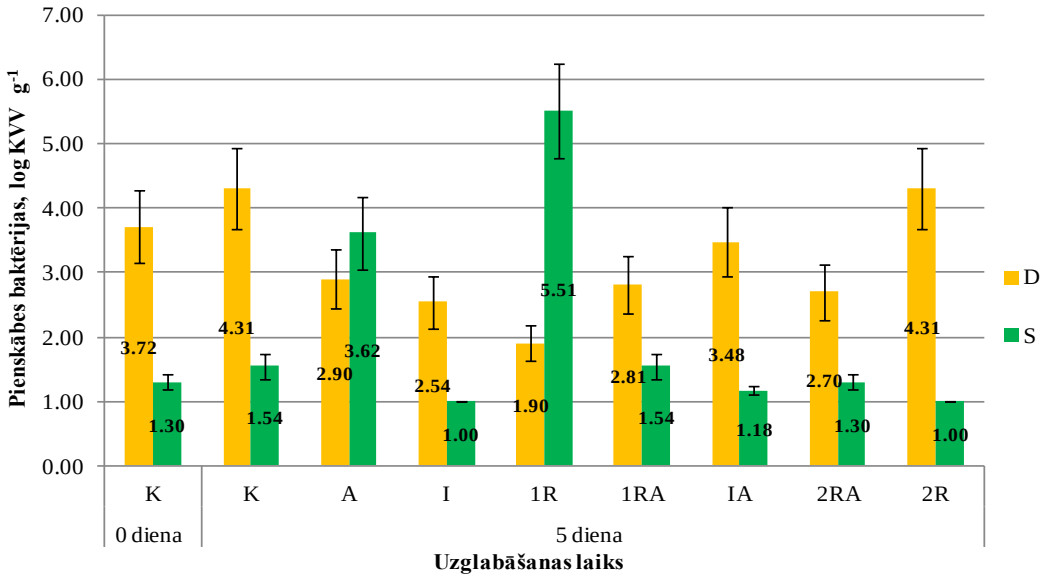
9. att. Pelējuma kopskaita izmaiņas avenēm uzglabāšanas laikā (2021. pētījuma gada)

Iegūti dati baktēriju kopskaitam ir pretrunīgi (10. att.), secinājumu par apstrādes efektivitāti viennozīmīgi nav iespējams veikt, tādēļ pētījums tiks turpināts trešo gadu.



10. att. Baktēriju kopskaita izmaiņas avenēm uzglabāšanas laikā (2021. pētījuma gada)

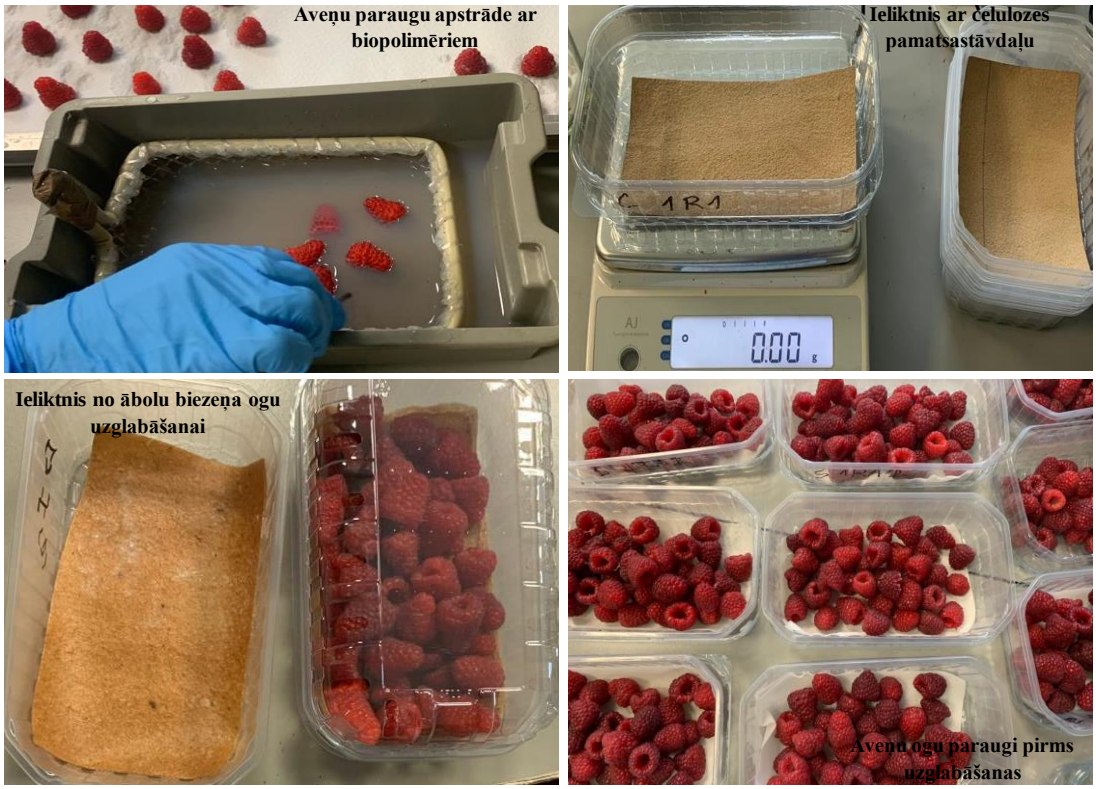
Augsts pienskābes baktēriju radītājs bija konstatēts kontroles paraugam K no saimniecības D (11. att.), uzglabāšanas laika visi apstrādes veidi (izņemot IA, 2R) samazināja pienskābes baktēriju attīstību. Kas var, liecina par apstrādes veida efektivitāti pret noteikto baktēriju sugu. Savukārt paraugam A un 1R saimniecības S pienskābes baktēriju skaits būtiski pieauga, iespējams tas ir saistītas ar sekundāru bojāšanas kas tika radīta paraugu uzglabāšanas laika.



11. att. Pienskābes baktēriju kopskaita izmaiņas avenēm uzglabāšanas laikā (2021. pētījuma gada)

AVENES 2022

Projekta uzdevuma ietvaros 2022. gada 12. septembrī veikts komplekss pētījums (1. att.), aveņu ogu šķirnēm "*Imara*", "*Enrosadira*" no zemnieku saimniecībām Valters Dambe (**D**) un SIA "Skoru Dārzi" (**S**). Ogu kvalitātes saglabāšanai uzglabāšanas laikā izmantojot biopolimēru apstrādi un ieliktņus, kas bija izstrādāti un sagatavoti LU un DI. LU izstrādāts pārklājums un ieliktņi galvenokārt sastāvēja no biocelulozes. DI izstrādātā pārklājuma un ieliktņu receptūras ir atspoguļotas protokolos: „Levāna, dekstrāna pārklājumu izstrāde un izvērtēšana", „Jaunizveidotā iepakošanas kompozītmateriālu prototipa receptūra, pielietojot EPS". Paraugu šifrējums: **K** – kontrole, **A** – apstrāde, **1R** -plēvju pirmā receptūra, **2R** – plēvju otr;a receptūra, **1RA** –plēvju pirmā receptūra apstrādāts, **2RA**– otrā receptūra apstrādāts, **I** – ieliktnis (ābolu) **IA-** ieliktnis(ābolu) apstrādāts, **C**- ieliktnis ar celulozes pamatsastāvdaļu 1 receptūra, **CA**- ieliktnis ar celulozes pamatsastāvdaļu 1 receptūra, apstrāde. Paraugi **C** un **CA** analizēti tikai aveņu ogām no saimniecības "Skoru Dārzi" (**S**).



1. att. Aveņu ogu paraugu kompleksais pētījums

Lai vispusīgi novērtētu biopolimeru pārklājumu apstrādes un ieliktnīšu efektivitāti uz aveņu kvalitāti uzglabāšanas laika pagarināšanai, testēta aveņu kvalitāte, noteikti fizikālie rādītāji (krāsa, cietība, masas zudumi), ķīmiskie (2. att.) un sensorie rādītāji.

2.att. Aveņu paraugu ķīmisko parametru izvērtēšana nosakot kvalitātes izmaiņas uzglabāšanas laikā.

Testēta aveņu ogu virsmas krāsa ar spektrofotometru CM-2500c. Noteiktas krāsu L* a* b* vērtības ogu paraugiem visā pētījuma laikā. Krāsu vērtības CIE L∗a∗b∗ krāsu sistēmā: L* vērtība-intensitāte (0 = melns, 100 = balts); a∗ vērtība (–a∗ = zaļš, +a∗ = sarkans) un b∗ vērtība (–b∗ = zils, +b∗ = dzeltens). Aveņu krāsu L^*, a^* un b^* vērtības komponentu kopējās izmaiņas uzglabāšanas laikā atspoguļo diferenču summa ΔE^*.

Pētījuma laikā testētās ogu virmas krāsu rādītāju vērtības. Tās fiksētas un aprēķināta ΔE* un **krāsas** piesātinātība C*ab, kuru **izmaiņas** apkopotas tabulās. Pirmajā tabulā norādīti aveņu paraugu virsmas krāsu L* a* b* rādītāju testēšanas rezultāti, kas iegūti testējot avenes, kuras ievāktas Dambes saimniecībā. Savukārt otrajā tabulā apkopoti rezultāti pēc aveņu testēšanas, kuras ievāktas saimniecībā "Skoras Dārzi". Pēc apstrādes ar biopolimēriem aveņu virsma kļuva nedaudz tumšāka. Pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā visu aveņu virsmas krāsa kļuvusi tumšāka, sarkanais krāsojums piesātinātāks. Pēc krāsu testa rezultātiem redzams, ka krāsu vērtības L*; a* b* mainās uzglabāšanas laikā. K parauga L* vērtība (gaišais tonis) samazinājās 2,2 %, bet apstrādātajiem A par 4,1%.

1.Tabula

Aveņu (D) virsmas krāsu rādītāju L* a* b* izmaiņas (C ΔE*) uzglabāšanas laikā

Laiks	Paraugi	Krāsu L*a*b*vērtības							
		L*		a*		b*		ΔE*Lab	C* ab
		Vid.	Stdev	Vid.	Stdev	Vid.	Stdev	Vid.	Vid.
0 diena	K	27.7	1.3	22.7	2.8	9.4	2.0		24.6
5 dienas	K	27.1	2.2	20.7	3.2	8.5	1.8	2.3	22.4
	A	26.5	1.1	22.0	3.1	9.3	1.9	1.3	23.9
	1R	26.7	1.9	22.3	3.0	9.5	1.8	1.0	24.2
	2R	26.6	1.8	22.4	2.7	8.6	1.6	1.4	24.0
	1RA	25.7	1.7	20.4	2.4	7.9	1.5	3.5	21.8
	2RA	24.5	1.2	20.6	2.0	8.5	1.0	3.9	22.3
	I	26.0	2.2	22.1	3.2	9.4	1.7	1.8	24.0

	IA	24.1	2.5	19.7	2.5	7.9	1.7	4.9	21.2
7 dienas	KSL	22.5	4.6	17.9	3.7	8.5	1.7	7.1	19.8
	1RSL	23.4	3.0	18.7	2.9	7.3	1.3	6.2	20.1
	2RSL	25.1	2.8	18.4	3.5	7.5	1.9	5.4	19.8
	1RASL	23.1	3.9	17.6	3.8	7.4	1.6	7.1	19.1
	2RASL	25.2	3.9	19.1	3.6	7.1	1.8	5.0	20.4
	ASL	22.8	3.8	17.1	2.5	6.9	1.2	7.8	18.5
	ISL	24.8	3.6	18.0	4.6	7.3	2.4	6.0	19.4
	IASL	21.3	2.2	21.0	1.2	9.7	1.2	6.6	23.1

Pēc piecu dienu uzglabāšanas aveņu paraugu (D) mazākās virsmas krāsu izmaiņas bija 1R paraugam ΔE*(1,0), bet lielākās ar IA (4.9). Savukārt pēc 7 dienu uzglabāšanas mazākās ΔE* izmaiņas 2RASL (5,0), bet vislielākās virsmas krāsu izmaiņas bija (ASL 7.8).

Aveņu (D) virmas vispiesātinātākais krāsojums (C*ab) pēc piecām dienām bija 1R(24,2) paraugam, bet mazāk piesātinātāks – gaišāks IA ((21,2). Pēc septiņām dienām attiecīgi mazākais C*ab paraugam ASL(18,5), bet piesātinātākais IASL(23,1).

Pētījuma laikā "Skoras Dārzi" paraugu (S) **virsmas krāsu izmaiņas** pēc uzglabāšanas dzesētavā apkopotas 2.tabulā. Aveņu virsmas krāsa uzglabāšanas laikā kļuva tumšāka, par to liecina L* vērtības samazināšanās. Pēc piecu dienu uzglabāšanas L* vērtība, salīdzinot ar 0 dienu, samazinājās par 10 % K paraugam, bet paraugiem 1RA par 5%, 2R; 2RA, I un CRA par 8%. Izvērtējot krāsu vērtību-diferenču summas ΔE* rezultātus, paraugiem, kuri glabājās SHELF LIFE temperatūrā, redzams, ka izmaiņas ir atšķirīgas. Vislielākā ΔE* ir K paraugam (4,3), bet būtiski mazāka ir ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem:1RSL 2,6; 1RSLA 3,3; 1ISL 3,7.

2. tabula.

Aveņu (S) virsmas krāsu rādītāju L* a* b* izmaiņas (C ΔE*) uzglabāšanas laikā

Laiks	Paraugi	Krāsu L* a* b* vērtības							
		L*		a*		b*		ΔE*Lab	C* ab
		Vid.	Stdev	Vid.	Stdev	Vid.	Stdev	Vid.	Vid.
0 diena	K	24.0	1.2	13.0	2.5	4.7	1.1		13.8
5 dienas	K	21.5	2.6	14.6	2.9	6.1	1.2	3.3	15.8
	A	21.1	2.1	13.6	2.0	5.0	0.6	3.0	14.5
	1R	21.8	1.8	13.8	2.4	5.0	0.7	2.4	14.7
	2R	22.1	2.7	13.4	2.6	4.9	1.0	1.9	14.3
	1RA	22.9	1.2	14.9	2.5	5.5	0.9	2.4	15.9
	2RA	22.1	3.3	13.9	2.9	5.2	1.2	2.2	14.8
	I	22.1	2.4	14.7	2.7	5.5	5.5	2.7	15.7
	IA	20.8	2.8	14.5	2.8	5.3	1.0	3.6	15.5
	CR	20.9	2.5	13.3	1.9	5.1	0.7	3.2	14.3
	CRA	22.1	1.7	14.1	2.0	5.6	0.8	2.4	15.1
7 dienas	KSL	20.3	2.4	15.1	1.8	5.4	0.7	4.3	16.0
	1RSL	21.5	1.4	13.9	1.8	4.8	0.8	2.6	14.7

	2RSL	21.0	2.7	15.0	2.7	6.2	1.2	3.9	16.2
	1RASL	21.0	2.7	14.4	2.5	5.1	0.8	3.3	15.2
	2RASL	21.4	1.3	15.6	2.4	5.9	1.0	3.9	16.7
	A SL	21.0	1.4	15.3	0.7	6.6	1.7	4.2	16.6
	ISL	21.4	0.9	15.4	2.2	5.6	0.8	3.7	16.4
	IASL	21.5	1.8	16.2	2.2	5.7	1.0	4.2	17.2
	C.SRSL	21.5	2.4	13.8	2.0	7.6	1.0	3.9	15.7
	C.SRASL	20.8	1.5	15.3	2.5	5.4	1.0	4.0	16.2

Pēc piecu dienu SHELF LIFE uzglabāšanas aveņu (S) virmas vispiesātinātākais krāsojums (C*ab) bija 1RA (15,9), bet mazāk piesātinātākais krāsojums 2R un CR (14,3), bet pēc septiņām dienām attiecīgi lielākais C*ab ISL(17,2) un mazākais C*ab 1RSL (14,7).

Pētījuma laikā, pēc piecām un septiņām uzglabāšanas dienām, fiksēti D un S aveņu paraugu **masas zudumi**. Masas zudumu izmaiņas procentos (%) paraugos apkopotas 3.tabulā.

3.tabula

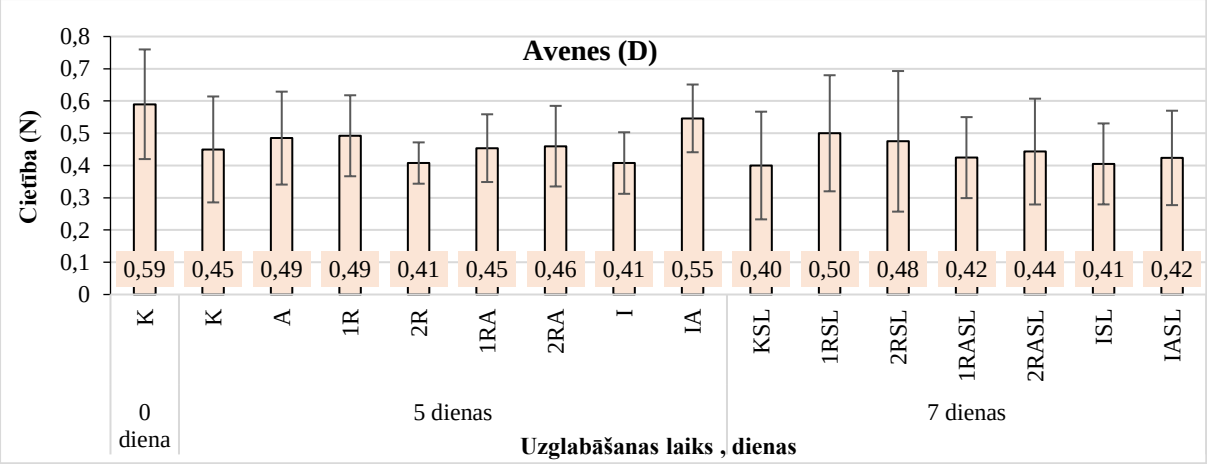
Masas zudumi procentos

Paraugi	Avenes (S)		Avenes (D)	
	5 dienas	7 dienas	5 dienas	7 dienas
K	1.9	4.7	2.5	4.8
A	4.0	5.1	2.9	5.3
1R	2.2	4.2	2.0	4.0
2R	2.4	4.0	2.0	4.3
1RA	2.5	5.6	2.2	5.1
2RA	3.0	5.3	2.4	5.0
,I	2.2	4.3	2.0	4.3
IA	2.3	6.4	2.4	4.6
CR	2.5	5.1	-	-
CRA	4.5	5.3	-	-

Lielākie ogu masas zudumi pēc piecu dienu uzglabāšanas S aveņu paraugiem, kas apstrādāti ar biopolimēriem: A (4,0%) un CRA (4,5%), bet mazākie K paraugam (1,9%). Pēc SHELF LIFE septiņu dienu uzglabāšanas lielākie masas zudumi bija avenēm pēc apstrādes A (5,3%), bet mazākie paraugam 1R (4,0%).

Izvērtējot aveņu (D) paraugus, redzams, ka mazākie masas zudumi pēc piecu dienu uzglabāšanas bijuši pēc biopolimēru apstrādes 2,0% paraugiem:1R, 2R un I bet lielākie zudumi paraugam A (2.9%). Savukārt pēc septiņu dienu uzglabāšanas mazākie zudumi 1R 4,0 %, bet lielākie zudumi 1RA 5,1%.

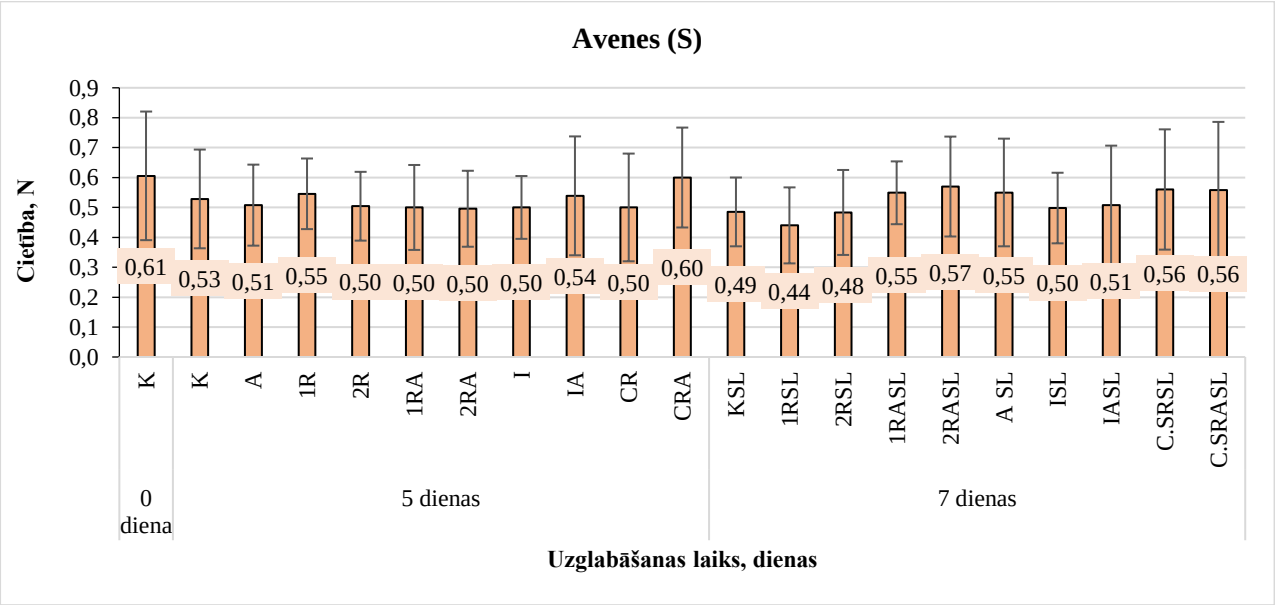
Aveņu **cietības izmaiņas** nebija būtiskas, tomēr ir vērojama cietības palielināšanās tendence pēc septiņu dienu uzglabāšanas, kas norāda par biopolimēriem apstrādes efektivitāti (3. att.).



3.att. Aveņu (D) cietības izmaiņas pētījuma laikā.

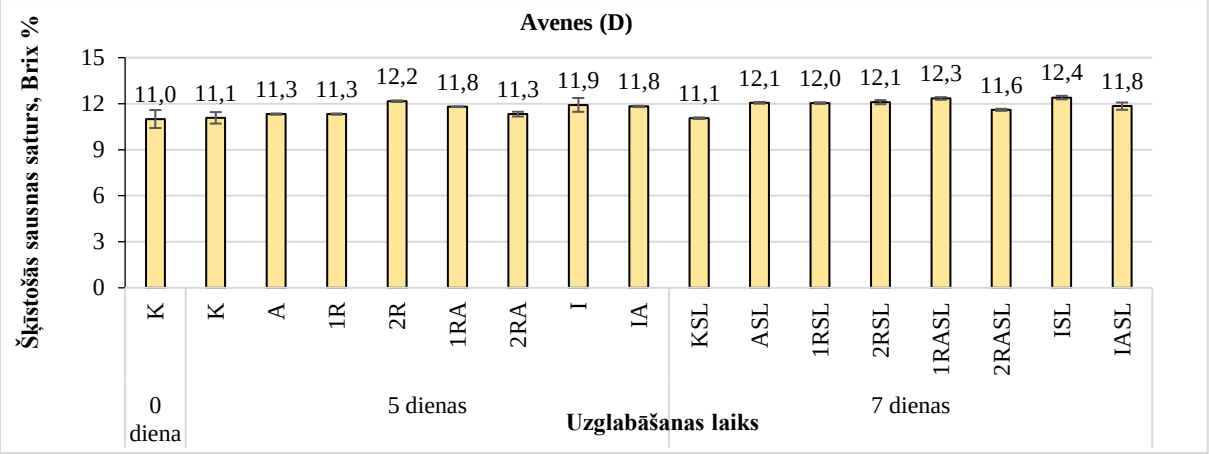
Cietība pēc piecu dienu uzglabāšanas samazinājās visiem paraugiem. Pēc apstrādes ar biopolimēriem no 7,4% (IA) līdz 30,9% (2R). Savukārt pēc septiņu dienu uzglabāšanas K paraugam cietība samazinājās par 32,2%, bet ar ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem tā samazinājās mazāk no 15,3% (1RSL) līdz 28,2% (IASL).

Aveņu (S) paraugu **cietības testēšanas rezultāti un izmaiņas** redzamas 4. attēlā. Aveņu (S) paraugiem uzglabāšanas laikā (pēc piecām dienām) cietība samazinājās. Lielākais samazinājums novērots pēc biopolimēru apstrādes paraugiem: 2RA(18,2%) un 1RA, CR un I (17,4%). Minimāls cietības samazinājums bija paraugiem K (16%), I (13%), 1R (9%) un IA (7%). Savukārt paraugiem 1RA un 2RA ***vērojama tendence uz ogu cietības palielināšanos.***



4.att. Aveņu (S) cietības izmaiņas pētījuma laikā

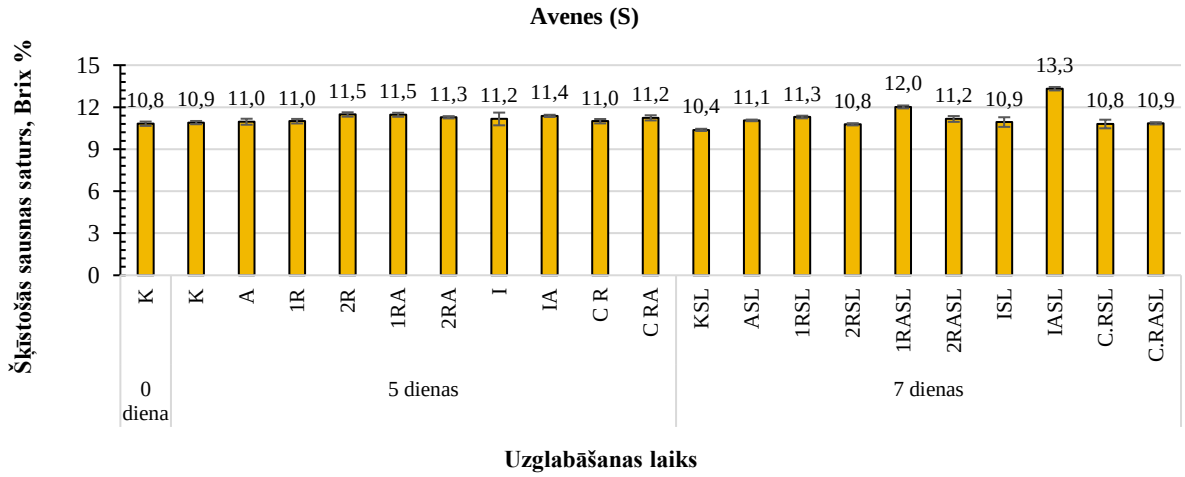
Šķīstošās sausnes saturs pētījuma laikā nedaudz paaugstinājās (D) aveņu paraugos. Aveņu (D) paraugos, pēc piecām uzglabāšanas dienām dzesētavā, šķīstošās sausnas saturs palielinājās par 2% K paraugā, un pēc apstrādes ar biopolimēriem no 3 līdz 11% (5.attēls).



5. att. Šķīstošās sausnas satura izmaiņas aveņu (D) paraugos.

Aveņu (D) ogu paraugiem pēc septiņām uzglabāšanas dienām, kas uzglabāti SHELF LIFE apstākļos, šķīstošās sausnes saturs, palielinājās paraugos pēc apstrādes ar biopolimeriem līdz 13%. Šķīstošās sausnas saturs starp paraugiem nebija būtiski atšķirīgs, bet uzglabāšanas laikā tas nedaudz palielinājās, kas varētu būt skaidrojams ar biopolimēru apstrādi. Biopolimēru apstrādes ķīmiskais sastāvs varēja izraisīt šķīstošās sausnas satura paaugstināšanos.

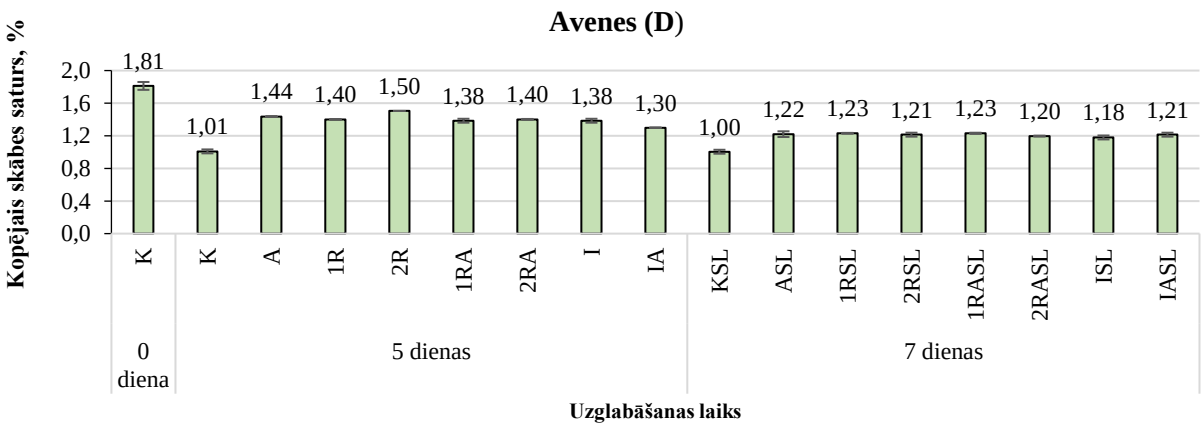
Aveņu (S) paraugos **šķīstošas sausnas satura izmaiņas** pētījuma laikā redzamas 6. attēlā. Pēc piecām uzglabāšanas dienām sausna nedaudz paaugstinājās visos paraugos. K paraugā līdz 1%, bet pēc apstrādes no 2 līdz 6%.



6. att. Šķīstošās sausnas satura izmaiņas avenu (S) paraugos pētījuma laikā.

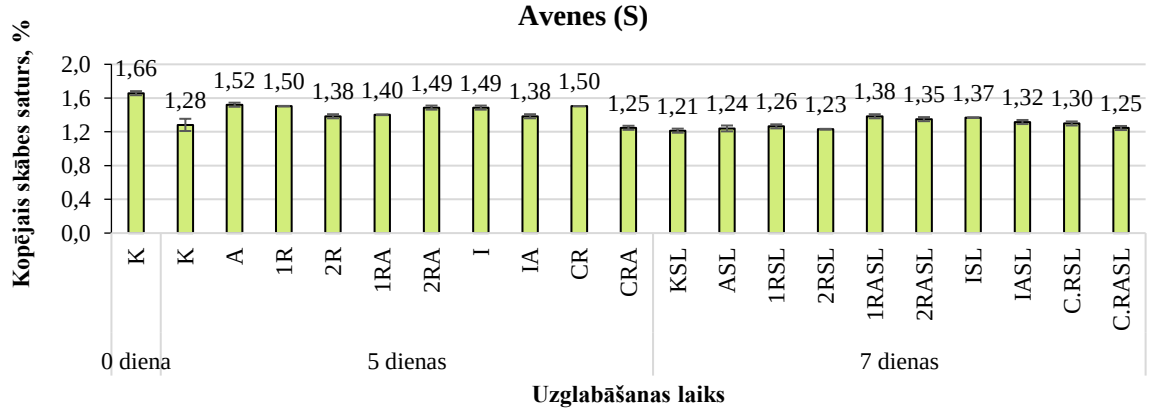
Pēc septiņām uzglabāšanas dienām K paraugos šķīstošās sausnas saturs samazinājās līdz 4%, bet pārējos tas palika nemainīgs (2RSL, CRSL, C.RASL) vai paaugstināts (ASL, IASL,1RSL,1RASL, 2RASL).

Aveņu (D) paraugu **kopējās skābes satura** testēšanas rezultāti apkopoti 7. attēlā. Pēc piecu dienu uzglabāšanas kopējās skābes saturs aveņu (D) K paraugā bija samazinājies attiecīgi par 44 %, bet pēc apstrādes ar biopolimēriem ievērojami mazāk no 17% (2R) līdz 28% (IA). Savukārt pēc septiņu dienu uzglabāšanas skābes saturs samazinājās K paraugā par 45%, bet pārējos paraugos no 32% līdz 35%. Izvērtējot pirmā vākuma ar biopolimēriem apstrādātos ogu paraugus, vērojama *apstrādes ietekmes efektivitāte* pēc piecu dienu uzglabāšanas, bet SHELF LIFE periodā nedaudz, jo avenes pēc septiņām dienām tomēr pārgatavojās un šajā procesā sākās arī organisko skābju noārdīšanās.



7. att. Kopējais skābes satura izmaiņas pētījuma laikā.

Aveņu (S) paraugu **kopējās skābes satura** testēšanas rezultāti apkopoti 8. attēlā. Pēc piecu dienu uzglabāšanas kopējās skābes saturs aveņu (S) kontroles paraugam bija samazinājies attiecīgi par 23%, bet ievērojami mazāk pēc apstrādes ar biopolimēriem attiecīgi no 8% (A) līdz 17% (IA).



8. att. Kopējais skābes satura izmaiņas pētījuma laikā.

Pēc septiņu dienu uzglabāšanas kopējais skābes saturs turpināja samazināties visos paraugos. Tomēr mazāks kopējais skābes sazinājums bija vērojams pēc apstrādes ar biopolimēriem (K 27% un no 17% 1RASL līdz 25% CRASL). Abu vākumu (S) un (D) aveņu paraugos kopējais skābes satura samazinājums ir mazāks pēc biopolimēru apstrādēm.

Antocianīnu satura izmaiņas aveņu (D) paraugiem pētījuma laikā apkopotas 4. tabulā. Antocianīnu saturs uzglabāšanas laikā aveņu K paraugā palielinājās (vidēji par 54 %), salīdzinot ar kontroli 0 dienā. Izvērtējot ar biopolimēriem apstrādātajos paraugus, secinām, ka pēc apstrādāto paraugu piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā, antocianīnu saturs paraugos palielinājās līdzīgi (no 43% IA līdz 68% 1RA vidēji par 53 %). Izvērtējot paraugus, kuri uzglabājās Shelf Life, redzams, ka antocianīnu saturs tajos palielinājās vairāk. Paraugā K 72%, bet apstrādātajos no 61% (ASL) līdz 76% (IASL).

Pētījuma laikā **kopējā fenolu satura** palielinājuma izmaiņas pēc 5 dienu uzglabāšanas dzesētavā K paraugos (3.2%) līdzīgas ar biopolimēriem apstrādāto paraugu fenolu satura izmaiņām, kas ir nedaudz augstākas (vidēji 3.6%) (4.tabula).

4. tabula.

Kopējā antocianīnu un fenolu satura izmaiņas uzglabāšanas laikā (D) avenēs

Datums	Paraugs	*Kopējais antocianīnu saturs, mg 100 g^{-1}		Izmaiņas	*Kopējais fenolu saturs, mg 100 g^{-1}		Izmaiņas
		Vid.	Stdev	%	Vid.	Stdev	%
0 diena	K	19.9	0.5		129.4	3.5	
5 dienas	K	30.6	0.7	54.2	133.6	5.3	3.2
	A	31.6	2.3	58.9	130.2	0.7	0.6
	1R	28.8	0.9	45.3	132.1	2.5	2.0
	2R	29.8	3.2	49.9	132.9	6.9	2.6
	1RA	33.3	1.4	67.7	136.0	9.1	5.1
	2RA	31.7	0.5	59.4	135.0	1.0	4.3
	I	29.4	0.6	48.3	135.5	2.3	4.6
	IA	28.3	0.5	42.5	137.3	1.2	6.1
7 dienas	KSL	34.0	2.1	71.5	130.6	1.0	0.9
	ASL	32.0	3.0	61.2	137.1	8.3	5.9
	1RSL	33.0	3.5	66.1	139.3	5.3	7.6
	2RSL	34.7	3.2	74.6	143.6	8.1	10.9
	1RASL	34.3	2.1	72.7	136.1	3.3	5.1
	2RASL	33.8	2.0	70.1	136.1	8.3	5.1
	ISL	35.2	0.7	77.2	139.8	1.1	8.0
	IASL	34.9	1.4	75.9	141.7	6.5	9.4

*Kopējais antocianīnu saturs izteikts cianidīn 3glikozīda ekv. mg100 g^{-1}

*Kopējais fenolu saturs, izteikts ar galluskābes ekv. mg 100 g^{-1}

Izvērtējot aveņu paraugus, kuri uzglabājās Shelf Life, redzams, ka kopējais fenolu saturs ar biopolimēriem apstrādātajos paraugos palielinājās vairāk (līdz 11%), salīdzinot ar K (vidēji 1%). **Kopējais fenolu satura** palielinājums (vidēji 7,4%) pēc apstrādes varētu būt saistīts ar antocianīnu satura paaugstināšanos uzglabāšanas laikā.

Aveņu (S) paraugu antocianīnu un kopējā fenolu satura apkopotie rezultāti, kas iegūti pētījuma laikā redzami 5.tabulā.

5. tabula

Kopējā antocianīnu un fenolu satura izmaiņas uzglabāšanas laikā (S) avenēs

Datums	Paraugs	*Kopējais antocianīnu saturs, mg 100 g^{-1}		Izmaiņas	*Kopējais fenolu saturs, mg 100 g^{-1}		Izmaiņas
		Vid.	Stdev	%	Vid.	Stdev	%

0 diena	K	37.2	3.3		172.3	9.7	
5 dienas	K	55.2	3.1	48.1	180.2	0.9	4.6
	A	51.5	1.6	38.4	173.8	1.3	0.8
	I	50.8	2.3	36.3	174.9	5.1	1.5
	1R	52.1	0.7	40.0	183.8	3.8	6.7
	1RA	53.0	10.7	42.3	177.2	4.6	2.9
	IA	54.0	5.9	44.9	177.7	0.8	3.1
	2R	54.2	1.0	45.4	174.2	7.1	1.1
	2RA	55.6	1.0	49.4	176.5	6.2	2.4
	C R	45.2	4.9	21.4	172.3	3.8	0.0
	C RA	43.6	2.5	17.2	173.1	1.4	0.5
7 dienas	KSL	64.7	3.4	73.8	186.4	4.8	8.2
	ASL	63.2	2.5	69.8	180.5	0.4	4.7
	1RSL	64.7	0.2	73.6	176.6	5.0	2.5
	2RSL	65.3	3.3	75.4	180.9	2.3	5.0
	1RASL	64.6	2.9	73.5	174.8	4.6	1.4
	2RASL	65.0	3.0	74.4	186.6	4.5	8.3
	ISL	65.5	3.8	75.7	188.6	1.8	9.4
	IASL	62.5	4.0	67.8	181.7	3.9	5.4
	C.RSL	65.9	6.9	76.8	177.3	7.4	2.9
	C.RASL	65.2	0.4	75.1	189.0	3.8	9.7

Antocianīnu saturs aveņu K paraugā pēc piecām dienām palielinājās līdz 48%, salīdzinot ar pētījuma pirmo dienu (0), bet ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem antocianīnu saturs palielinājās būtiski mazāk vidēji par 37%. Lielākais palielinājums bija pēc apstrādes ar biopolimēriem 2R (49%) un mazākais CRA (17 %).Izvērtējot antocianīnu saturu pēc ShelfLife uzglabāšanas (septiņām dienām), apstrādājos paraugos K un apstrādātajos paraugos tas bija līdzīgs (vidēji 65 mg 100 g^{-1}).

Pēc piecu dienu uzglabāšanas kopējais fenolu saturs būtiski neatšķīrās starp K un ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem (K 180,2 un apstrādātie paraugi vid. 176,4 mg 100 g^{-1}). Kopējais fenolu saturs arī pēc Shelf Life uzglabāšanas laika būtiski neatšķīrās starp analizētajiem paraugiem (tas bija vidēji 182 mg 100 g^{-1}).

Sensorā vērtēšana.

Aveņu (S) sensorā vērtēšanas rezultāti pēc līnijskalas apkopoti 6.tabulā. K(0) ir pirmā avenes ir degustētas pētījuma uzsākšanas dienā, K un pārējie aveņu paraugi ir testēti pētījuma piektajā dienā.

6. tabula

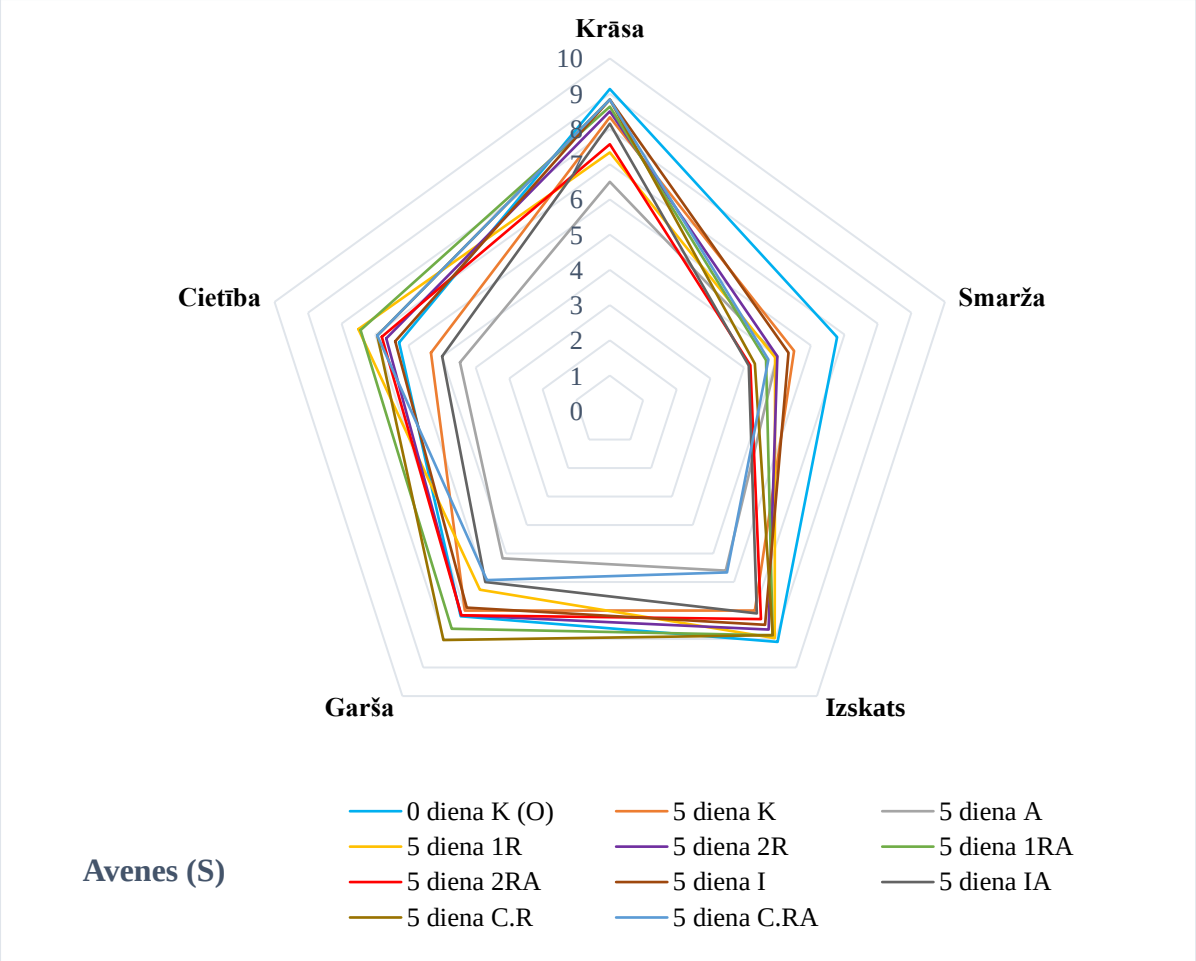
Aveņu (S) sensoro īpašību intensitātes novērtējums

Laiks	Paraugs	Krāsa		Smarža		Izskats		Garša		Cietība	
		Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.
0 diena	K (O)	9.1	0.4	6.8	0.6	8.1	0.8	7.2	0.6	6.3	0.6
5 diena	K	8.3	0.8	5.5	0.6	7.0	0.8	7.0	0.8	5.3	0.7

	A	6.5	0.6	5.0	0.3	5.6	0.7	5.2	0.7	4.5	0.6
	1R	7.3	0.8	4.9	0.3	8.0	0.7	6.3	0.6	7.5	0.8
	2R	8.5	1.0	5.0	0.5	7.7	0.9	7.2	0.8	6.7	0.8
	1RA	8.6	0.8	4.7	0.6	7.9	0.7	7.6	0.8	7.4	0.9
	2RA	7.6	0.7	4.2	0.2	7.3	0.5	7.2	0.4	6.8	0.6
	I	8.8	0.9	5.3	0.4	7.5	0.8	6.9	0.8	6.4	0.6
	IA	8.2	0.7	4.2	0.2	7.1	0.9	6.0	0.0	5.0	0.5
	C.R	8.8	0.7	4.3	0.4	7.9	1.0	8.0	0.7	6.9	0.7
	C.RA	8.8	0.8	4.7	0.6	5.7	1.0	5.9	0.8	6.9	0.9

Pēc sensorās vērtēšanas rezultātiem secināms, ka vērtētājiem pēc **krāsas**, pēc piecu dienu aveņu (S) uzglabāšanas, vislabāk patikuši paraugi I, C.R un C.RA (8.8), kā nākošie bija paraugi 1RA (8,6) un 2R (8,5, kas bija novērtēti nedaudz mazāk. Pēc **izskata** augstāk novērtēti paraugi 1R (8,0) un 1Ra (7,9), bet vismazāk paticis paraugs C.RA (5,7). Pēc **garšas** vērtētājiem vislabāk paticis paraugs pēc CR novērtēts (8,0), bet mazāk patikuši paraugi pēc apstrādes A (5,2) un C.RA (5,9). Pēc smaržas - aromātiskākās un cietākās ir bijušas K (0)ogas (vērtējums attiecīgi 6,8 un 8,1) , bet pēc piecām uzglabāšanas dienām aromāts samazinājies vērtējums (5,5) un cietība arī ogām ievērojami samazinājusies K (5,3) . Pēc piecām uzglabāšanas dienām vērtētājiem šķita , ka ar biopolimēriem apstrādātās ogas ir cietākas, attiecīgi tām vērtējums ir augstāks 1R 7,5 un 1RA (7,4).

Aveņu (S) paraugu sensoro īpašību: izskata, krāsas, smaržas, cietības un garšas vērtēšanas rezultāti pēc līnijskalas apkopoti 9. attēlā.



9. Aveņu (S) paraugu līnijskalas sensorais novērtējums.

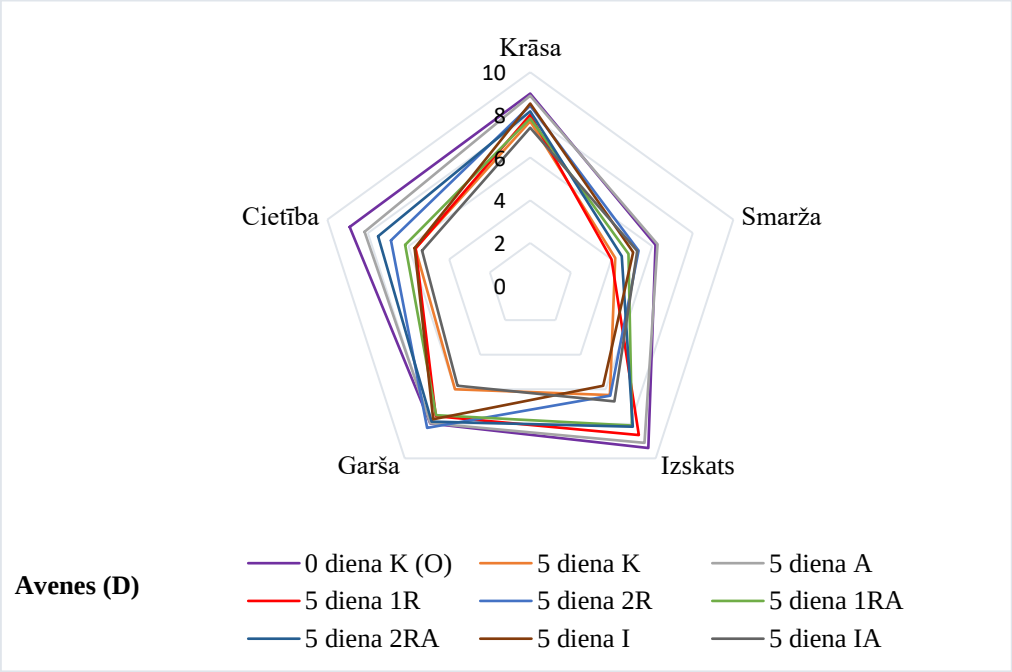
Izvērtējot otrās šķirnes aveņu (D) paraugu Līnijskalas sensorā novērtējuma rezultātus, redzams, ka visaugstākais novērtējums visām īpašībām ir K(0) paraugam (7.tabula).

7. tabula

Aveņu (D) sensoro īpašību intensitātes novērtējums

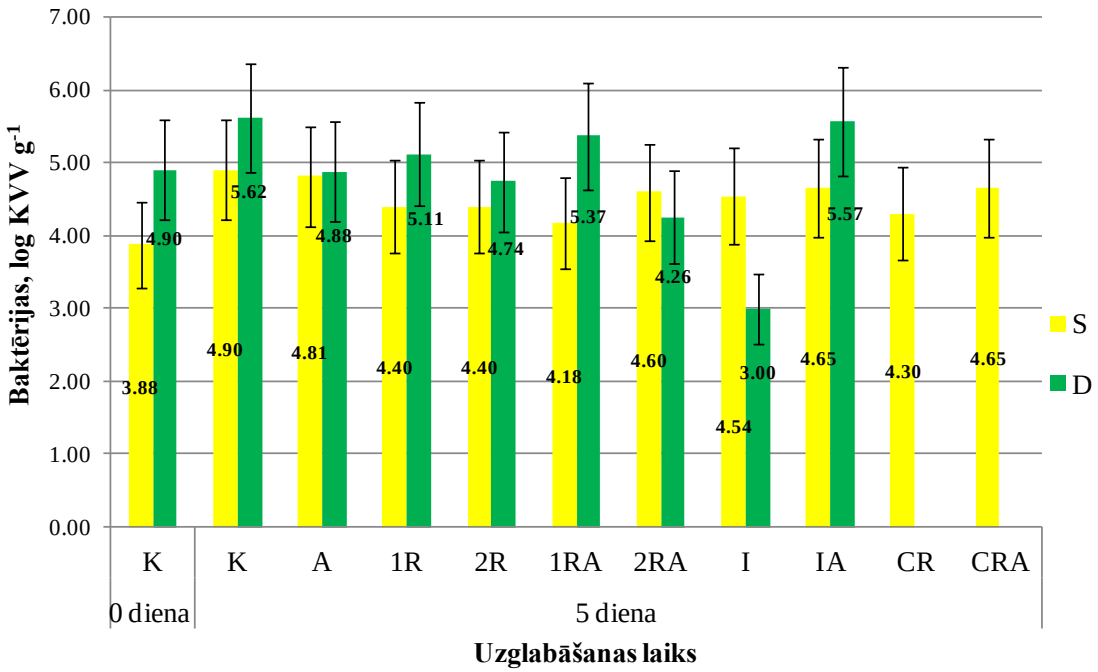
Laiks	Paraugs	Krāsa		Smarža		Izskats		Garša		Cietība	
		Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.
0 diena	K (O)	9.0	0.8	6.2	0.5	9.4	0.8	8.0	0.9	8.9	0.8
5 diena	K	7.7	0.9	4.2	0.7	6.3	0.9	6.0	0.9	5.7	0.8
	A	9.3	0.3	6.3	0.6	9.1	0.6	8.0	0.4	8.2	0.3
	1R	8.0	0.8	4.0	0.0	8.7	0.7	7.6	0.5	5.7	0.9
	2R	8.4	0.8	5.3	0.7	6.4	0.9	8.2	0.6	6.9	0.7
	1RA	7.8	0.8	4.8	0.5	8.1	0.7	7.5	0.7	6.2	0.7
	2RA	8.2	0.9	4.5	0.5	8.2	0.7	7.9	0.4	7.5	0.5
	I	8.5	0.7	5.1	0.5	5.8	0.8	7.7	0.6	5.7	0.5
	IA	7.4	0.5	5.3	0.4	6.7	0.6	5.8	0.6	5.3	0.5

Analizējot, sensoro īpašību vērtējumu rezultātus pēc piecu dienu uzglabāšanas ir secināms, ka augstākais novērtējums visām sensorajām īpašībām ir A paraugam. Zemāko novērtējums ogu krāsai ir saņēmis IA paraugs (7,4), bet pēc izskata I (5,8). Vērtētājiem kā nearomātiskākās pēc smaržas ogas 1R (4,0), bet kā negaršīgākās (5,8) un mīkstākās (5,5) bijušas IA paraugu ogas. Pētījuma aveņu (D) paraugu sensoro īpašību: izskata, krāsas, smaržas, cietības un garšas vērtēšanas rezultāti uzglabāšanas laikā pēc līnijskalas apkopoti 10. attēlā.



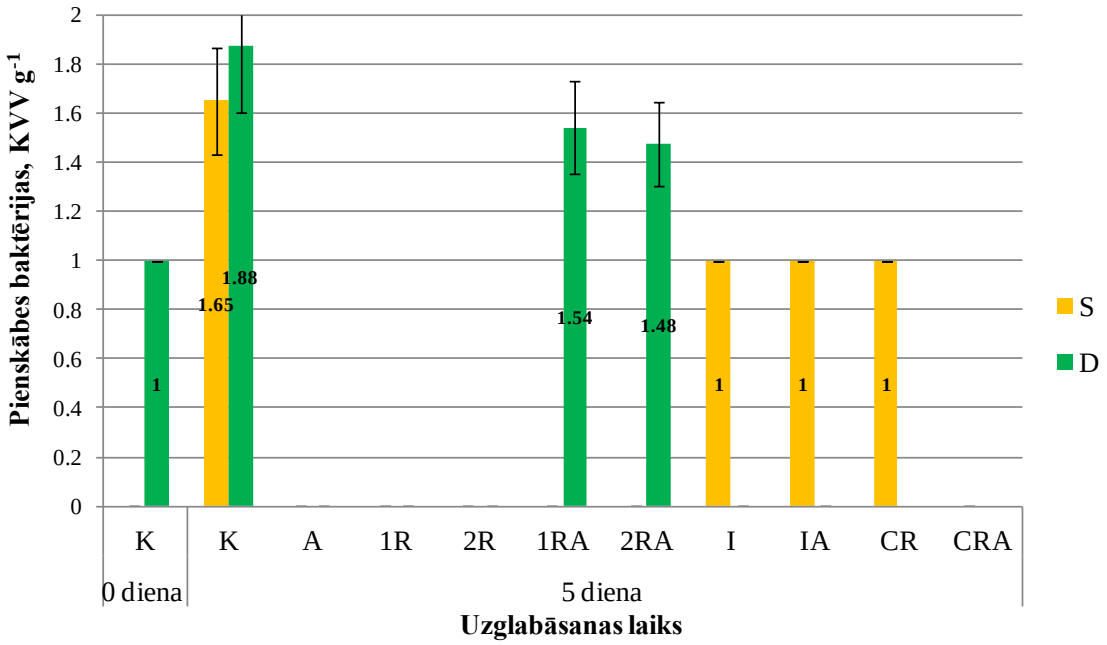
10. Att. Aveņu (D) paraugu līnijskalas sensorais novērtējums.

Vērtējot mikrobioloģiskos radītājus aveņu ogu uzglabāšanas laikā, konstatēts, ka analizētie paraugi bija maz piesārņoti, izņēmums bija piesārņojums ar baktēriju kopskaitu. Analizējot baktēriju kopskaita izmaiņas uzglabāšanas laikā (11. att.) konstatēts, ka salīdzinoši ar 0 pētījuma dienu baktēriju kopskaits pieauga. Izņēmums bija paraugs I no saimniecības D. Savukārt, ja vērtē baktēriju kopskaita izmaiņas 5. uzglabāšanas dienās ar kontroles variantu redzams, ka apstrāde un/vai uzglabāšana biopolimēru plēvēs samazināja baktēriju attīstību.



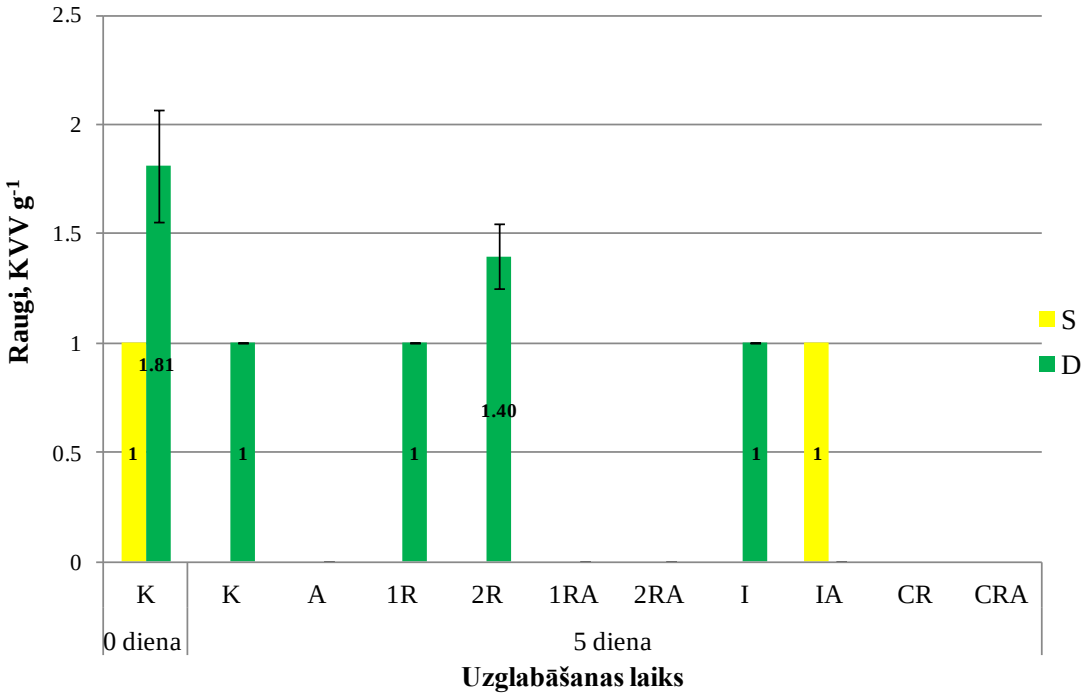
11. att. Baktēriju kopskaita izmaiņas avenēm uzglabāšanas laikā (2022. pētījuma gadā)

Produkta bojāšanās bieži vien asociējās, ar produkta netipiskās mikrofloras veidošanos, tā var būt pienskābes baktērijas attīstība. Izvērtējot (12. att.) pienskābes baktēriju kopskaita izmaiņas uzglabāšanas laikā konstatēts, ka 0 diena mikroorganismi bija konstatēti saimniecībā D, kas var liecināt, ka kāda oga no parauga bija pārgatavojusies. Savukārt ogām no saimniecības S mikroorganismi netika konstatēti. Pieļaujams, ka paraugiem pirms uzglabāšanas, saimniecība S nebija konstatēta pienskābes baktēriju klātbūtne, jo tie atradās anabiozes stāvoklī (organisma stāvoklis, kurā līdz minimumam palēninās vielmaiņa un izbeidzas dzīvības izpausmes, un spēja atkal atjaunot dzīvības procesus). Bet pēc piecu dienu uzglabāšanas mainoties ķīmiskajam sastāvam kontroles variantiem pienskābes baktēriju kopskaits pieauga un bija vis augstākais. Tas liecina, ka kontroles varianta ogu paraugi sāka ātrāk bojāties. Kā var redzēt apstrāde un/vai uzglabāšana biopolimēru plēvēs samazināja pienskābes baktēriju kopskaita pieaugumu pat tādiem paraugiem kā 1RA, 2RA (saimniecība D), un I, IA, CR (saimniecība S). Jo iepriekš minētiem paraugiem mikroorganismu attīstība bija zemāka salīdzinoši ar kontroles variantu.



12.att. Pienskābes baktēriju kopskaita izmaiņas avenēm uzglabāšanas laikā (2022. pētījuma gadā)

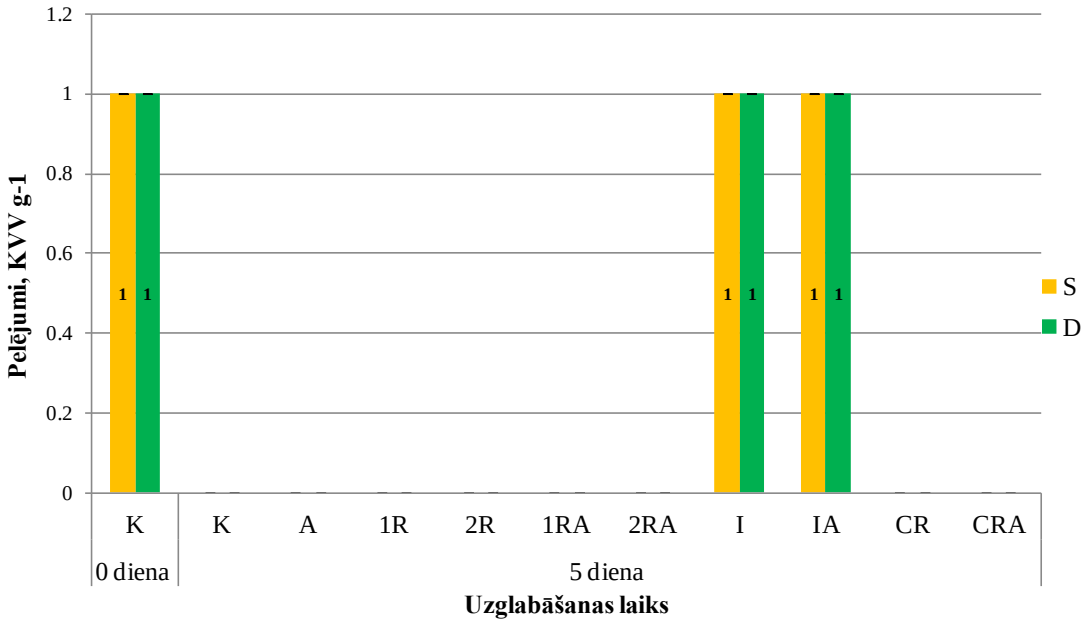
Izvērtējot raugu kopskaitu aveņu ogu paraugos redzams, ka pirms uzglabāšanas raugu klātbūtne tika konstatēta abos analizējamos paraugos (13. att.). Pēc uzglabāšanas raugu kopskaits samazinājās vai netika konstatēts visiem paraugiem. Ne vienam no paraugiem netika konstatēts raugu kopskaita pieaugums, kas var liecināt par nelabvēlīgiem apstākļiem raugu attīstībai ogu uzglabāšanas laikā.



13.att. Raugu kopskaita izmaiņas avenēm uzglabāšanas laikā (2022. pētījuma gadā)

Analizējot aveņu ogu, iegūtos datus redzams, ka pelējuma mikroskopisko sēņu kopskaits nebūtisks konstatēts pirms ogu uzglabāšanas (14. att.). Pēc piecu dienu uzglabāšanas vairākos paraugos pelējumu kopskaits netika konstatēts. Savukārt

paraugiem I un IA, bija identisks kā kontroles variantā pirms uzglabāšanas. Kas var liecināt, ka iepriekš minētie apstrādes veidi nesamazina mikroskopisko sēņu (pelējuma) kopskaita samazināšanu.



14.att. Mikroskopisko sēņu (pelējuma) kopskaita izmaiņas avenēm uzglabāšanas laikā (2022. pētījuma gadā)

Kopsavilkums/Secinājumi

Biopolimēru apstrāde nedaudz ietekmē ogu fizikālos un ķīmiskos kvalitātes rādītājus uzglabāšanas laikā, bet būtiski neizmaina sensorās īpašības. Pēc apstrādes ar biopolimēriem aveņu virsmas ogu krāsa kļuva nedaudz tumšāka. Pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā ogu virsmas sarkanais krāsojums piesātinātāks, kas arī bija saistīts ar antocianīnu satura palielināšanos uzglabāšanas laikā.

Pēc septiņu dienu ogu uzglabāšanas mazāki masas zudumi bija avenēm pēc apstrādes 4-4,3%, bet K paraugam 4,7-4,8%.Tātad biopolimēru pārklājums samazināja ogu mitruma zudumus (ogu izžūšanu).

Aveņu ogām vērojama cietības palielināšanās tendence pēc septiņu dienu uzglabāšanas, kas norāda par biopolimēriem apstrādes pozitīvo efektivitāti. Paraugiem pēc apstrādes: 1RA un 2RA pēc septiņu dienu uzglabāšanas novērota tendence uz ogu cietības palielināšanos.

Šķīstošās sausnes saturs pētījuma laikā ogās nedaudz paaugstinājās, kas varētu būt saistīts ar biopolimēru pārklājuma sastāvu-pienesumu ogām. Biopolimēru apstrādes ķīmisko sastāvu, kas varēja izraisīt šķīstošās sausnas satura paaugstināšanos.

Kopējās skābes saturs pētījuma laikā samazinājās mazāk apstrādātajiem ogu paraugiem (17% 2R līdz 28% IA un K 44 %) vērojama apstrādes ietekmes efektivitāte. Biopolimēru apstrāde mazināja antocianīnu sastāva izmaiņas (K paraugā pēc piecām dienām antocianīnu saturs palielinājās līdz 48%, bet ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem vidēji par 37%).

Sensorās vērtēšanas rezultāti liecina par to, ka vērtētajiem nav iebildumi pret biopolimēru apstrādi, jo pēc garšas šie paraugi ir novērtēti līdzvērtīgi vai pat augstāk.

Ogu apstrāde un vai uzglabāšana biopolimāru plēve/ pārklājuma būtiski samazināja raugu, mikroskopisko sēņu un pienskābes baktēriju attīstību. Kā arī nedaudz palēninājа baktēriju attīstību. Izvērtējot trīs gadu ogu uzglabāšanas iegūtos datus secināts, ka izmantojot apstrādi un /vai uzglabāšanas biopolimēru plēve/ pārklājuma, ogu (zemenes, avenes) derīguma termiņš ir septiņas dienas dzesētavā, +4 ±1 °C, gaisa relatīvais mitrums 75±2 %.

ZEMEŅU KVALITĀTES RAKSTUROJOŠO PARAMETRU IZVĒRTĒJUMS (2020)

T-Uzglabāšanas telpas temperatūra (+23±1 º C, RH 50±2%, t=24 st.)

D-Uzglabāšanas dzesētavā temperatūra (+4 ±1 º C, RH 75±2%, t=72st.)

1-Vākšanas reize

2-Vākšanas reize

3-Vākšanas reize

K-kontrole

L1-1% levāna šķīdums

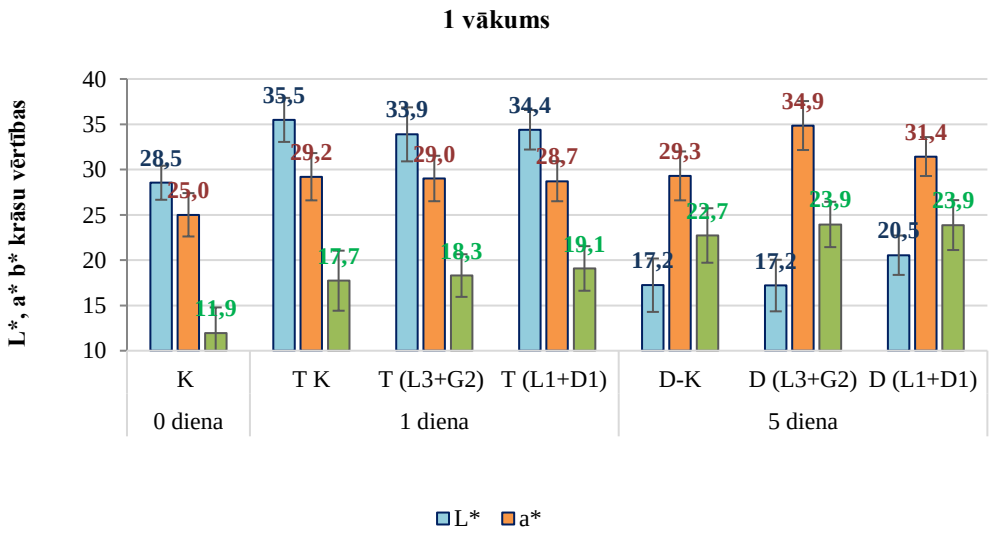
L3-3% levāna šķīdums

G2-2% glicerīna šķīdums

D1-1% dekstrāna šķīdums

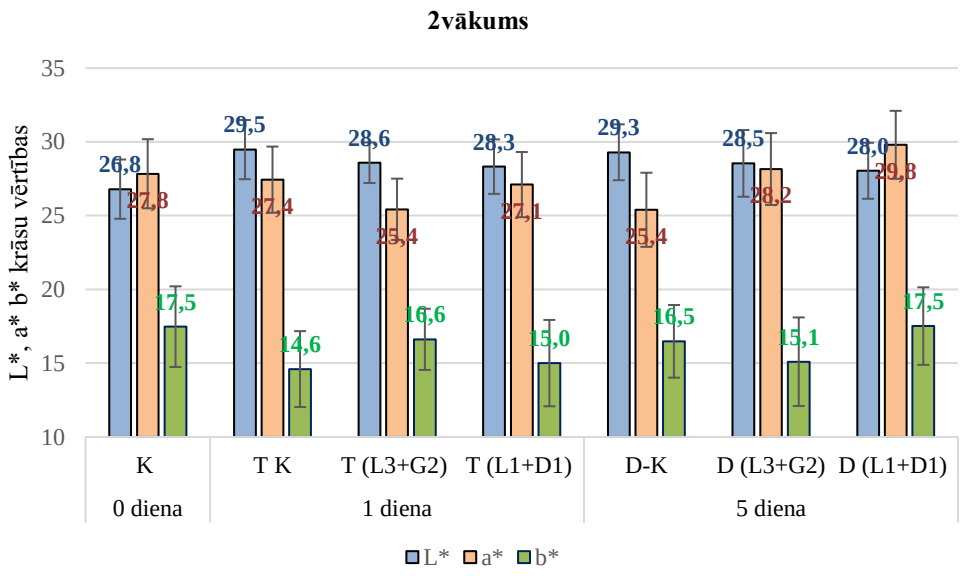
Lai pārbaudītu un vispusīgi raksturotu biopolimēru pārklājumu efektivitāti uz ogu kvalitāti uzglabāšanas laikā, tika noteikta zemeņu paraugu virsmas krāsa paraugiem telpā un dzesētavā. Krāsu vērtības CIE L∗a∗b∗ krāsu sistēmā: L* vērtība- intensitāte (0 = melns, 100 = balts); a∗ vērtība (–a∗ = zaļš, +a∗ = sarkans) un b∗ vērtība (–b∗ = zils, +b∗ = dzeltens).

Pirmā vākuma zemeņu kontroles paraugiem otrā dienā bija novērotas virsmas krāsojuma izmaiņas, pēc vienas dienas uzglābšanas telpā (1.att.). Krāsu a* vērtība kontroles paraugiem palielinājusies par 14,4%, bet ar biopolimēriem apstrādātajiem zemeņu paraugiem a* vērtība palielinājās nedaudz mazāk, attiecīgi T (L1+D1)12,9% un T(L3+G2) 13,8%. Savukārt zemeņu virsmas sarkanais krāsojums palika intensīvāks-sarkanās krāsas – a*vērtības palielināšanās bija novērota pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā + 4°C temperatūrā paraugiem, kuri bija apstrādāti ar biopolimēriem (attiecīgi D (L1+D1)20,5% un D(L3+G2) 28,3%.



1. att. Zemeņu virsmas krāsas izmaiņas

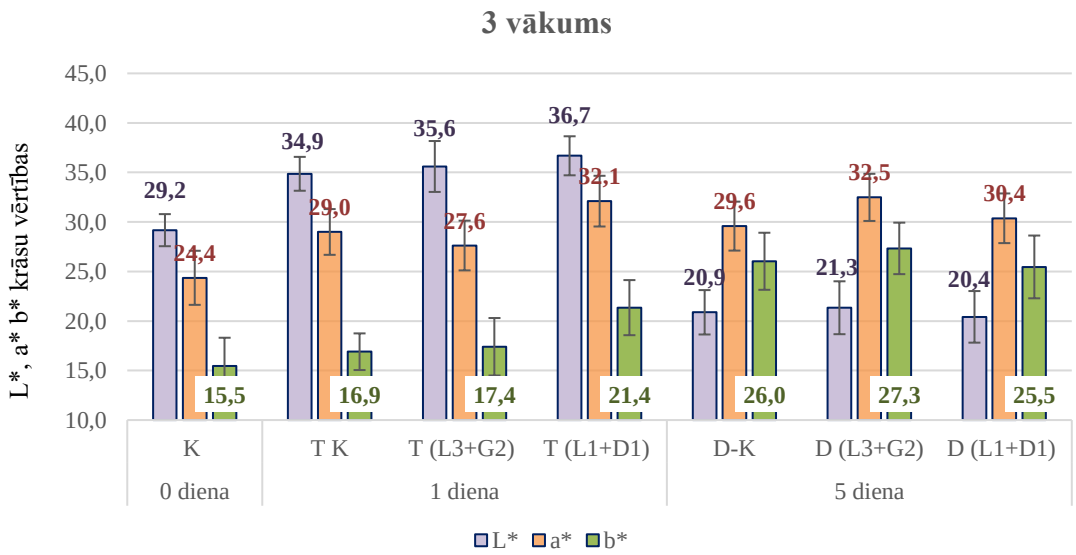
Otrā vākuma kontroles paraugiem zemeņu virsmas krāsas a*vērtības – sarkanā krāsojuma intensitātes būtiskas izmaiņas uzglabāšanas laikā nebija konstatētas (2.att.).



2. att. Zemeņu virsmas krāsu izmaiņas

a* vērtība-virsmas krāsojums būtiski neatšķīrās starp analizētajiem zemeņu paraugiem: Kontroles un ar biolopimēriem apstrādātajiem. Analizējot datus novērots, ka dzesētavā ar biopolimēriem apstrādātajiem, uzglabātajiem paraugiem piektā dienā a*vērtībai ir tendence paaugstināties (attiecīgi D K a* 25,4 bet a* D (L3+G2)28,2; D (L1+D1) a*29,8).

Savukārt trešā vākuma zemeņu paraugiem, kuri bija apstrādāti ar biopolimēriem, uzglabāšanas laikā konstatētas būtiskas krāsas atšķirības (3.att.). Kontroles paraugu zemeņu virsmas krāsas a*vērtība pēc vienas dienas uzglabāšanas telpā palielinājās par 24,1%, toties ar biopolimēriem ievērojami mazāk attiecīgi: T (L1+D1)11.8 % un T(L3+G2) 16,0%. Toties pēc divu dienu uzglabāšanas dzesētavā a* vērtība palielinājās attiecīgi: kontroles paraugam 17.6%, bet apstrādātajiem paraugiem: D (L1+D1)19.8% un D(L3+G2) 25,0%.



3. att. Zemeņu virsmas krāsu izmaiņas

Zemeņu virsmas krāsu L*, a* un b* vērtības komponentu kopējās izmaiņas uzglabāšanas laikā atspoguļo diferenču summa Δ E*(1.tabula). Izvērtējot krāsu komponentu izmaiņas, novērojām, ka pēc vienas dienas uzglabāšanas telpā mazākā Δ

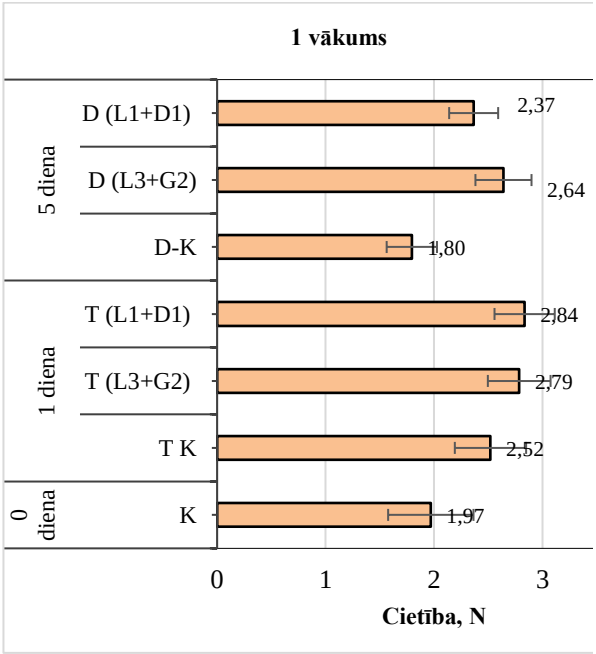
E* (3, 7) bija otrā vākuma ar biopolimēriem apstrādātajiem zemeņu paraugiem. Izvērtējot rezultātus pēc uzglabāšanas dzesētavā, konstatējam, ka mazākās krāsu izmaiņas Δ E* bija ar biopolimēriem apstrādātājām zemenēm pirmā vākuma D (L1+D1) 15,57, otrā vākuma D (L3+G2) 4,5. Savukārt starp trešā vākuma ar biopolimēriem apstrādātajiem zemeņu paraugiem un K nebija būtiskas atšķirības .

1.tabula

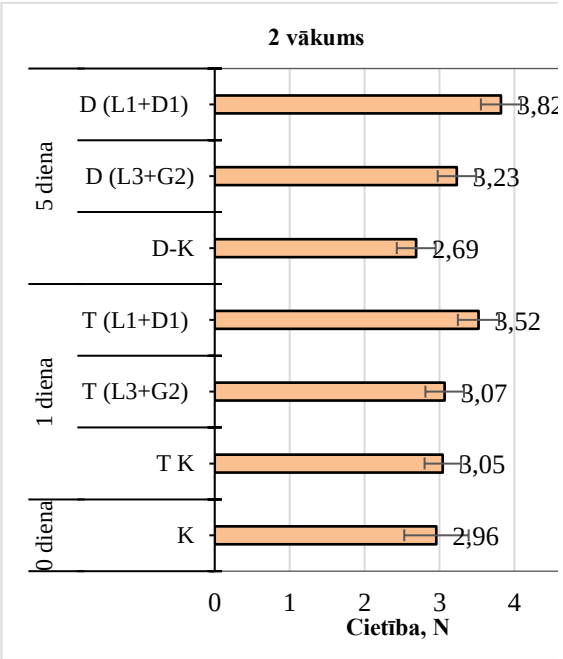
Zemeņu virsmas krāsu L*, a* un b* izmaiņas uzglabāšanas laikā

Paraugi	Δ E*		
	1vākums	2vākums	3vākums
T K	10,0	3,7	9,0
T (L3+G2)	9,2	4,7	9,3
T (L1+D1)	9,9	3,7	14,3
D-K	16,2	4,6	16,7
D (L3+G2)	19,2	4,5	18,6
D (L1+D1)	15,7	7,4	16,7

Cietība visu vākuma kontroles paraugiem, kuri, uzglabāti dzesētavā, nedaudz samazinājās, bet, uzglabājot telpā, palielinājās (4A;4B. att. un 5 att.). Savukārt ar biopolimēriem apstrādātajiem zemeņu paraugiem cietība paaugstinājās, uzglabājot telpā, pirmā vākuma paraugiem cietība paaugstinājās par 9.5 % T (L1+D1), 11,1 % T (L3+G2), otrā vākuma paraugiem no 0.8 % T (L1+D1), 13.5% T (L3+G2), bet trešā vākuma zemenēm ievērojami mazāk (attiecīgi par 0.5 % T (L1+D1) un 1.7 % T (L3+G2)).



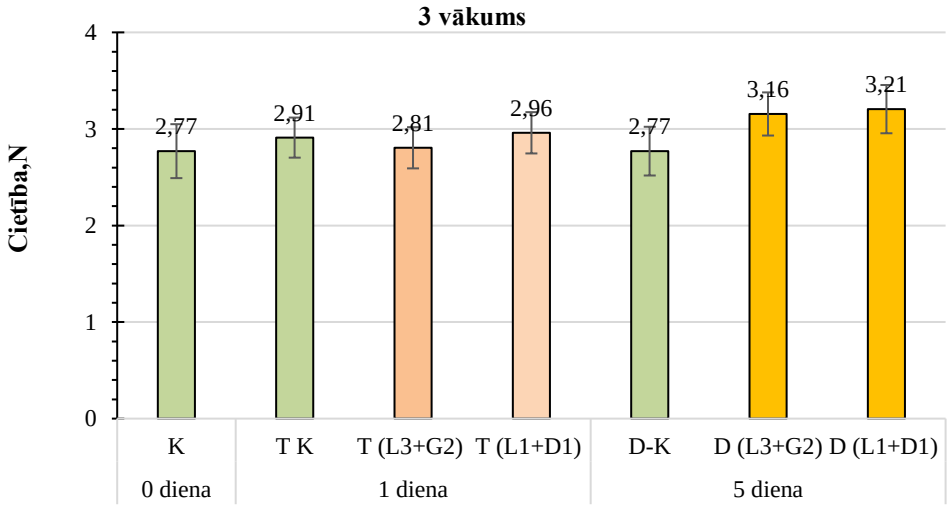
4.A att.



4.B. att.

4A;4B att. Cietības izmaiņas uzglabāšanas laikā (1 un 2 vākums)

Kopumā, izvērtējot cietības testēšanas rezultātus, vērojama biopolimēru apstrādes efektivitāte visu vākumu zemenēm. Dzesētavā ar biopolimēriem apstrādātajiem zemeņu paraugiem uzglabāšanas laikā cietība palielinājās, salīdzinot ar kontroles paraugu pirmā vākuma zemenēm no 31.8-47.1%, otrā vākuma zemenēm 20.2 -42.1%, bet trešā vākuma zemenēm no 13.9-15.7% (5.att.).



5.att. Cietības izmaiņas uzglabāšanas laikā (3 vākums)

Pēc uzglabāšanas telpā un dzesētavā kontroles paraugiem (zemenēm) šķīstošās sausnas saturam (Brix%) bija tendence palielināties, bet pēc apstrādes ar biopolimēriem tas būtiski palielinājās, kas skaidrojams ar biopolimēru ķīmisko sastāvu (3.tabula).

3. Tabula

Šķīstošās sausnas saturs (Brix%) uzglabāšanas laikā

Uzglabāšanas laiks		1 vākums		2 vākums		3 vākums	
	Paraugi	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV
0 diena	K	13.5	0.2	14.5	0.3	12.3	0.0
1 diena	T-K	13.5	0.1	14.5	0.2	12.0	0.2
	T-(L1+D1)	14.8	0.5	17.1	0.0	16.1	0.1
	T-(L3+G2)	15.5	0.1	15.2	0.2	13.0	0.6
5 diena	D-K	16.4	0.7	14.2	0.1	14.6	0.0
	D(L1+D1)	17.7	0.8	14.5	0.1	15.4	0.1
	D(L3+G2)	16.8	0.0	14.2	0.6	15.2	0.1

Kopējais skābes saturs visu vākumu zemeņu kontroles un ar biopolimēriem apstrādātajos paraugos uzglabāšanas laikā būtiski nemainījās (4.tabula).

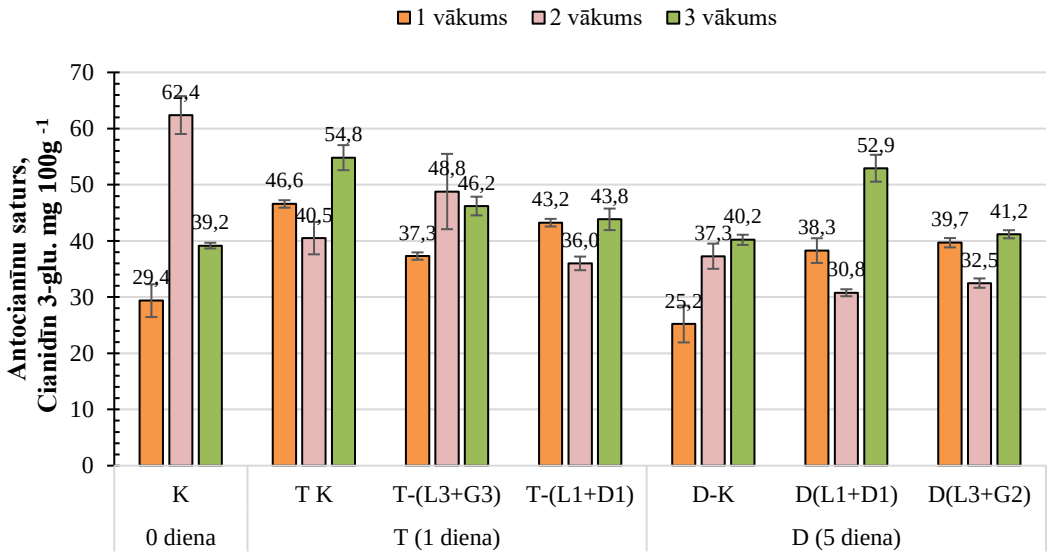
4.tabula

Kopējais skābes saturs uzglabāšanas laikā

		1 vākums		2 vākums		3 vākums	
		VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV
0 diena	K	1.43	0.03	1.47	0.00	1.44	0.05
1 diena	T-K	1.54	0.09	1.61	0.00	1.44	0.05
	T-(L3+G3)	1.54	0.00	1.54	0.09	1.62	0.21
	T-(L1+D1)	1.44	0.05	1.57	0.05	1.54	0.00
5 diena	D-K	1.47	0.00	1.44	0.05	1.47	0.00
	D(L1+D1)	1.71	0.05	1.41	0.00	1.34	0.00
	D(L3+G2)	1.64	0.05	1.98	0.00	1.34	0.00

Kopējais skābes saturs nebija atšķirīgs no apstrādes, bet nedaudz palielinājās atsevišķiem paraugiem, tas varētu būt saistīts ar mitruma zudumu-svara izmaiņām, gan arī ar ogu gatavības pakāpi.

Antocianīnu satura izmaiņas zemeņu paraugos bija atkarīgas no uzglabāšanas un apstrādes veida (6.att.). Uzglabājot kontroles paraugus telpā, pirmā un trešā vākuma zemenēs antocianīnu saturs būtiski palielinājās salīdzinājumā ar pētījuma sākuma dienu (0 dienu, attiecīgi par 37% un 28.6 %).Savukārt otrā vākuma zemenēm antocianīnu saturs minimāli palielinājās telpā par 0.74%, bet dzesētavā samazinājās gan K, gan ar biopolimēriem (attiecīgi par K 7,8% un D(L1+D1) 30,6 % ;D (L3+G2) 23,7%).

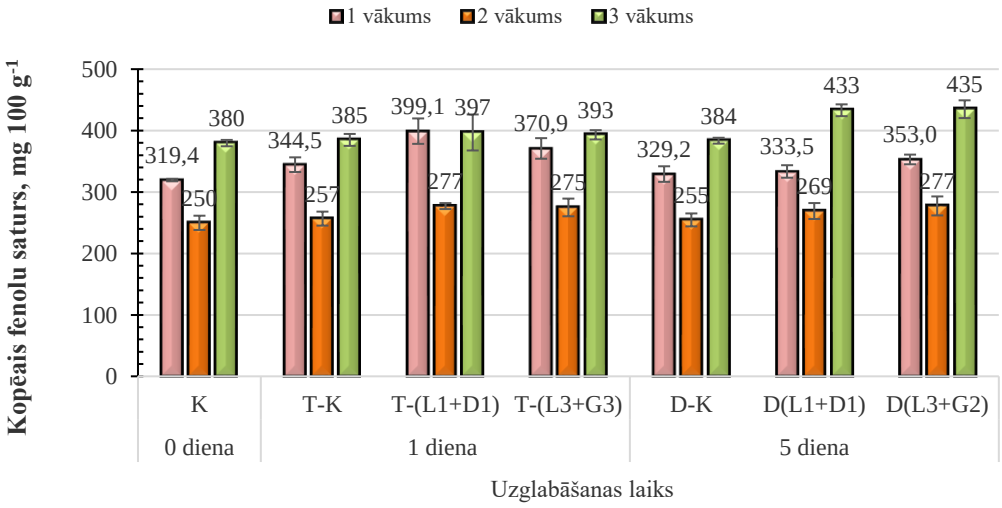


6.att. Antocianīnu satura izmaiņas pirmā, otrā un trešā vākuma zemenēm

*Kopējais antocianīnu saturs izteikts cianidīn 3glikozīda ekv, mg100 g^{-1}

Antocianīnu saturs ar pirmā un trešā vākuma ar biopomēriem apstrādātajos zemeņu paraugos pēc uzglabāšanas telpās palielinājās, salīdzinot ar kontroles paraugiem mazāk, attiecīgi:1vāk. T (L1+D1)-29,8% un T (L3+G2) 17,0%, bet 3vāk. T(L1+D1)-11,9% un T(L3+G2) 18,0%. Izvērtējot antocianīnu saturu starp zemeņu vākumiem, paraugos, kuri uzglabājās dzesētavā, redzams, ka tas ir nedaudz augstāks trešajam vākumam, gan kontroles gan ar biopolimēriem apstrādātajos paraugos.

Pētījuma laikā kopējais fenolu saturs, visu vākumu analizētajos zemeņu paraugos uzglabāšanas laikā paaugstinājās (7.att.). Kopējais fenolu saturs paaugstinājās pirmā vākuma zemeņu paraugiem pēc vienas dienas uzglabāšanas telpā (attiecīgi T (L3+G2) par 16,1% un T (L1+D1) 24,9%), bet pēc uzglabāšanas dzesētavā mazāk (attiecīgi (D (L1+D1) 4,4% un D (L3+G2) 10,5%). Savukārt trešā vākuma ar biopolimēriem apstrādātajos zemeņu paraugos, kopējais fenolu saturs, pēc vienas dienas uzglabāšanas telpā palielinājās mazāk (attiecīgi T (L3+G2) par 3,6 % un T (L1+D1) 4,6 %), bet pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā vairāk (attiecīgi D (L1+D1)14,1% un D (L3+G2)14,5%). Kopējo fenolu satura izmaiņas zemeņu uzglabāšanas laikā ir saistītas ar antocianīnu satura izmaiņām-palielināšanos. Zemenēs dažādi bioloģiski procesi turpinās arī pēc ogu novākšanas, kuri arī izraisa ogu uzturvērtības un kvalitātes izmaiņas uzglabāšanas laikā.



4. att. Kopējā fenolu satura izmaiņas pirmā, otrā un trešā vākuma zemenēm

*Kopējais fenolu saturs, izteikts ar galluskābes ekv, mg 100 g^{-1}

Pētījuma laikā, analizējot visu vākumu zemeņu kontroles, un ar biopolimēriem apstrādātos zemeņu paraugus, konstatēts, ka trešā vākuma paraugi būtiski atšķiras no abiem vākumiem. Kopējo fenolu satura izmaiņas trešā vākuma paraugiem pētījuma laikā ir līdzīgas – nenozīmīgas. Kopējais fenolu saturs bija lielāks ar biopolimēriem apstrādātajos zemeņu paraugos salīdzinājumā ar kontroles paraugiem, tas skaidrojams ar pašu biopolimēru ķīmisko sastāvu.

Pēc vienas dienas uzglabāšanas mitruma saturs zemenēs samazinājās līdz ar to masa arī samazinājās. Zemeņu masa pēc vienas dienas uzglabāšanas telpā paraugiem samazinājās vidēji 1,8% (4.tabula).

4.tabula

Mitruma samazinājums zemeņu paraugos

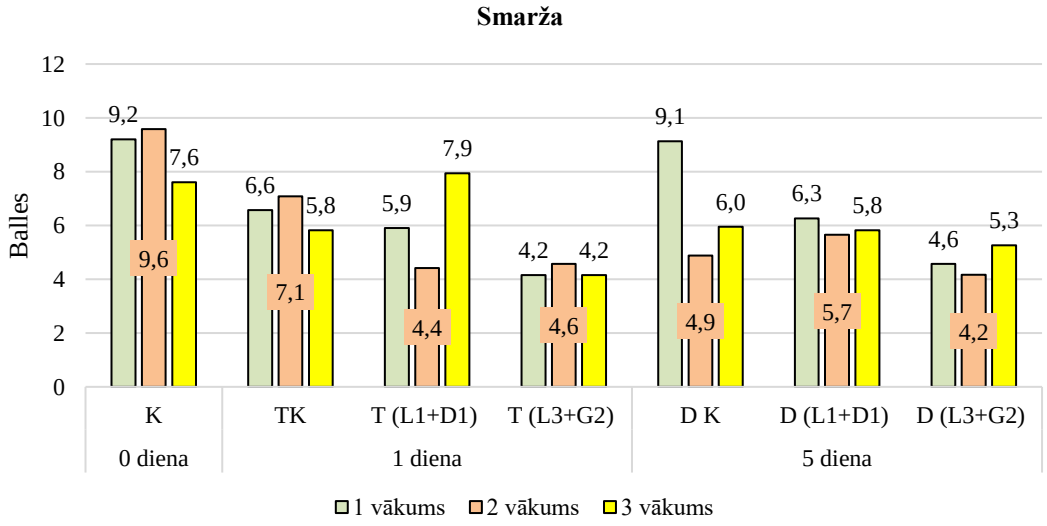
Uzglabāšanas laiks	Paraugi	1 vākums	2 vākums	3 vākums
1 diena	TK	1.9	1.17	1.74

	T(L1+D1)	1.6	1.37	1.95
	T(L3+G2)	1.9	1.36	1.99
2 diena	TK	2.6	2.72	2.92
	T(L1+D1)	3.5	3.25	3.57
	T(L3+G2)	3.4	3.06	3.25
5 diena	D-K	2.1	1.87	1.83
	D(L1+D1)	2.0	2.02	2.31
	D(L3+G2)	2.1	1.96	2.37

Pirmā vākuma kontroles zemeņu paraugiem pēc vienas dienas uzglabāšanas masas zudumi bija līdzīgi (1,9%), salīdzinot ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem (D (L1+D1) 1,6 un D (L3+G2) 1.9%, bet pēc piecu dienu uzglabāšanas trešā vākuma zemenēm tie bija lielāki (D (L1+D1)-2,31% un D(L3+G2) 2,37%). Lielākie zudumi uzglabāšanas laikā bija ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem, kuri uzglabājās telpā. Pirmā un trešā vākuma paraugiem masas zudumi bija attiecīgi pirmajam T (L1+D1)-3,5% un T (L3+G2) 3.4%), bet trešajam T (L1+D1)-3,6 % un T (L3+G2) 3.3%). Kontroles paraugiem pēc zemeņu uzglabāšanas telpā ogu masa otrā un trešā vākuma zemenēm samazinājās mazāk (2 vākuma 1,17% un 3 vākuma 1,74%) salīdzinājumā ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem (biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem.

Zemeņu paraugiem pētījuma laikā veikta sensorā vērtēšana pēc Līnijskalas. Pēc iegūtajiem rezultātiem, redzams, ka pirmā un otrā vākuma kontroles paraugu zemeņu **krāsa** gan pētījuma sākumā gan beigās novērtēta augstāk, salīdzinot ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem (sākumā kontrole 1v -10.7; 2v-10.2 beigās 1v-;10.6; 2v-9.2 un 1v. (L1+D1)-7.9 un 1v (L3+G2) 10.2; 2 v. (L1+D1)-8.5 un (L3+G2) 7.2).Trešā vākuma zemeņu kontroles paraugu krāsa, pēc sensorā novērtējuma, pētījuma beigās bija zemāka (8,1), salīdzinot ar biopolimēriem apstrādātos paraugus (L1+D1)-8,6 un D (L3+G2) 9,5.

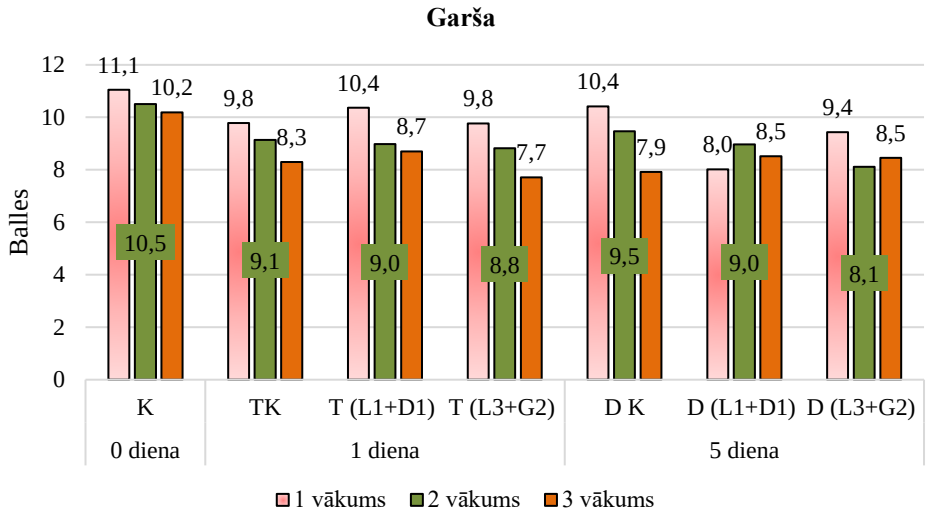
Pēc sensorās vērtēšanas rezultātiem redzams, ka **smarža** pēc apstrādes ar biopolimē- riem bija būtiski mazāka, salīdzinot ar kontroles paraugiem (6.att.).



6. att. Smaržas sensorais novērtējums pirmā, otrā un trešā vākuma zemenēm

Izvērtējot visu vākumu zemeņu smaržas novērtējumu, redzams, ka pētījuma sākumā bijušas aromātiskākās otrā vākuma zemenes, bet trešajā dienā DK pirmā vākuma zemenes.

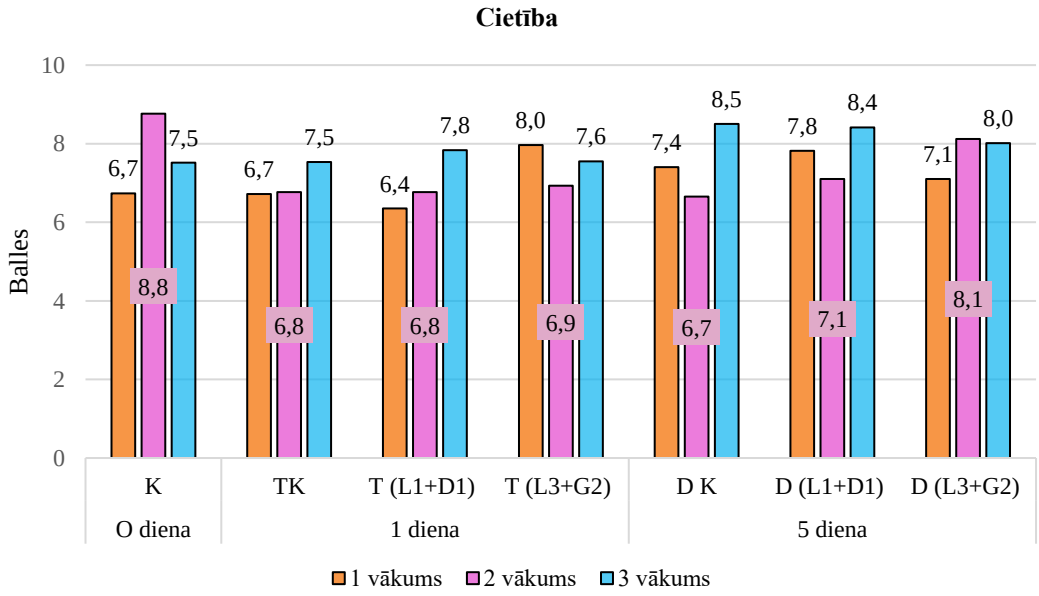
Vērtētāji pēc **garšas** visaugstāk novērtējuši pirmā neapstrādāto zemeņu garšu (7.att.).



7.att. Garšas sensorais novērtējums pirmā, otrā un trešā vākuma zemenēm

Pēc sensorās vērtēšanas rezultātiem, redzams, ka pēc vienas dienas uzglabāšanas telpā vērtētāji kā garšīgākos atzinuši pirmā vākuma ar biopolimēriem apstrādātās zemenes T(L1+D1) paraugus, nedaudz zemāk T(L3+G2), bet būtiski zemāk novērtējuši trešā vākumu ar biopolimēriem apstrādāto paraugu zemeņu garšu. Pēc trīs dienu uzglabāšanas dzesētavā vērtētāji, kā garšīgākos atzinuši K pirmā vākuma paraugu. Savukārt izvērtējot ar biopolimēriem apstrādātos paraugus redzams, ka visaugstāk novērtēts pirmā vākuma D(L3+G2) un otrā vākums D(L1+D1).

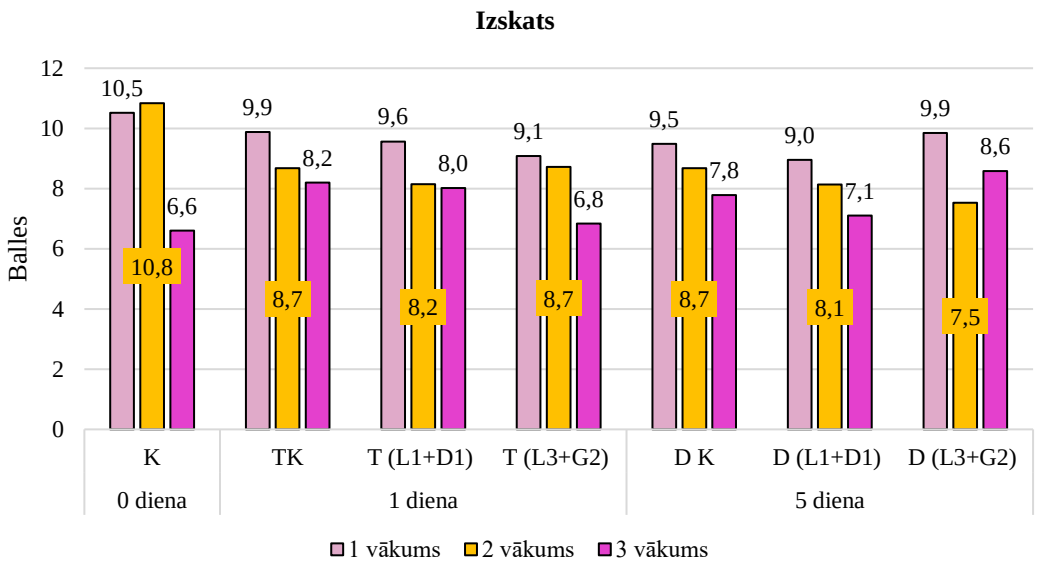
Zemeņu paraugu **cietības** sensorais novērtējums pa vākumiem bija atšķirīgs (8.att.).



8.att. Cietības sensorais novērtējums pirmā, otrā un trešā vākuma zemenēm

Augstāko cietības novērtējumu pētījuma laikā saņēma trešā vākuma DK un ar biopolimēriem apstrādātās zemenes, kas bija uzglabātas dzesētavā D (L1+D1), bet telpā pirmā vākuma T (L3+G2).Savukārt kontroles paraugu D K un TK cietības vērtējums starp vākumiem un uzglabāšanas veidiem atšķirīgs.

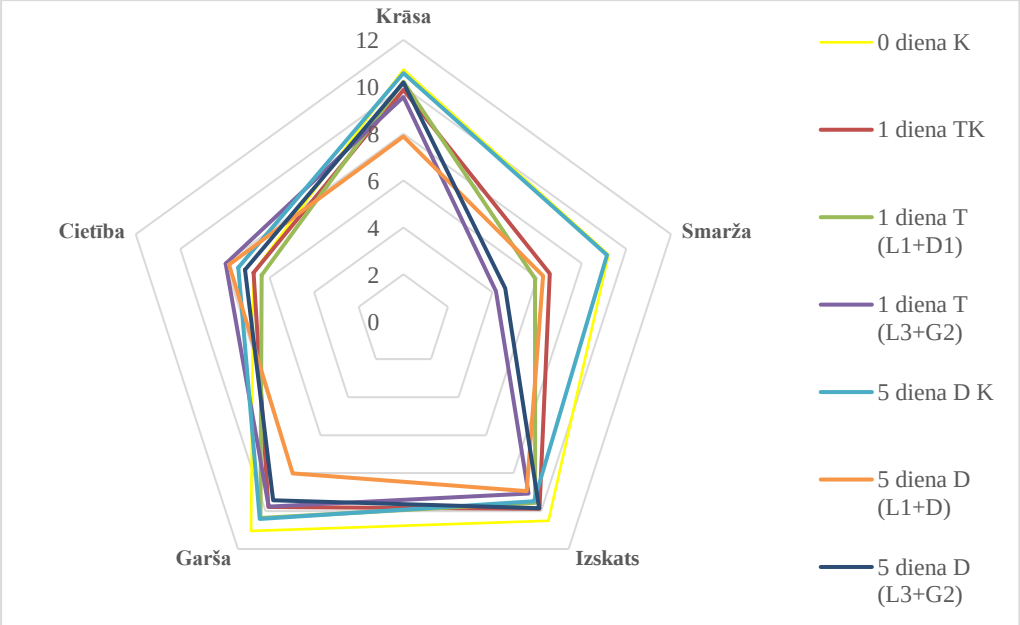
Pēc **izskata** visaugstāko novērtējumu saņēmuši pirmā un otrā vākuma kontroles paraugi pētījuma sākumā un beigās (9.att.).



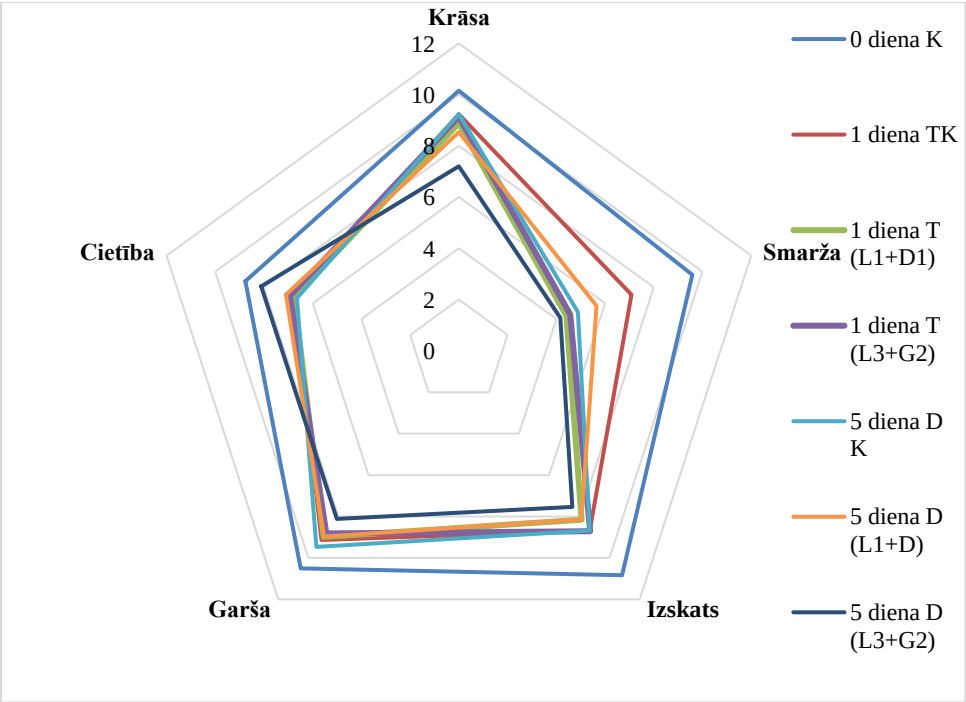
9.att. Izskata sensorais novērtējums pirmā, otrā un trešā vākuma zemenēm

Pētījuma beigās trešā vākuma zemeņu paraugi pēc izskata bija novērtēti augstāk nekā nultajā dienā. Pēc izskata pirmā un trešā vākuma ar biopolimēriem D (L3+G2) apstrādātās zemenes bija novērtētas augstāk, salīdzinot ar kontroles parauga zemenēm.

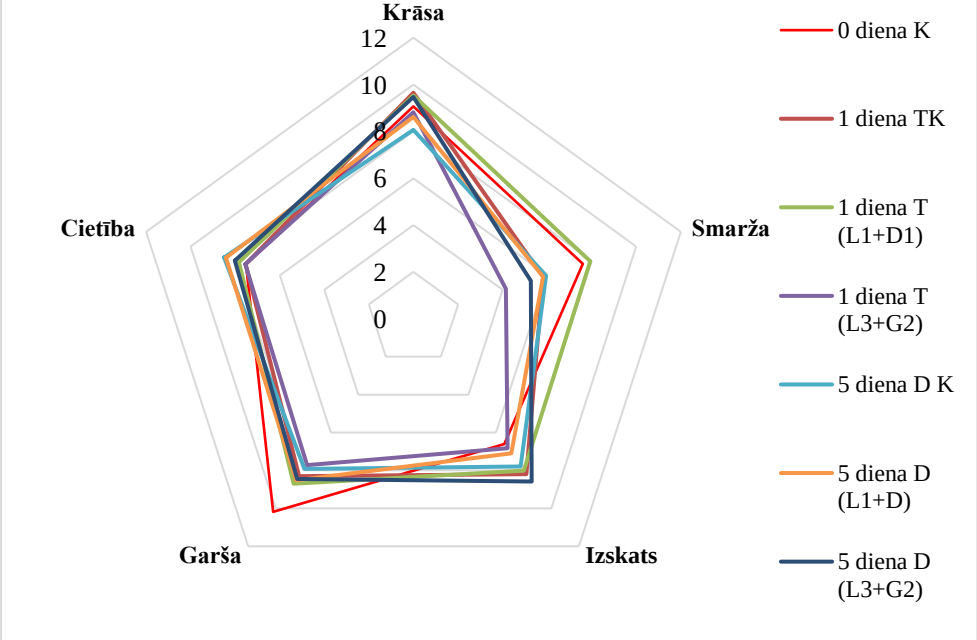
Pirmā, otrā un trešā vākuma zemeņu pētījuma līnijskalas sensoro īpašību krāsas, cietības, smaržas, izskata un garšas novērtējuma rezultāti atspoguļoti atsevišķos attēlos (attiecīgi 10.;11. un 12.attēlā).



10. att. Līnijskalas sensorais novērtējums pirmā vākuma zemenēm



11. att. Līnijskalas sensorais novērtējums otrā vākuma zemenēm

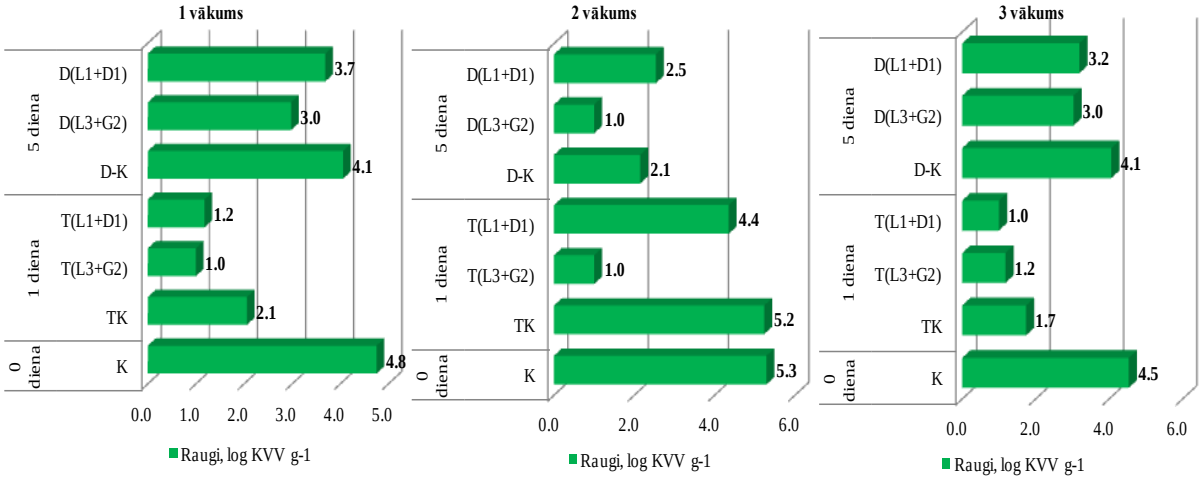


12. att. Līnijskalas sensorais novērtējums trešā vākuma zemenēm

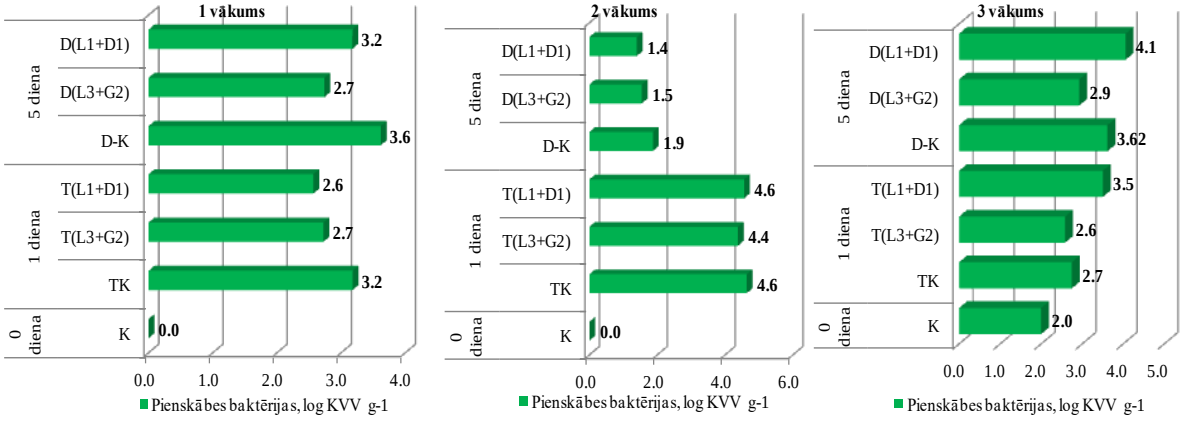
Izvērtējot raugu kopskaitu zemeņu paraugos, konstatēts, ka lielākais to daudzums bija otrajā vākumā pirms uzglabāšanas (13. att.) arī uzglabāšana telpā iepriekš minētajam paraugam būtiski nesamazināja raugu kopskaitu (5.2 log KVV g^{-1}). Savukārt zemāki rauga kopskaita rādītāji bija visiem paraugiem apstrādātiem ar levēna šķīdumu 3% un glicerīnu 2% (L3%+G2%).

13.att. Raugu kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā (2020. pētījuma gada)

Izvērtējot pienskābas baktēriju daudzumu redzams, ka lielākais to kopskaits bija otrā vākuma uzglabāšana telpā (14. att.). Tas

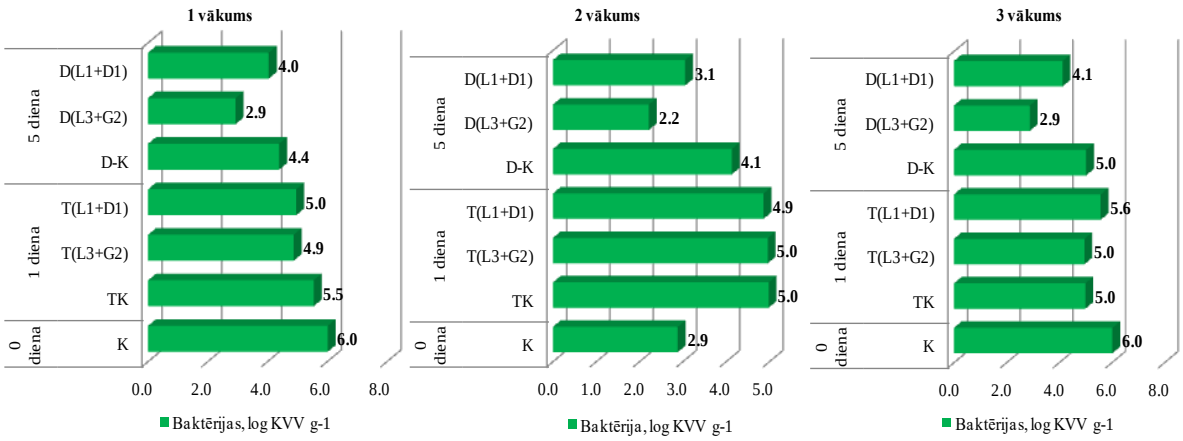


liecina, ka šo ogu paraugiem ir sācies bojāšanās process. Zemākais pienskābes baktēriju kopskaits konstatēts apstrādātiem paraugiem (L3%+G2%), kas liecina par noteikta apstrādes veida efektivitāti.



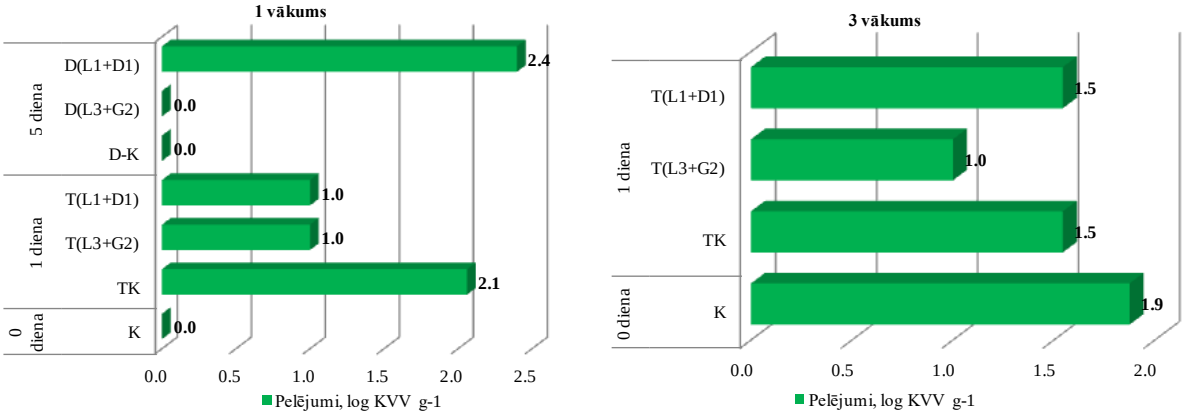
14.att. Pienskābes baktēriju kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā (2020. pētījuma gada)

Baktēriju kopskaits apstrādātajiem paraugiem (L3%+G2%), uzglabājot 5 dienas, dzesētavā noradīja zemākas vērtības (15. att.), kas vēl reiz apliecina apstrādes veida efektivitāti.



15.att. Baktēriju kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā (2020. pētījuma gada)

Pelējuma sēnīte konstatēta tikai pirmā un trešā vākuma paraugiem (16. att.), savukārt otram vākumam pelējuma klātbūtne netika konstatēta. Pirmajā vākuma paraugiem pelējuma sēnīte konstatēta vairākiem paraugiem pēc uzglabāšanas (16. att. 1 vākums), kas liecina par sekundāro paraugu piesārņošanos uzglabāšanas laikā.



16.att.

Pelējuma kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā (2020. pētījuma gada)

ZEMENES 2021

Projekta uzdevumu ietvaros 9, un 21, jūlijā veikts komplekss pētījums zemeņu kvalitātes saglabāšanai uzglabāšanas laikā, izmantojot biopolimēru apstrādi un ieliktņus, Lai novērtētu biopolimeru pārklājumu un ieliktnīšu ietekmes efektivitāti uz aveņu kvalitāti uzglabāšanas laikā, testēta aveņu kvalitāte, noteikti fizikālie rādītāji (krāsa, cietība, masas zudumi), ķīmiskie un sensorie rādītāji,

Lai vispusīgi raksturotu biopolimeru pārklājumu efektivitāti uz ogu kvalitāti uzglabāšanas laikā, testēta zemeņu virsmas krāsa kontroles un apstrādātajiem zemeņu paraugiem, Krāsu vērtības CIE L∗a∗b∗ krāsu sistēmā: L* vērtība-intensitāte (0 = melns, 100 = balts); a∗ vērtība (–a∗ = zaļš, +a∗ = sarkans) un b∗ vērtība (–b∗ = zils, +b∗ = dzeltens), Zemeņu krāsu L^*, a^* un b^* vērtības komponentu kopējās izmaiņas uzglabāšanas laikā atspoguļo diferenču summa ΔE^*,

Pirmā vākuma zemeņu kontroles paraugiem pēc uzglabāšanas dzesētavā + 4°C temperatūrā, piektajā dienā bija novērota virsmas krāsojuma maiņa, tā bija kļuvusi tumšāka (1.tabula). Krāsas a* vērtība pēc uzglabāšanas K palielinājusies par 15.2 %. Savukārt ar biopolimēriem apstrādātajam A zemeņu paraugam a* vērtība (sarkanā krāsa) izmainījusies- palielinājusies mazāk, attiecīgi 10.9%, bet 1RA paraugam par 16.5 %. Savukārt sarkanās krāsas – a*vērtības palielināšanās bija novērota arī pārējiem ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem (attiecīgi 1R 33,8%, 1RA 36,0% un 2RA 34,4%). Mazākās krāsas izmaiņas diferenču summa ΔE^* salīdzinājumā ar K bija A (10.9) un 2R paraugam (11.9).

1.tabula

1 vākuma zemeņu virsmas krāsas rādītāju L* a* b* izmaiņas

Datums	Paraugi	L*		a*		b*		ΔE^*
		Vid.	Stdev	Vid.	Stdev	Vid.	Stdev	
0 diena	K	30.65	1.93	25.01	2.81	16.85	2.12	
5 diena	K	27.63	2.37	33.15	2.49	29.31	3.69	15.19
	1R	26.59	1.23	33.45	2.89	28.97	2.97	15.32
	A	24.76	2.16	28.61	2.85	25.22	3.53	10.85
	1RA	24.64	2.74	34.00	3.29	29.33	2.92	16.52
	I	25.88	2.24	31.25	3.35	28.96	3.83	14.44
	IA	26.07	1.74	33.66	2.19	28.75	2.91	15.41
	2R	25.40	2.09	30.08	2.98	26.22	4.65	11.88
	2RA	25.53	1.24	33.61	3.06	29.39	3.56	16.05

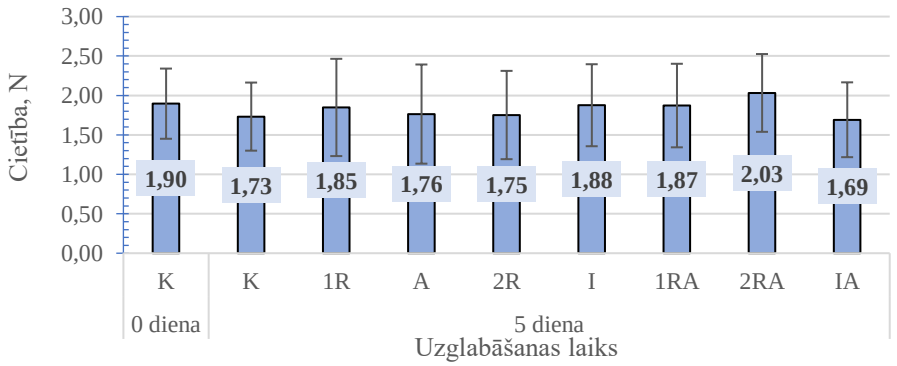
Otrā vākuma zemeņu virsmas krāsas izmaiņu rezultāti apkopoti 2.tabulā. Otrā vākuma zemeņu virsmas krāsa L* pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā K paraugiem kļuva par 9.3 % mazāka (paraugi kļuva tumšāki), salīdzinot ar K(0). L* vērtības izmaiņas būtiski atšķīrās no zemeņu paraugiem, kuri bija apstrādāti ar biopolimēriem. Būtiski mazākas L* vērtības izmaiņas bija paraugiem 2RA 3.3%;, IA 4.8 %; 2R 5.5 %. Mazākas a*vērtības sarkanās krāsas izmaiņas pēc uzglabāšanas dzesētavā bija 2R paraugam attiecīgi 1.1 % un mazākā krāsu izmaiņas diferenču summa 2R ΔE^* 1,6, bet lielākās krāsu izmaiņas diferenču summa 1RA 4.9 ΔE^* .

2.tabula

Otrā vākuma zemeņu virsmas krāsas rādītāju L* a* b* izmaiņas

Datums	Paraugi	L*		a*		b*		Δ E*
		Vid,	Stdev	Vid,	Stdev	Vid,	Stdev	
0 diena	K0	27.61	1.00	23.69	3.18	12.72	2.35	
5 diena	K	26.18	1.94	21.51	2.54	10.65	1.44	3.33
	1R	26.49	1.42	20.00	2.51	12.51	2.31	3.87
	A1	25.80	1.34	22.30	1.47	10.86	1.57	2.95
	1RA1	25.44	1.67	19.97	2.51	10.30	2.76	4.94
	I	26.19	1.63	20.17	3.45	10.70	2.01	4.30
	IA	26.56	1.50	22.55	2.32	12.28	1.19	1.62
	2R	27.90	1.05	22.38	1.88	11.86	1.13	1.60
	2RA	26.09	2.11	22.92	2.85	11.66	2.72	2.01

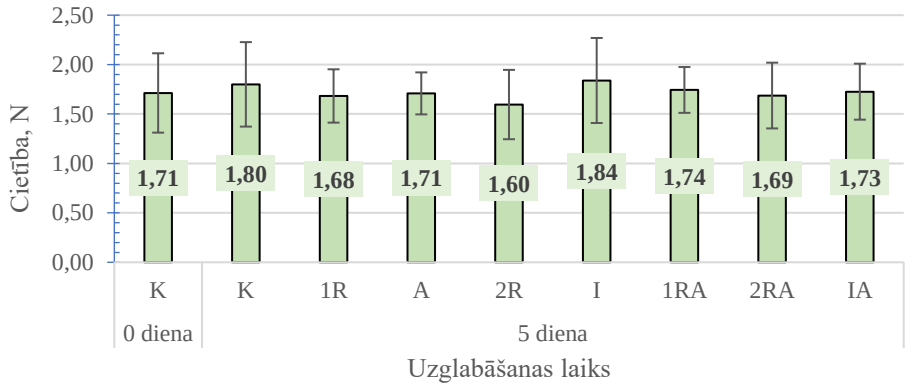
Pirmā vākuma zemenēm cietības izmaiņas pēc uzglabāšanas dzesētavā redzamas 1. attēlā. Pēc piecām uzglabāšanas dienām cietība nedaudz samazinājās visos paraugos, izņemot ar biopolimēriem apstrādāto paraugu 2RA (cietība 2.03 N).



1 att. Pirmā vākuma zemeņu cietības izmaiņas

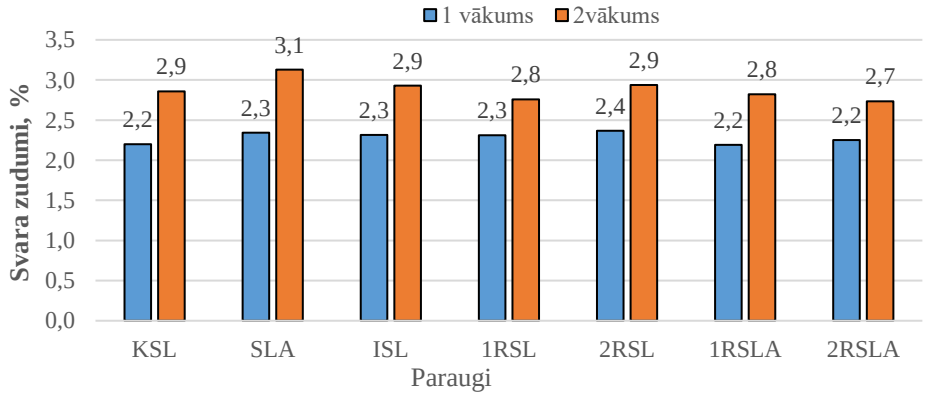
Uzglabāšanas laikā dzesētavā zemeņu cietība būtiski nemainījās, to neietekmēja arī apstrādes veids ar biopolimēriem vai ieliktņi kārbiņās. Tomēr ir vērojamas nelielas cietības izmaiņas tendences pēc piecām uzglabāšanas dienām (2RA).

Otrā vākuma zemenēm, cietība uzglabāšanas laikā dzesētavā palielinājās nedaudz ar biopolimēriem atseviškiem testētajiem paraugiem (2. att.), kas varētu būt skaidrojams ar ogu nevienmērīgo gatavības pakāpi, jo arī K paraugam cietība palielinājās nedaudz (1,8 N). Cietība bija nedaudz paaugstinājusies zemenēm, kuras glabājās kārbiņās ar ieliktni I (1,84N).



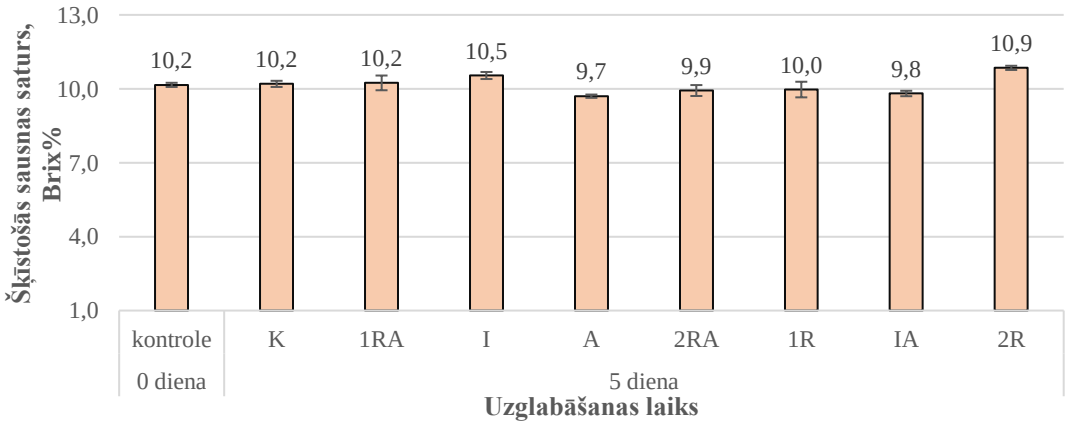
2. att. Otrā vākuma zemeņu cietības izmaiņas

Pēc piecu dienas uzglabāšanas mitruma saturs zemenēs samazinājās līdz ar to arī masa-svars samazinājās. 3.attēlā redzamas masas zuduma izmaiņas procentos pētījuma laikā pirmā vākuma zemenēm, Līdzīgas izmaiņas bija novērotas arī otrā vākuma zemenēm. Zemeņu masa pēc piecu dienas SHELF LIFE uzglabāšanas telpā samazinājās vidēji 2,2 % K paraugiem un 1RSLA, 2RSLA, bet pārējiem ar biopolimēriem apstrādātajiem paraugiem 2,3% (ISL, SLA, 1RSL) un 2,4% (2RSL).



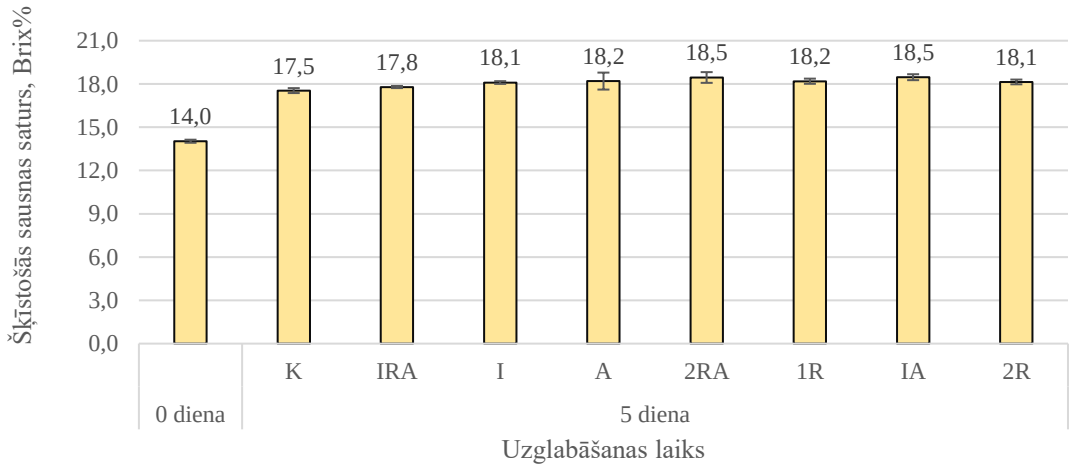
Masas zuduma izmaiņas pirmā vākuma zemenēm

Pirmā vākuma zemenēm pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā K paraugiem šķīstošās sausnas saturs būtiski nemainījās (3.att.). Atsevišķiem paraugiem pēc apstrādes ar biopolimēriem tas nedaudz palielinājās: I (par 3,7%), 2RA (6,7%), kas skaidrojams ar biopolimēru ķīmisko sastāvu,



3. att. Šķīstošās sausnas satura izmaiņas zemenēs (1vākums)

Otrā vākuma zemenēm pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā visiem paraugiem šķīstošās sausnas saturs būtiski paaugstinājās salīdzinājumā ar pirmo dienu (K (13,07,) 14,0 Brix% līdz 18,5 Brix% (IA un 2RA). Sausnas satura izmaiņas redzamas 4. attēlā. Zemenēm K par 25%, bet pārējiem paraugiem pēc apstrādes ar biopolimēriem vairāk, attiecīgi no 26,8% (IR) līdz 31,6 (IA), kas varētu būt arī saistīts-skaidrojams ar biopolimēru ķīmisko sastāvu.

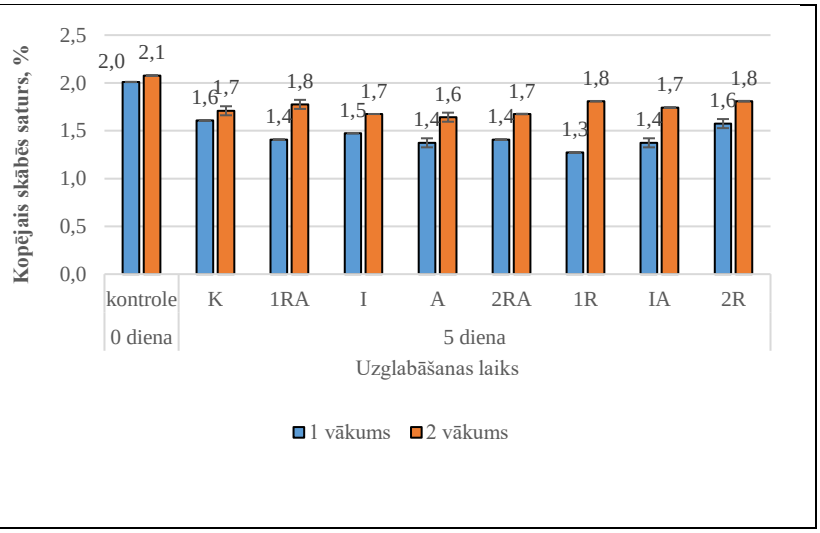


4. att. Šķīstošās sausnas satura izmaiņas zemenēs (2 vākums)

Kopējās skābes saturs zemenēm uzglabāšanas laikā, salīdzinājumā ar K(1) piekto dienu, būtiski samazinājās (5.attēlu-tabulu). Pēc piecām dienām, skābes saturs samazinājās ***pirmā*** vākumu, zemeņu ar biopolimēriem apstrādātajos paraugos, salīdzinot ar K (1), attiecīgi par A;IA 39,6%; 1R 45,8%; 2R 27,1%; 1RA; 2RA 37,5% un K(2) 25%.

Savukārt ***otrā*** vākuma zemeņu, ar biopolimēriem apstrādātajos paraugos skābes saturs, salīdzinot ar K (1), pēc piecām dienām, samazinājās attiecīgi 1R, 2R 12,9%; IRA 14,5%; IA 16,1%; I, 2RA 19,4%, A21% un K(2) 17,7%.

1 vākums	Izmaiņas, %	2 vākums	Izmaiņas, %
K (0)	-	K (0)	-
K (5 d)	25,0	K (5d)	17,7
I(5d)	33,3	I(5d)	19,4
A(5d)	39,6	A(5d)	21,0
IA (5d)	39,6	IA(5d)	16,1
1R(5d)	45,8	1R(5d)	12,9
2R(5d)	27,1	2R(5d)	12,9
1RA(5d)	37,5	1RA(5d)	14,5
2RA(5d)	37,5	2RA(5d)	19,4

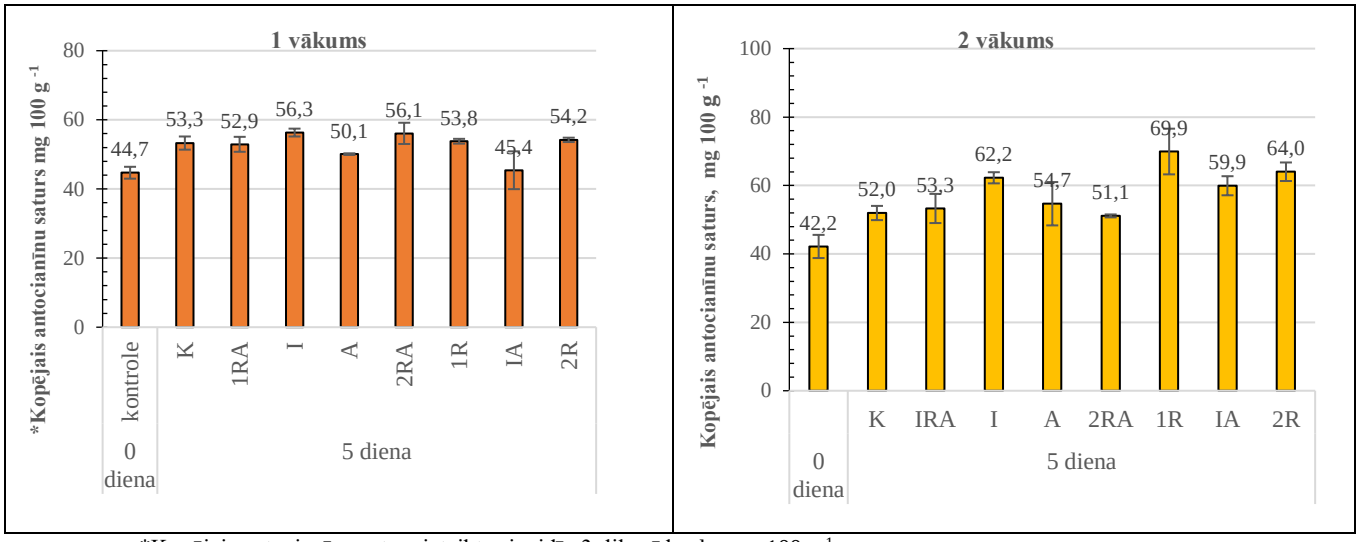


5.att. Kopējās skābes satura izmaiņas pirmā un otrā vākuma zemeņu paraugos

Pētījuma laikā antocianīnu saturs bija atšķirīgs starp pirmā un otrā vākuma zemeņu paraugiem. To saturs būtiski atšķīrās viena vākuma ietvaros starp analizētajiem paraugiem (6.att.). Visos zemeņu paraugos antocianīnu saturs būtiski

palielinājās salīdzinājumā ar pirmo dienu (0) dienu. Pirmā vākuma ogām pēc uzglabāšanas - piektajā dienām lielākais antocianīnu saturs bija zemenēm paraugam ar ieliktni I (56,3 mg 100 g^{-1}), bet zemākais apstrādātajam zemeņu paraugam kārbiņā ar ieliktni IA (48,3 mg 100 g^{-1}).

Savukārt otrā vākuma ogām pēc piecām dienām lielākais antocianīnu saturs zemenēs bija paraugam 2R (64,0 mg 100 g^{-1}), bet zemākais apstrādātajām zemenēm kārbiņā ar ieliktni 2RA (51,1 mg 100 g^{-1}).



*Kopējais antocianīnu saturs izteikts cianidīn 3glikozīda ekv, mg100 g^{-1}

5. att. Antocianīnu satura izmaiņas pirmā un otrā vākuma zemeņu paraugos

Antocianīnu satura procentuālās izmaiņas pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā aprēķinātas un apkopotas 5. tabulā.

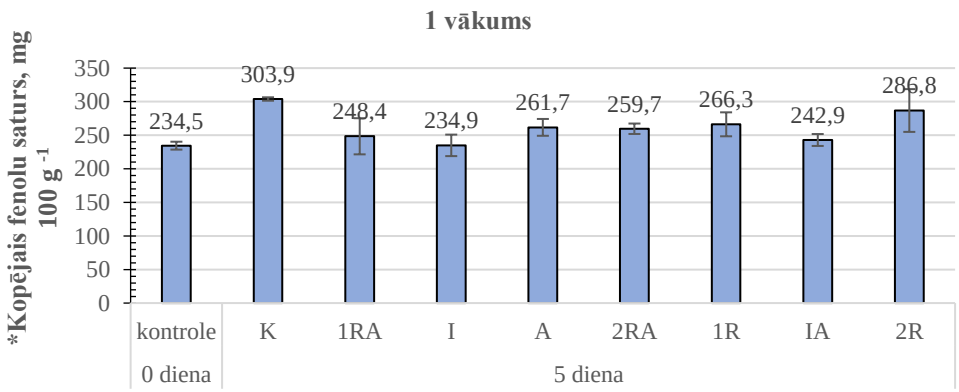
5.tabula

Antocianīnu satura procentuālās izmaiņas pirmā un otrā vākuma zemenēs

Paraugs	1 vākums	2 vākums
K	19,2	23,2
I	26,0	47,6
A	12,0	29,6
IA	8,0	42,1
1R	20,4	48,6
2R	21,3	51,8
1RA	18,4	26,3
2RA	25,5	21,2

Pirmā vākuma paraugiem, salīdzinājumā ar 0 dienu pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā (+4±1°C), antocianīnu saturs palielinājās, par norāda aprēķinātās procentuālās izmaņas: K (19,2%), bet paraugos ar ieliktni I 26 %). Otrā vākuma zemeņu paraugos antocianīnu saturs bija palielinājies vēl vairāk: K (23,2%), bet paraugos pēc apstrādes ar biopolimēriem 2R 51,8%.

Kopējo fenolu satura rezultāti, kas iegūti pētījuma laikā, testējot pirmā vākuma zemenes, apkopoti un aprēķinātas procentuālās izmaiņas, pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā, Rezultāti redzami 6.attēlā.



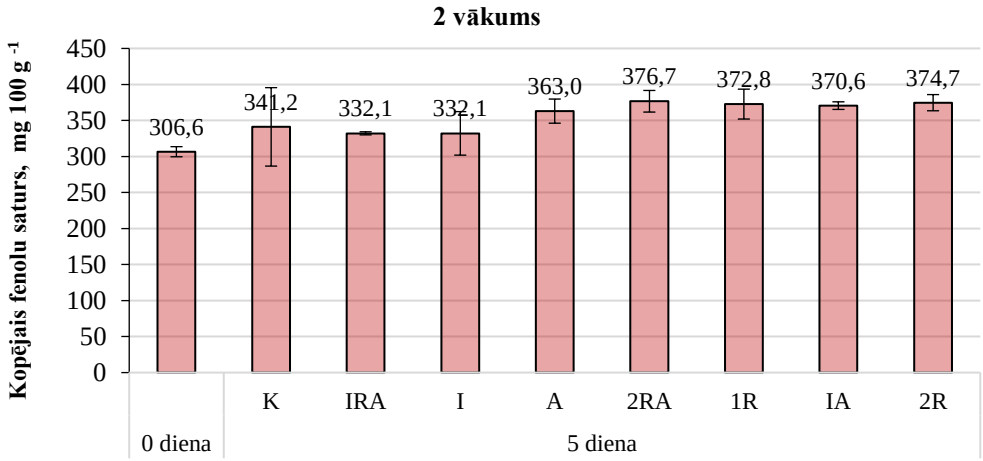
6.att. Kopēja fenolu satura rezultāti un izmaiņas pētījuma laikā pirmā vākuma zemenēs

*Kopējais fenolu saturs, izteikts ar galluskābes ekv, mg 100 g^{-1}

Minimālas kopējo fenolu satura izmaiņas, salīdzinot ar K pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā, bija

konstatētas paraugam ar ieliktni (0,5%) un apstrādi IA (3.6%), bet vislielākās tikai 2R (22.3%). Varbūt varētu teikt, ka apstrāde ar biopolimēriem samazināja kopējo fenolu satura izmaiņas,

Otrā vākuma zemeņu paraugiem iegūtie kopējā fenolu satura testēšanas rezultāti apkopti 7.attēlā. Pētījuma pirmajā dienā kopējais fenolu saturs 153,3 mg 100 g^{-1}, bet pēc piecām dienām palielinājās līdz 170,6 mg 100 g^{-1}.



7. att. Kopējā fenolu satura rezultāti un izmaiņas otrā vākuma zemenēm

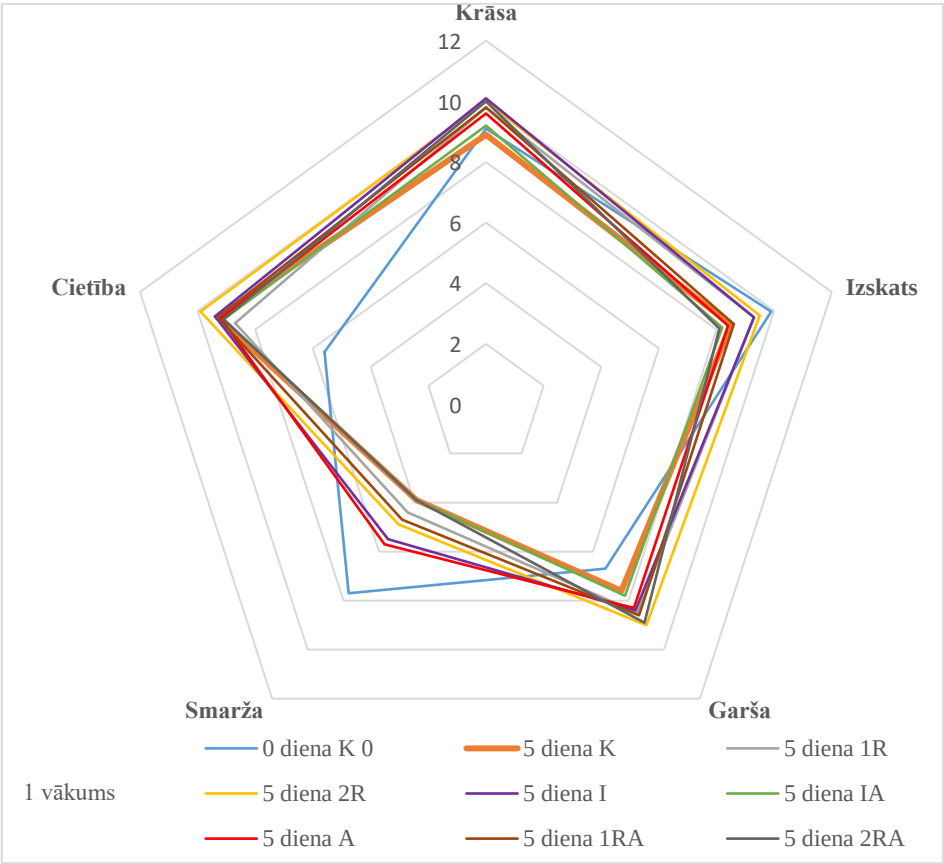
Pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā kopējais fenolu saturs palielinājās K paraugā par 11,3%, kārbiņā ar ieliktni par **I** un 1RA par 8,3%, bet ar visos ar biopolimēriem apstrādātajos paraugos attiecīgi vairāk A18,4%; 2RA 22,9%; 1R 21,6% ; IA 20,9% un 2R2,2%.

Pētījuma laikā, pirmā vākuma zemeņu paraugiem, veikta sensorā vērtēšana, izmantojot Līnijskalu, testēta krāsa, izskars, garša un cietība. Iegūtie vērtēšanas rezultāti apkopoti tabulā 6. tabulā un 8. attēlā.

6.tabula

Pirmā vākuma zemeņu sensorās vērtēšanas rezultāti

Īpašības	Paraugi/šifrējums								
	K 0 diena	K (5 diena)	1R (5 diena)	2R (5 diena)	I (5 diena)	IA (5 diena)	A (5 diena)	1RA (5 diena)	2RA (5 diena)
Krāsa	9,1	8,9	9,8	10,0	**10,1**	9,2	9,6	9,8	**10,0**
Izskats	9,9	8,5	9,3	**9,5**	9,3	8,2	8,4	8,6	8,1
Garša	6,7	7,6	8,5	**9,0**	8,4	7,8	8,3	8,6	8,9
Smarža	**7,7**	3,9	4,4	4,9	5,5	3,9	5,7	4,7	3,9
Cietība	5,6	9,3	8,7	**9,9**	9,4	9,1	9,2	9,3	9,1
	STDEV	STDEV	STDEV	STDEV	STDEV	STDEV	STDEV	STDEV	STDEV
Krāsa	0,92	1,34	0,59	0,58	0,57	0,41	0,51	0,45	0,55
Izskats	1,16	1,15	0,52	0,50	0,49	0,84	0,61	0,28	0,65
Garša	1,49	1,17	0,38	0,61	0,64	0,89	0,69	0,48	0,37
Smarža	1,42	0,89	0,94	1,27	1,04	1,01	0,81	1,37	1,12
Cietība	0,91	0,66	0,71	0,29	0,73	0,70	0,51	0,53	0,65



8.att. Sensorais novērtējums pirmā vākuma zemenēm

Pēc iegūtajiem rezultātiem, redzams, ka **krāsa** pēc uzglabāšanas piecām dienām pirmā vākuma paraugam K (0) bija novērtēta zemāk (8,9), salīdzinot ar pārējo paraugu: ar ieliktņiem, ar biopolimēriem apstrādāto krāsu. Šiem paraugiem krāsa novērtēta diapazonā no 9,2 (IA) līdz 10,1 (I), Labākais **izskats** pēc piecām dienām bijis 2R (9,5), bet pēc vērtējuma sliktākais izskats

2RA. Pēc **garšas** augstāk novērtēts 2R (9,0), bet zemāk novērtēts K paraugs (7,6). Aromātiskākās ogas- pēc **maržas** augstāk novērtētas bija A paraugs, bet zemāk (3,9) bija novērtēti trīs paraugi: K, IA un 2RA, Pēc piecu dienu uzglabāšanas ogas stigrākas, cietība novērtēta augstāk (9,9) paraugam 2R, bet zemāk (8,7) paraugam 1R .

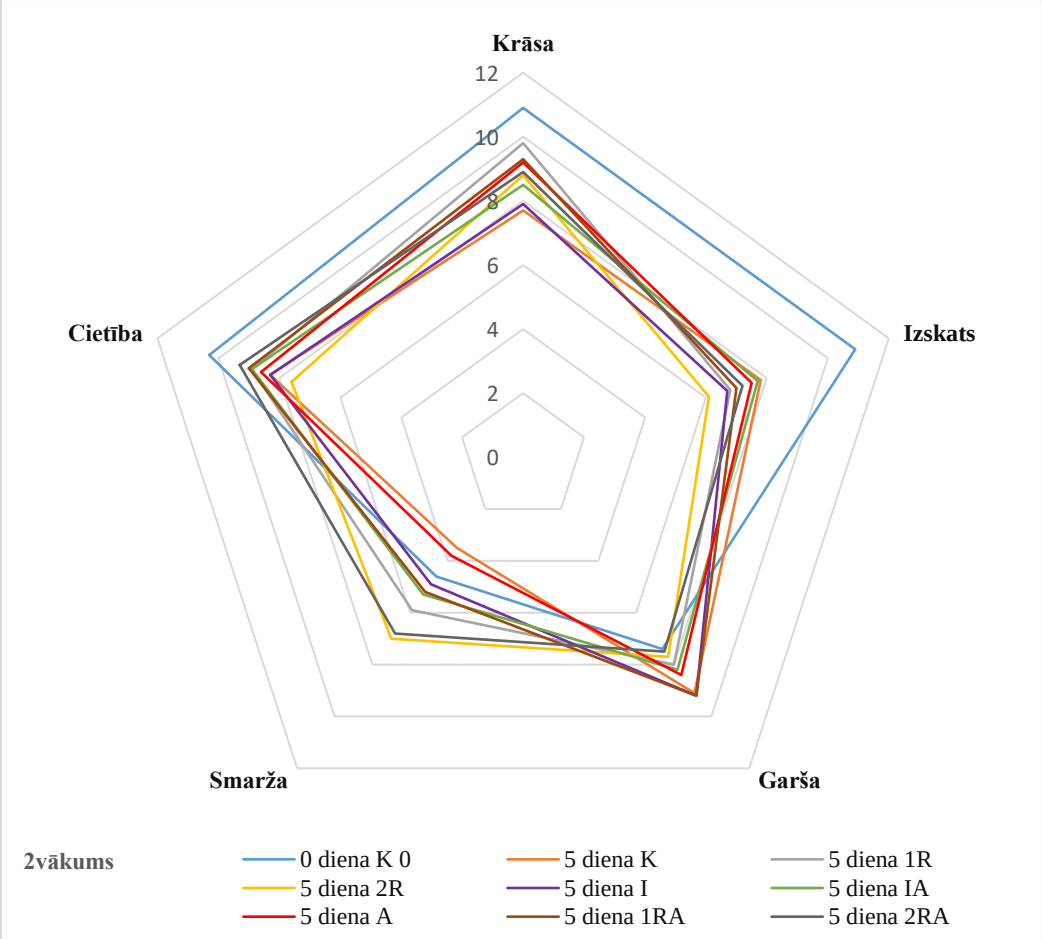
Otrā vākuma zemeņu paraugu sensorā novērtējuma rezultāti apkopoti 7. tabulā un attēloti 9.attēlā.

7.tabula

Otrā vākuma zemeņu sensorās vērtēšanas rezultāti

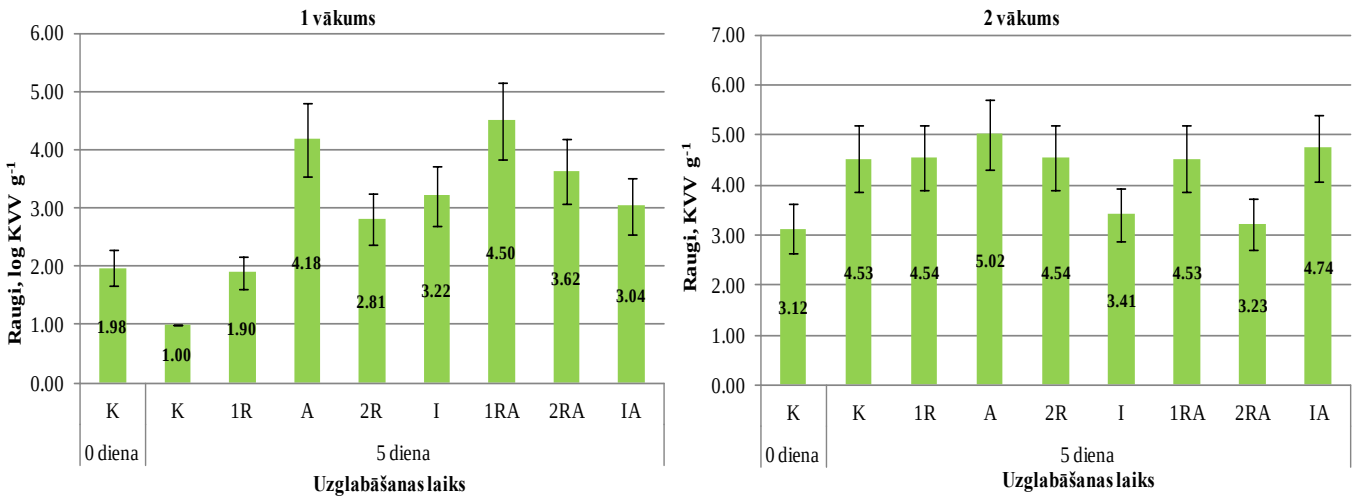
Īpašība	Paraugs/Šifrējums								
	K 0 0 diena	K 5 diena	1R 5 diena	2R 5 diena	I 5 diena	A 5 diena	IA 5 diena	1RA 5 diena	2RA 5 diena
Krāsa	10,9	7,7	9,8	8,8	7,9	8,5	9,2	9,3	8,9
Izskats	10,9	7,8	6,8	6,1	6,7	7,7	7,5	7,0	7,2
Garša	7,4	9,1	8,0	7,7	9,2	8,2	8,4	9,2	7,5
Smarža	4,6	3,5	5,9	7,0	4,9	5,3	3,8	5,2	6,8
Cietība	10,3	8,3	8,9	7,6	8,3	8,9	8,6	9,0	9,3
	Stdev	Stdev	Stdev	Stdev	Stdev	Stdev	Stdev	Stdev	Stdev
Krāsa	0,2	0,8	0,5	0,5	0,8	0,6	0,8	0,9	0,9
Izskats	0,3	0,7	0,8	1,0	0,5	0,5	0,9	1,1	0,8
Garša	0,6	0,8	0,9	1,1	1,0	0,9	0,9	0,8	0,7
Smarža	1,5	1,1	1,3	1,0	0,9	0,6	0,1	0,7	1,1
Cietība	0,2	0,9	0,9	0,6	0,9	1,0	1,0	0,8	1,1

Pēc sensorās vērtēšanas rezultātiem vērojams, ka pēc apstrādes ogu krāsa ir uzlabojusies, jo vērtētāji piektajā dienā augstāk ir novērtējuši zemeņu krāsu pēc apstrādes. Zemākais krāsas novērtējums K paraugam (7,7), bet augstākais IR (9,8). Tomēr pēc izskata apstrādātās ogas vērtētājiem nav patikušas, jo K paraugs novērtēts augstāk (7,8), bet apstrādātas ogas zemāk 7,7 (A) līdz 6,1 (2R). Pēc garšas apstrādātais paraugs un paraugs ar ieliktni novērtēti nedaudz augstāk (I un 1RA 9,2) tas būtiski neatšķiras no K, kas novērtēts nedaudz zemāk (K 9,1). Smarža visaugstāk novērtēta 2R (7,0), bet uz pusi mazāk K paraugam (3,5). Cietība augstāk novērtēta 2RA (9,3), bet zemāk 2R (7,6).



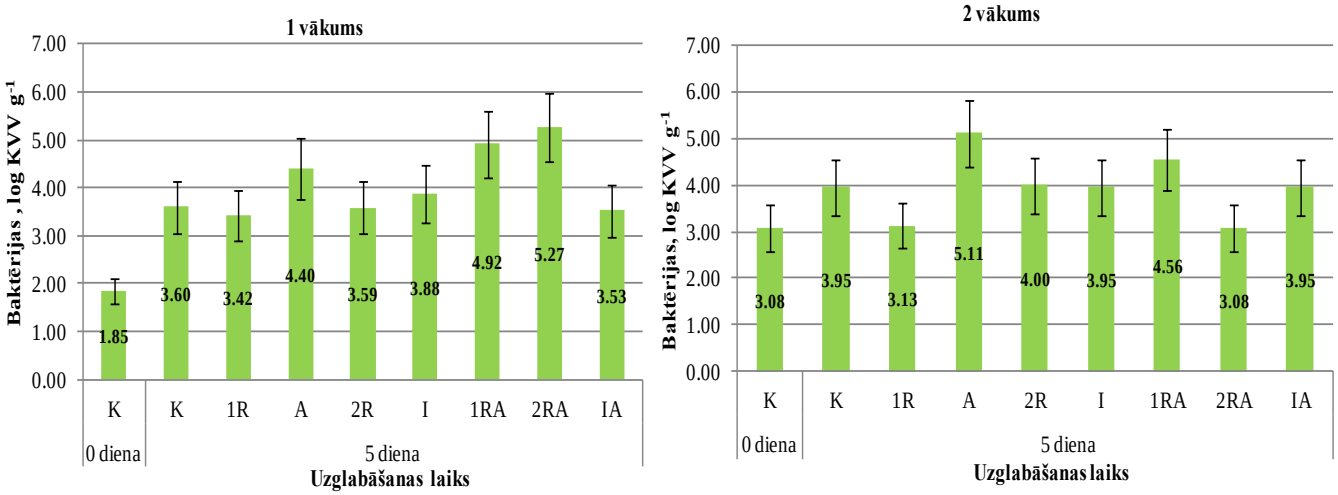
7. att. Sensorais novērtējums pirmā vākuma zemenēm

Izvērtējot raugu kopskaitu zemeņu paraugos 1 un 2 vākumā konstatēts (8. att.), ka augstāki to radītāji bija apstrādātiem (A, 1RA, paraugiem 1 vākums un A, IA paraugiem 2 vākums) paraugiem. Tādēļ var secināt, ka apstrāde pētītajiem paraugiem neietekmēja raugu attīstību uzglabāšanas laikā. **Pelējuma sēnīte zemeņu paraugos 2021. pētījuma gada pirms un pēc uzglabāšanas nevienā no paraugiem netika konstatēta.**

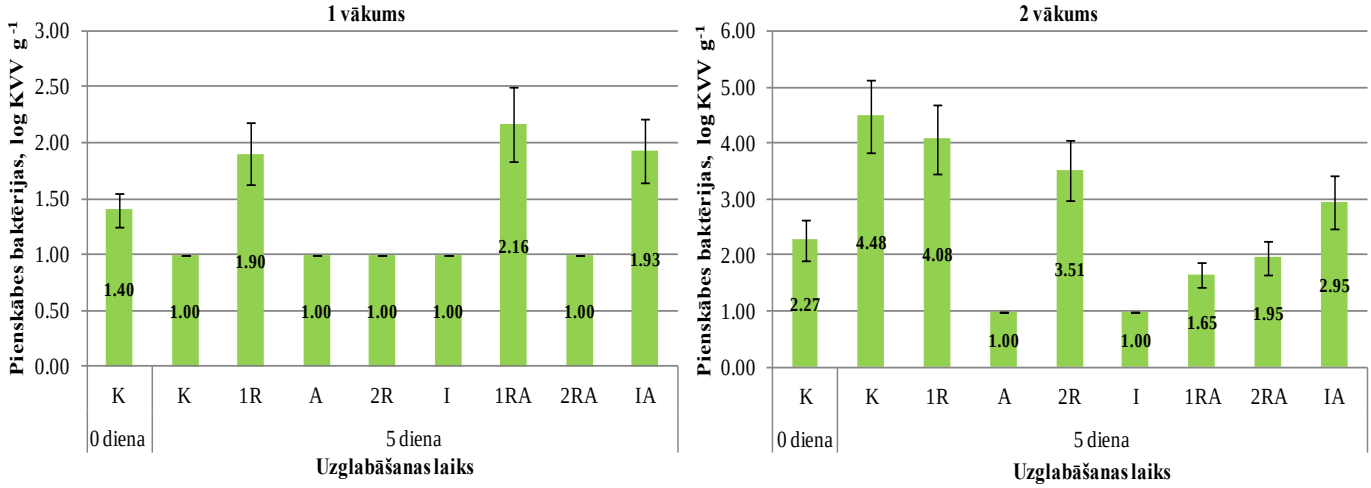


8.att. Raugu kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā (2021. pētījuma gada)

Arī augstāks baktēriju kopskaits zemeņu paraugos bija novērots pirmā un otrā vākuma apstrādātiem paraugiem (9. att.). Līdz ar to viennozīmīgu secinājumu nav iespējams izdarīt, dati ir pretrunīgi pētījums jāturpina trešo gadu.



9.att. Baktēriju kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā (2021. pētījuma gada)
Savukārt pienskābo baktēriju kopskaits it augstāks paraugam 1RA 1 vākums, K, 1R, 2R., 2 vākums (10. att.) kas liecina par bojāšanās procesa sākšanos iepriekš minētajiem paraugiem. Pienskābes baktērijas nav zemeņu dabīgā mikroflora un to pārmērīga paradīšanās paraugā liecina par nevēlamiem procesiem paraugos.



10.att. Pienskābes baktēriju kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā (2021. pētījuma gada)

ZEMENES 2022

Projekta uzdevuma ietvaros 2022. gada 18. jūlijā veikts komplekss pētījums zemeņu kvalitātes saglabāšanai uzglabāšanas laikā, izmantojot biopolimēru apstrādi un ieliktņus, kas bija izstrādāti un sagatavoti LU un DI. LU izstrādāts pārklājums un ieliki galvenokārt sastāvēja no biocelulozes. DI izstrādāta pārklājuma un ieliktņu receptūras ir atspoguļotas protokolos: „Levāna, dekstrāna pārklājumu izstrāde un izvērtēšana", „Jaunizveidotā iepakošanas kompozītmateriālu prototipa receptūra, pielietojot EPS".

Pētījuma laikā, lai novērtētu biopolimeru pārklājumu apstrādes un ieliktnīšu ietekmes efektivitāti uz zemeņu kvalitāti uzglabāšanas laikā noteikti fizikālie rādītāji (krāsa, cietība, masas zudumi), ķīmiskie rādītāji (šķīstošās sausnas, kopējās skābes saturs, kopējo fenolu un antocianīnu saturs) un veikta sensorā vērtēšana.

Testēta zemeņu virsmas krāsa kontroles un apstrādātajiem zemeņu paraugiem uzglabāšanas laikā SHELF LIFE (SL) periodā. Fiksētas krāsu vērtības CIE L∗a∗b∗ krāsu sistēmā: L* vērtība-intensitāte (0 = melns, 100 = balts); a∗ vērtība (–a∗ = zaļš, +a∗ = sarkans) un b∗ vērtība (–b∗ = zils, +b∗ = dzeltens). Zemeņu krāsu L^*, a^* un b^* vērtības komponentu kopējās izmaiņas uzglabāšanas laikā atspoguļo diferenču summa ΔE^*. Pētījuma laikā iegūtie testēšanas rezultāti analizēti un apkopoti tabulās. Pēc piecu dienu uzglabāšanas dzesētavā visgaišākais virsmas krāsojums bija K parauga zemenēm, bet vissarkanākās – vislielākā a*vērtība bija pēc otrās apstrādes C paraugiem C1RA un C2RA (29.4 un 29.5). Testēšanas rezultāti apkopoti 1.tabulā.

1.Tabula

Zemeņu virsmas krāsu rādītāju L* a* b* izmaiņas (ΔE*) uzglabāšanas laikā

Datums	Paraugi	L*		a*		b*		Δ E∗
		Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev	
0 diena	K	24.4	2.69	32.49	4.67	26.61	2.84	-
5 diena	K	27.3	2.7	25.6	4.68	17.08	4.19	12.1
	A	27.7	1.49	23.7	3.3	16.51	2.79	13.8
	1R	28.7	1.63	27.4	3.04	17.57	2.57	11.2
	2R	28.9	1.8	26.2	4.38	16.75	3.61	12.5
	1RA	28.6	2.13	25.2	4.04	16.26	4.5	13.3
	2RA	28.6	2.45	27.5	3.30	17.81	2.00	11
	I	28.5	2.39	28.7	3.06	19.02	2.98	9.4
	IA	28.0	2.09	27.3	3.82	18.59	3.22	10.2
	CA	29.9	2.31	27.9	2.77	18.9	4.15	10.5
	C1R	28.1	2.31	27.3	3.06	17.87	3.67	10.8
	C2R	27.9	1.96	25.7	4.76	16.74	3.95	12.5
	C1RA	29.8	2.7	**29.5**	3.73	19.84	4.42	**9.1**
	C2RA	30.0	1.55	**29.4**	2.69	20.13	2.95	**9.1**
	KSL	27.89	2.93	25.78	3.38	15.28	3.33	13.6
	SLA	27.94	3.5	26.77	4.41	15.88	4.31	12.7
	1RSL	29.21	2.74	27.75	3.5	17.52	3.54	11.3
	2RSL	30.21	2.48	27.26	4.37	19.49	3.87	10.6
	1RSLA	28.71	2.24	28.23	3.97	16.93	4.31	11.4

7 dienas	2RSLA	27.31	3.7	28.21	4.31	18.29	4.03	9.8
	ISL	28.21	3.68	28.24	4.07	18.29	4.19	10.1
	ISLA	28.05	3.75	27.79	4.46	17.75	3.71	10.7
	CSLA	28.95	2.29	27.34	3.8	17.63	3.67	11.3
	C1RSL	27.83	3.11	27.3	4.22	19.81	3.49	9.2
	C2RSL	27.31	3.67	25.8	4.29	16.37	3.43	12.6
	C1RSLA	28.78	3.76	27.86	4.07	17.11	4.04	11.4
	C2RSLA	26.6	4.58	26.3	4.05	15.66	3.42	12.8

Mazākās kopējās krāsu izmaiņas Δ E∗ 9.1 bija pēc otrās apstrādes veida C1RA un C2RA paraugiem pēc piecu dienu uzglabāšanas, bet lielākās Δ E∗ 13.8 A parauga zemenēm par biopolimēru apstrādi. Zemeņu virsmas krāsojuma mazākās L* vērtības izmaiņas bija K paraugam 11.8% pēc piecu dienu uzglabāšanas (2.tabula).

2.tabula

Zemeņu virsmas krāsu rādītāju L* a* procentuālās izmaiņas (%) uzglabāšanas laikā

Rādītāji	Paraugi												
	K	A	1R	2R	1RA	2RA	I	IA	CA	C1R	C2R	C1RA	C2RA
L*	11.8	13.6	17.4	18.4	17.0	17.3	16.7	14.5	22.3	15.0	14.5	21.9	22.7
a*	21.3	26.9	15.8	19.4	22.4	15.4	11.7	15.8	14.3	16.0	20.9	9.1	9.5

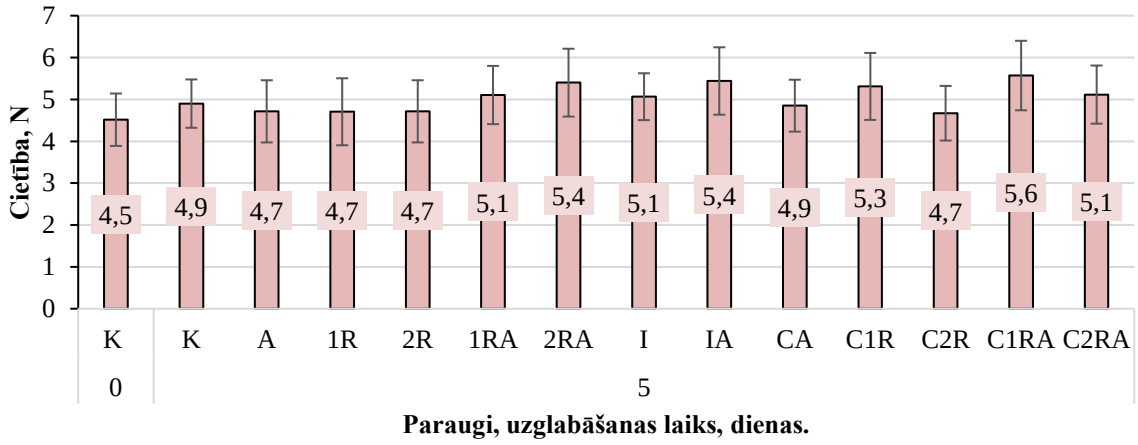
Pēc Shelf life krāsu rādītāju datu novērtējuma, pēc vienas nedēļas uzglabāšanas dzesētavā, redzams, ka mazākās L* vērtības izmaiņas bija 2RSLA un C2RSL zemeņu paraugiem11.9%. Savukārt zemeņu virsmas sarkanā krāsojuma-a* vērtības mazākās izmaiņas bija paraugiem 1RSLA un ISL 13,1% (3.tabula).

3. tabula

Zemeņu virsmas krāsu rādītāju L* a* procentuālās izmaiņas (%) uzglabāšanas laikā

Rādītāji	Paraugi												
	K SL	SLA	1R SL	2R SL	1R SLA	2R SLA	ISL	I SLA	C SLA	C1R SL	C2R SL	C1R SLA	C2R SLA
L*	14.2	14.4	19.7	23.7	17.6	11.9	15.6	14.9	18.6	14.0	11.9	17.9	8.9
a*	20.7	17.6	14.6	16.1	13.1	13.2	13.1	14.5	15.9	16.0	20.6	14.2	19.1

Pētījuma laikā iegūtie zemeņu cietības testēšanas rezultāti apkopoti un attēloti 1.attēlā. Zemeņu cietība K paraugam pētījuma sākumā bija 4,5N, bet pēc piecām uzglabāšanas dienām samazinājās līdz 4,2N, bet pēc apstrādes tā zemenēm nedaudz palielinājās. Zemeņu cietība būtiski nemainījās pēc piecu dienu uzglabāšanas.



1. Attēls Cietības izmaiņas pēc piecu dienu uzglabāšanas

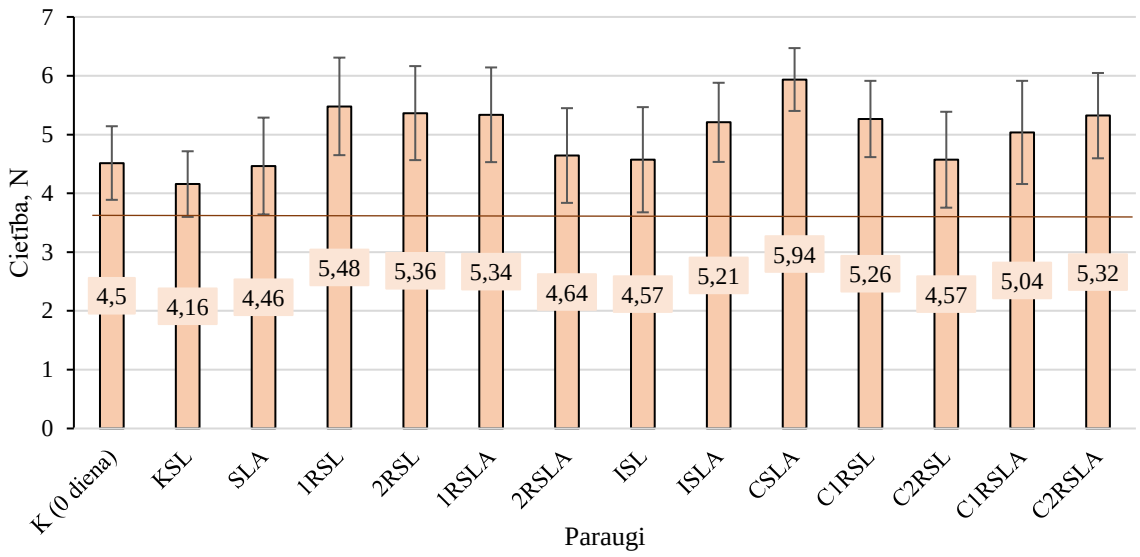
Izvērtējot iegūtos rezultātus, vērojama cietības palielināšanās tendence ar biopolimēriem apstrādātajiem zemeņu paraugiem. Tā palielinājās paraugiem A,1R,2R attiecīgi par 4%, bet paraugiem 1RA, 2RA līdz 20%. Savukārt zemeņu ogām ar otra veida biopolimēru apstrādi cietība palielinājās paraugiem CA, C1R, C1RA, C2RA no 3-23% salīdzinājumā ar K paraugu. Cietības procentuālās izmaiņas pēc piecu dienu un SHELF LIFE uzglabāšanas apkopotas 4. tabulā.

4.tabula

Cietības procentuālās izmaiņas uzglabāšanas laikā

Nr.p.k	Paraugi pēc 5 dienām	Izmaiņas, %	Paraugi pēc 7 dienām	Izmaiņas, %
1	K	8.5	KSL	-7.9
2	A	4.4	SLA	-1.1
3	1R	4.2	1RSL	21.3
4	2R	4.4	2RSL	18.8
5	1RA	13.1	1RSLA	18.2
6	2RA	19.6	2RSLA	2.8
7	I	12.2	ISL	1.2
8	IA	20.5	ISLA	15.3
9	CA	7.4	CSLA	31.5
10	C1R	17.6	C1RSL	16.6
11	C2R	3.4	C2RSL	1.2
12	C1RA	23.4	C1RSLA	11.5
13	C2RA	13.3	C2RSLA	17.9

Zemeņu cietības testēšanas rezultāti pēc septiņu dienu uzglabāšanas SHELF LIFE apstākļos redzami 2.attēlā. KSL paraugam cietība (4.16 N) nedaudz samazinājusies par 8%, salīdzinājumā pētījuma sākumu (0 dienu K 4.5N). Savukārt paraugam ar otru CSLA cietība bija 5.94N, tā paaugstinājusies būtiski.



2. attēls Cietības izmaiņas pēc SHELF LIFE septiņu dienu uzglabāšanas

Pēc septiņu dienu uzglabāšanas cietība būtiski palielinājās zemenēm pēc abām biopolimēru apstrādēm. Pēc pirmās apstrādes paraugiem: 1RSL, 2RSL, 1RSLA, 2RSLA un ISLA cietība uzglabāšanas SHELF LIFE laikā palielinājās no 3 līdz 21%, pēc otrās apstrādes paraugiem CSLA, C1RSL, C1RSLA un C2RSLA cietība palielinājās no 12 -31%.

Pētījuma laikā pēc piecām un septiņām dienām tika analizēti zemeņu mitruma zudumi, iegūtie rezultāti apkopti 5. tabulā.

5.tabula

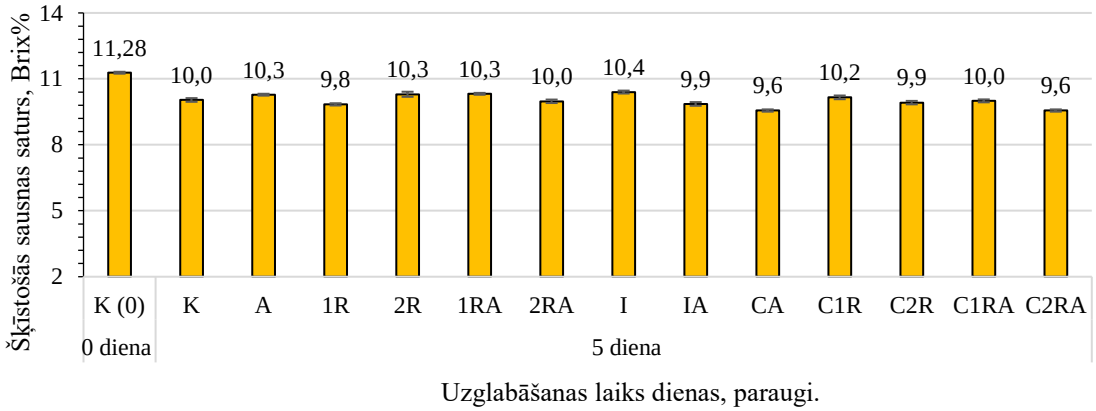
Masas (mitruma) zudumi

Uzglabāšanas laiks 5 dienas			Uzglabāšanas laiks SHELF LIFE 7 dienas		
Paraugs	%	STDEV	Paraugs	%	STDEV
K	2.48	0.14	KSL	3.69	0.54
A	3.47	0.84	KSLA	4.01	0.28
1R	2.77	0.20	1RSL	4.39	0.42
2R	2.77	0.38	2RSL	3.63	0.44
1RA	2.70	0.34	1RSLA	4.44	0.25
2RA	**1.71**	0.82	2RSLA	3.98	0.54
I	2.85	0.16	ISL	3.39	0.02
IA	2.38	0.16	ISLA	3.46	0.09
CA	2.39	0.20	CSLA	**3.32**	0.07
C1R	3.05	0.42	C1RSL	4.22	0.21
C1RA	2.54	0.17	C1RSLA	3.58	0.44
C2R	2.69	0.07	C2RSL	4.08	0.30
C2RA	2.66	0.18	C2RSLA	3.89	0.39

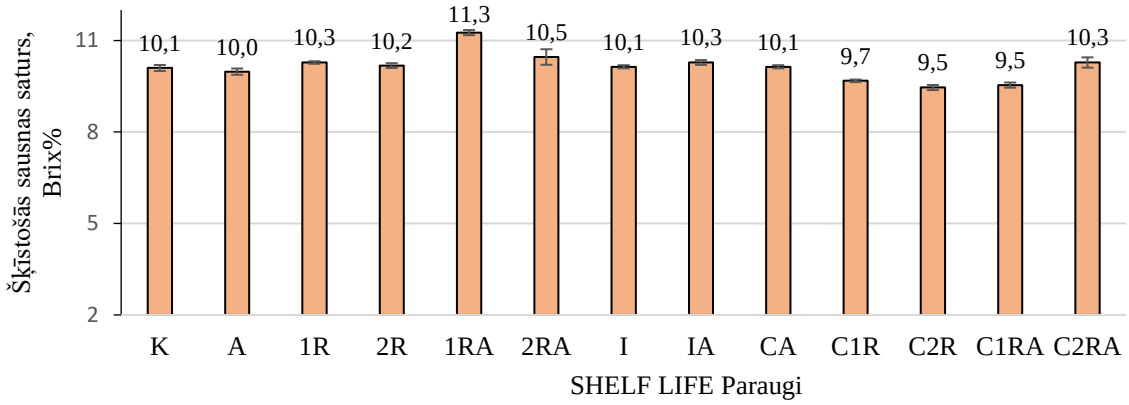
Mazākie mitruma zudumi pēc uzglabāšanas piecām dienām bija 2RA zemenēm 1,71%, bet lielākie mitruma zudumi A paraugam 3,47%. Izvērtējot mitruma zudumus, redzams, ka salīdzinoši mazākie zudumi bijuši paraugiem ar ieliktņiem ISL un ISLA. Pēc SELF LIFE uzglabāšanas mitruma zudumi starp abām apstrādēm bija līdzīgi. Pēc otrā apstrādes veida nedaudz mazāki no 3.32% līdz 4.22%, bet pēc biopolimēru apstrādes no 3.39% līdz 4.44% .

Šķīstošas sausnas saturs zemenēm pētījuma laikā nedaudz mainījās, kas varētu būt saistīts ar ogu elpošanu. Šķīstošas sausnas saturs pēc piecām uzglabāšanas dienām samazinājās visos paraugos (3.attēls).

3. attēls Šķīstošās sausnas saturs zemeņu paraugos

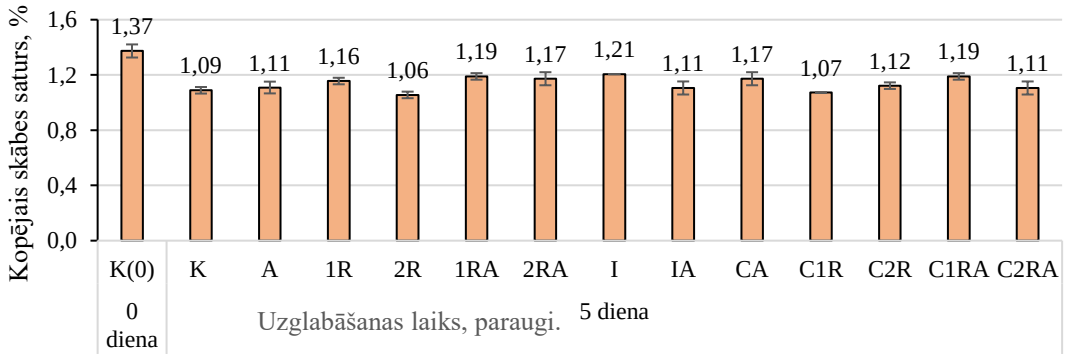


K paraugam šķīstošās sausnas saturs samazinājās par 11%, pēc pirmās biopolimēru apstrādes par 11,2%, bet pēc otrās apstrādes (C) vidēji par 14,5%. Pēc SHELFE LIFE uzglabāšanas šķīstošās sausnas saturs samazinājās vidēji par 10,2% (4.attēls).



4. attēls Šķīstošās sausnas saturs zemeņu paraugos

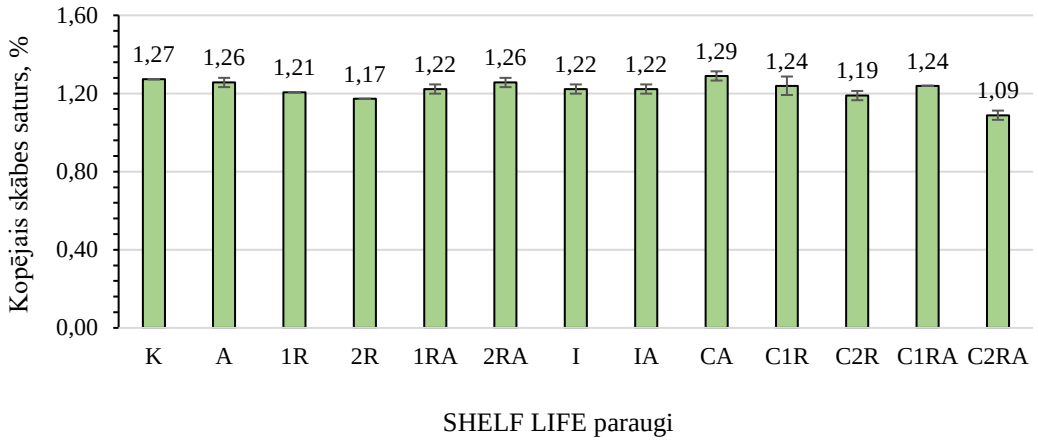
Zemeņu paraugu kopējās skābes satura testēšanas rezultāti apkopoti 5 un 6.attēlā. Pēc piecu dienu uzglabāšanas kopējās skābes saturs zemenēs K bija samazinājies attiecīgi par 21% (5. attēls).



5. attēls Kopējā skābes satura izmaiņas zemeņu paraugos

Pēc pirmā biopolimēru veida apstrādes mazākais kopējās skābes satura samazinājums bija konstatēts zemeņu paraugos I, 1RA un 2RA (attiecīgi 12%;13% un 15%). Pēc otrā apstrādes veida skābes samazinājums uzglabāšanas laikā zemeņu

paraugos C1RA un CA bija līdzīgs (attiecīgi 13 un 15%). Izvērtējot SHELF LIFE paraugus redzams, ka kopējās skābes satura izmaiņas – samazinājums mainīgs (6.attēls).



6. attēls Kopējais skābes saturs SHEL LIFE zemeņu paraugos

Kopējā skābes satura neviendabīgās izmaiņas starp paraugiem varēja izraisīt arī ogu lielums un gatavības pakāpe. Pēc pirmās biopolimēru apstrādes mazākais skābes samazinājums bija I un IA paraugiem ar ieliktņiem (11%).Savukārt pēc otra veida apstrādes skābes samazinājums bija nedaudz mazāks zemenēm paraugiem, kuri bija apstrādāti CA un C1RA (6,1 un 9,7). Lielākais kopējās skābes samazinājums zemenēm konstatēts pēc otrā apstrādes veida paraugam C2RA (20%).

Antocianīnu satura daudzums starp paraugiem pēc piecu dienu uzglabāšanas ir atšķirīgs, kas skaidrojams ar zemeņu ogu lielumu un arī gatavības pakāpi (6.tabula).

6. tabula.

Antocianīnu saturs un izmaiņas zemenēs pētījuma laikā

	Uzglabāšanas laiks, 5 dienas			Uzglabāšanas laiks, 7 dienas (SHELF LIFE)		
	Antocianīnu saturs, mg/100g		Izmaiņas	Antocianīnu saturs, mg/100g		Izmaiņas
Paraugi	VID	STDEV	%	VID	STDEV	%
K (0)	34.95	0.69				
Kontrole	**35.56**	0.32	-1.75	33.02	0.78	5.5
A	32.64	0.45	6.5	31.86	1.32	8.9
1R	31.94	1.51	9.2	32.15	0.71	8.0
2R	29.03	0.24	18.5	34.25	2.25	2.0
1RA	27.97	0.06	24.1	27.58	0.35	21.1
2RA	27.19	1.08	27.8	34.50	0.96	1.3
I	32.53	1.14	8.9	38.65	1.56	-10.6
IA	26.93	0.34	24.7	27.81	1.09	20.4
CA	27.77	1.56	26.7	32.29	0.22	7.6
C1R	34.18	1.39	2.8	35.45	3.19	-1.4
C2R	34.12	2.04	2.4	36.07	1.78	-3.2
C1RA	28.05	1.51	20.2	30.88	5.46	11.6
C2RA	29.92	2.11	17.9	30.53	1.13	12.7

Pēc piecu dienu uzglabāšanas antocianīnu saturs K zemenēm nedaudz palielinājās (1,8%), bet zemeņu paraugos pēc biopolimēru apstrādes samazinājās. Vismazākais samazinājums bija ar otro apstrādi C2R un C1R (2.4 attiecīgi un 2.8 %).

Mazākais antocianīnu samazinājums ar pirmo biopolimēru apstrādi bija paraugiem A (6.5%), ar ieliktni I (8,9%) un 1R (9.2%). Pēc SHELF LIFE - pēc septiņu dienu uzglabāšanas mazākās antocianīnu satura izmaiņas bija pēc pirmās biopolimēru apstrādes paraugiem 2RA un 2R (attiecīgi 1.3% un 2.0%), bet pēc otrās apstrādes nedaudz lielākas paraugiem C1R un C2R (attiecīgi 1.4 un 3.2%).

Kopējo fenolu saturs un tā izmaiņas, zemenēs pēc abām apstrādēm pētījuma laikā apkopotas un šie rezultāti redzami 7. tabulā.

7.tabula

Kopējais fenolu saturs un izmaiņas zemenēs pētījuma laikā

Paraugi	Uzglabāšanas laiks, 5 dienas		Izmaiņas	Uzglabāšanas laiks, 7 dienas (SHEL LIFE)		Izmaiņas
	Kopējo fenolu saturs, GAE mg/100g			Kopējo fenolu saturs, GAE mg/100g		
	VID	STDEV	%	VID	STDEV	%
K (0 diena)	256.7	3.2				
K	310.8	17.1	17.4	321.7	22.8	20.2
A	338.6	3.1	24.2	312.1	8.8	17.8
1R	356.8	2.9	28.1	315.8	14.0	18.7
2R	330.8	7.3	22.4	306.4	20.0	16.2
1RA	366.9	24.6	30.0	342.1	1.7	25.0
2RA	369.8	1.9	30.6	333.9	20.1	23.1
I	377.9	5.8	32.1	313.3	23.7	18.1
IA	340.4	3.2	24.6	275.0	8.0	6.7
CA	343.7	23.1	25.3	337.9	27.9	24.0
C1R	319.1	12.1	19.6	315.4	16.4	18.6
C2R	323.7	3.6	20.7	348.3	27.0	26.3
C1RA	337.5	4.1	23.9	327.0	0.6	21.5
C2RA	339.3	12.2	24.3	284.6	30.1	9.8

Kopējais fenolu saturs pēc piecu dienu uzglabāšanas paaugstinājās visos zemeņu paraugos. K paraugā kopējais fenolu saturs palielinājās par 17.4%. Paraugiem ar biopolimēru apstrādi kopējo fenolu palielinājums bija robežās no 24.4% (2R paraugam) līdz 30.6% (I paraugam). Paraugiem ar otro apstrādi palielinājums no 19.6% (C1R) līdz 25.3% (CA). Pēc SHELF LIFE uzglabāšanas 7 dienām kopējā fenolu satura mazākās izmaiņas salīdzinājumā ar K (0 dienu) bija IA paraugam (6.7%) ar biopolimēru apstrādi, bet lielākās C2R (26.3%) pēc otrās apstrādes.

Pētījuma sākumā un pēc piecām uzglabāšanas dienām viesiem zemeņu paraugiem veikta sensorā vērtēšana. Zemeņu paraugu sensorā vērtēšanas rezultāti pēc līnijskalas apkopoti 8.tabulā.

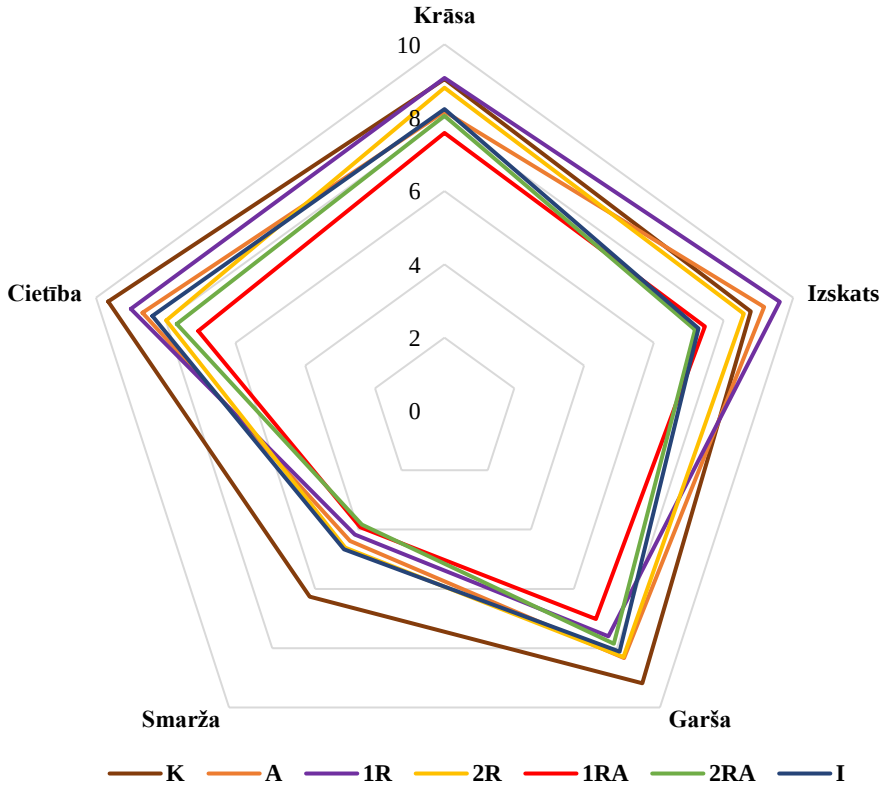
8.tabula

Zemeņu sensoro īpašību intensitātes novērtējums

Laiks	Paraugs	Krāsa		Izskats		Garša		Smarža		Cietība	
		Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.	Vid.	Stdev.
0 diena	K (O)	9.1	0.5	9.5	0.5	8.2	0.5	5.8	0.6	9.2	0.6
5 diena	K	**9.1**	0.6	8.8	0.6	**9.2**	0.6	**6.3**	0.5	**9.7**	0.6
	A	8.2	0.7	9.2	0.6	8.3	0.6	4.4	0.5	8.7	0.5
	1R	**9.1**	0.5	**9.6**	0.6	7.6	0.5	4.2	0.5	**9.0**	0.5

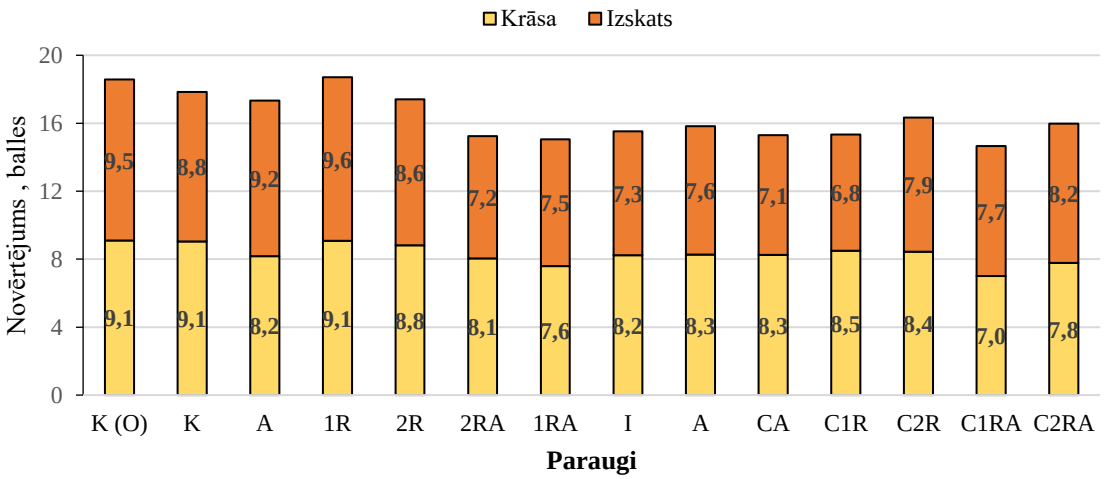
	2R	8.8	0.7	8.6	0.6	8.3	0.6	4.6	0.5	8.0	0.5
	2RA	8.1	0.5	7.2	0.5	7.9	0.5	3.8	0.4	7.7	0.5
	1RA	7.6	0.4	7.5	0.4	7.0	0.6	3.9	0.5	7.1	0.3
	I	8.2	0.6	7.3	0.4	8.1	0.5	4.7	0.4	8.4	0.5
	A	8.3	0.6	7.6	0.5	7.9	0.5	**5.3**	0.3	7.7	0.5
	CA	8.3	0.6	7.1	0.4	8.4	0.6	4.7	0.5	**9.0**	0.5
	C1R	8.5	0.7	6.8	0.5	**8.9**	0.7	3.8	0.2	8.1	0.5
	C2R	8.4	0.5	7.9	0.5	8.4	0.5	4.6	0.4	8.5	0.5
	C1RA	7.0	0.5	7.7	0.5	7.3	0.6	5.0	0.3	8.0	0.4
	C2RA	7.8	0.6	8.2	0.6	7.2	0.4	4.9	0.4	8.1	0.4

Pēc sensorās vērtēšanas rezultātiem pēc **krāsas, izskata** redzams, ka pēc uzglabāšanas piecām dienām vērtētājiem vislabāk paticis zemeņu paraugs 1R, bet zemāk novērtēti zemeņu paraugi pēc otrā apstrādes veida C1RA un C1R. Savukārt pēc **garšas** labāk paticis K paraugs (7.attēls).



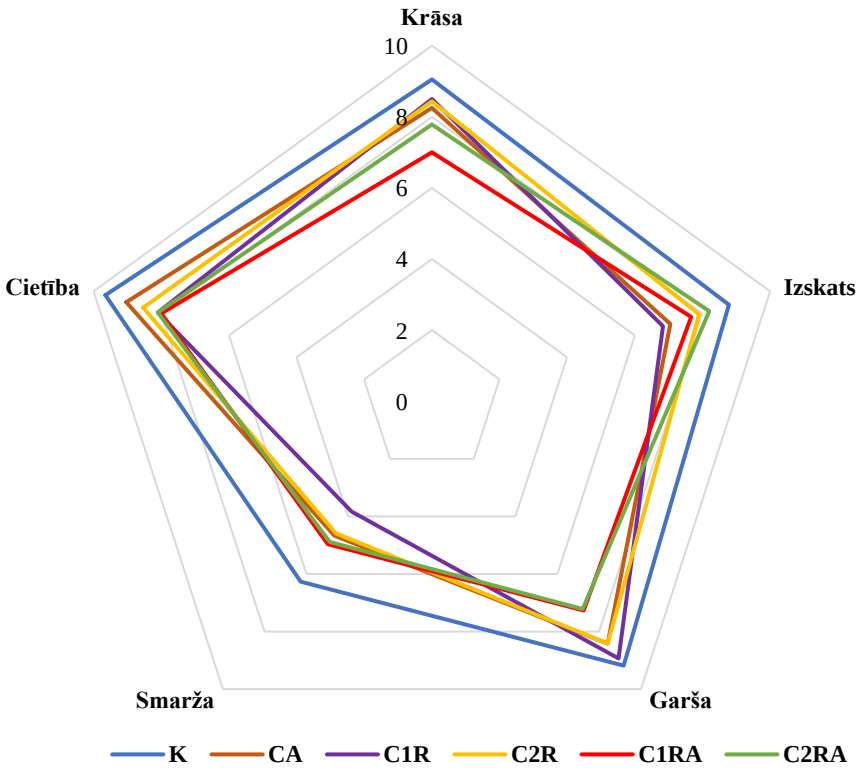
7.attēls Līnijskalas sensorais novērtējums pēc biopolimēru apstrādes

Līnijskalas sensorā novērtējuma parametru krāsas un izskata rezultātus apkopojums attēlots 8.attēlā. Izvērtējot apstrādes efektivitāti, pēc novērtējuma datiem redzams, ka vērtētājiem pēc krāsas un izskata vislabāk patikuši paraugi pēc pirmās apstrādes (ar biopolimēriem) 1R un 2R. No otrā apstrādes veida pēc rezultātiem redzams, ka labāk paticis C2R paraugs.



8.attēls Zemeņu paraugu krāsa un izskata sensorais novērtējums

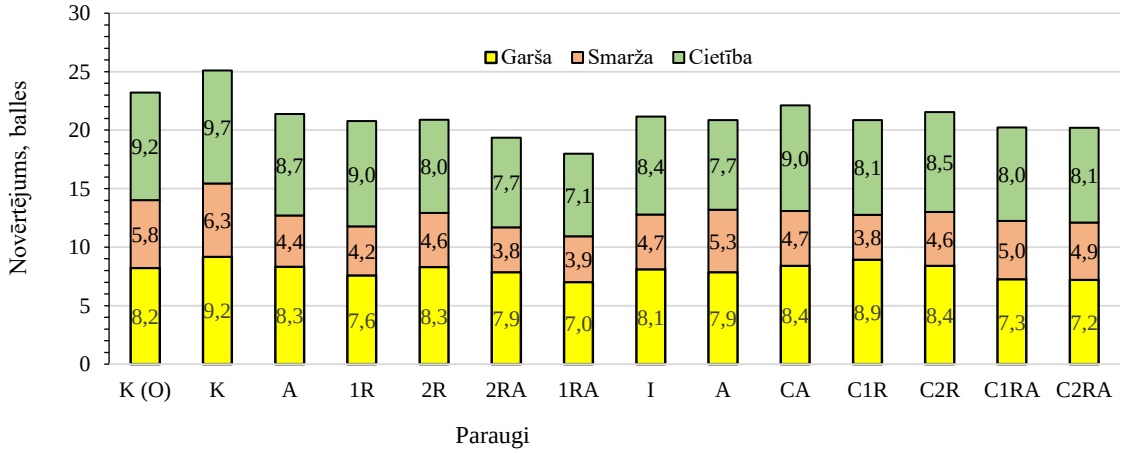
Izvērtējot zemeņu garšas rezultātus par apstrādēm, redzams, ka augstākais novērtējums pēc K parauga bija otrās apstrādes C1R (8,9) paraugam (9.attēls), kuram bija vis nearomātiskās, mazākais smaržas novērtējums (3.8). Izvērtējot šos rezultātus, var secināt, ka tomēr ir manāma biopolimēru apstrādes ietekme.



9.attēls Līnijskalas sensorais novērtējums pēc otrā apstrādes veida

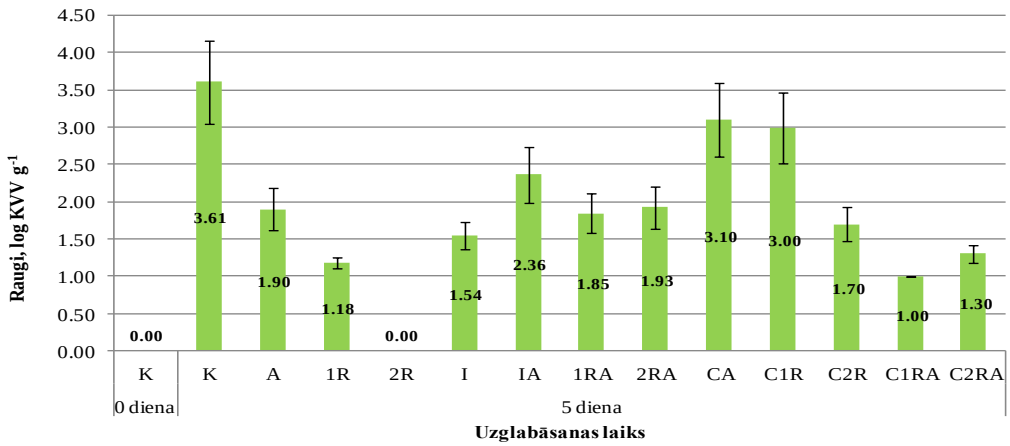
Kā redzams pēc cietības novērtējuma, vērtētāji K parauga - neapstrādātās zemenes atzinuši kā cietākās, novērtējums 9.7, bet abām apstrādēm novērtējums 9.0 paraugiem 1R un CA. Mīkstākās zemenes - zemākais cietības novērtējums pēc pirmās biopolimēru apstrādes 1RA paraugam. 10. attēlā redzams, pirmās un otrās zemeņu paraugu apstrādes, garšas, smaržas un cietības sensorā novērtējuma datu apkopojums.

10. attēls Garšas, smaržas un cietības sensorais novērtējums pēc abiem apstrādes veidiem



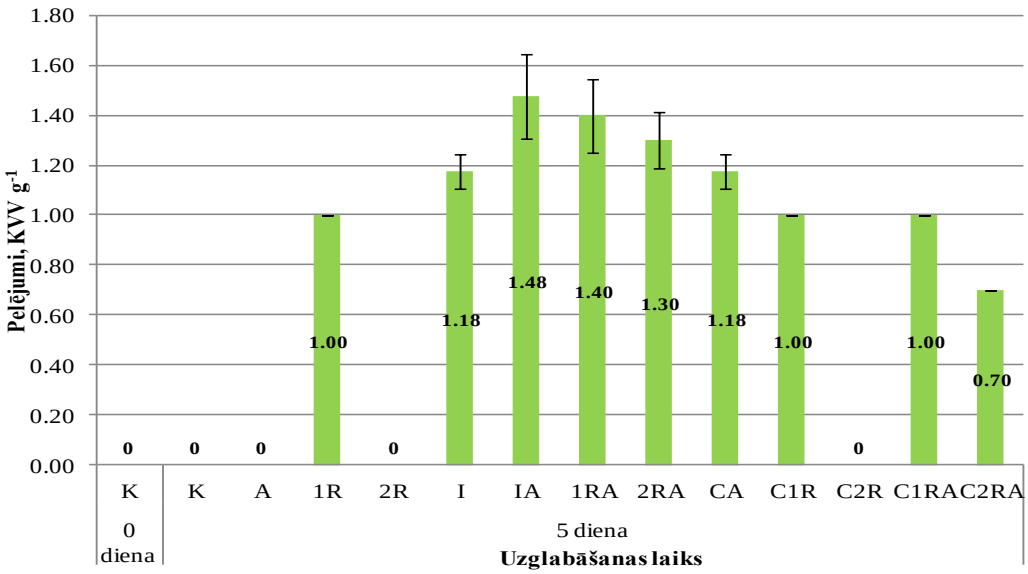
Garšas, smaržas un cietības sensorais novērtējums pēc piecu dienu uzglabāšanas K paraugam bija augstāks nekā K (0). Salīdzinot abus zemeņu apstrādes veidus redzams, ka otrās apstrādes paraugs CA novērtēts augstāk pēc visiem trim parametriem. Otrs augstāk novērtētais paraugs bija arī no otrās apstrādes C2R, kas novērtēts augstāk pēc garšas un smaržas.

Izvērtējot raugu kopskaitu zemeņu paraugos redzams, ka pirms uzglabāšanas raugu klātbūtne netika konstatēta (11. att.). Pēc piecām uzglabāšanas dienām raugu kopskaits kontroles variantā būtiski paaugstinājās, kas liecina par ogu kvalitātes pasliktināšanos un bojāšanās procesa sākumu. Ogu apstrāde ar biopolimēriem un uzglabāšana biopolimēru plēvē palēnināja raugu attīstību. Efektīvāka ogu uzglabāšana bija biopolimēru plēvē 2. receptūra (ar receptūras sastāvdaļām var iepazīties protokolā: 'Jaunizveidotā iepakošanas kompozītmateriālu prototipa receptūra, pielietojot EPS'). Būtiski neietekmēja raugu kopskaita attīstību apstrāde ar biocelulozi (CA), un uzglabāšanu ar biocelulozes ieliktni.



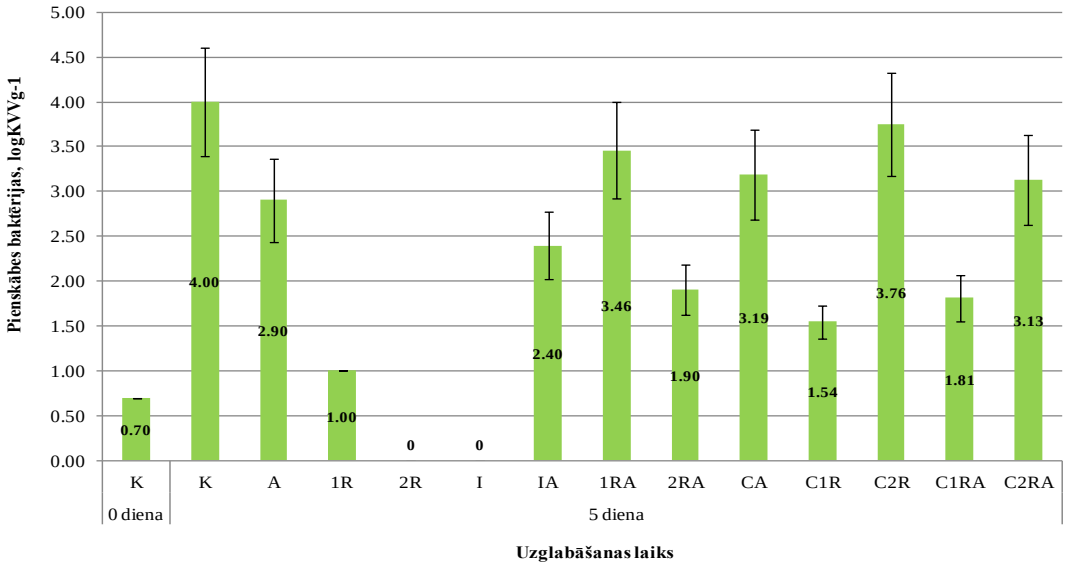
11.att. Raugu kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā (2022. pētījuma gadā)

Analizējot pelējuma kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā, var redzēt, ka to skaits palielinājās paraugiem IA,1RA, 2RA, 1R, CA, C1R, C1RA, C2RA (12. att.). Visticamāk, ka tas saistīts ar, sekundāru paraugu piesārņošanos uzglabāšanas laikā.



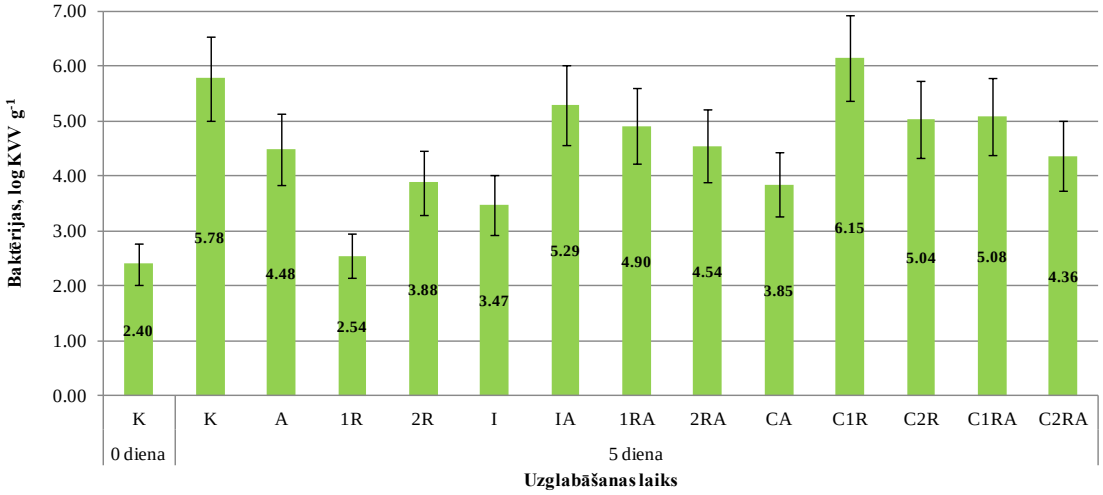
12.att. Pelējumu kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā (2022. pētījuma gadā)

Viens no rādītājiem, kas liecina par produkta bojāšanās procesa sākumu, ir pienskābes baktēriju pieaugums (tas attiecas tikai uz produktiem kuriem pienskābes baktērijas nav raksturīga produkta mikroflora). Kā var redzēt (13. att.) uzglabāšanas laikā pienskābes baktēriju kopskaits būtiski pieauga kontroles variantā. Uzglabāšanas 2R un I bija nelabvēlīga vide pienskābes baktēriju attīstībai. Pārsvarā pētītie uzglabāšanas veidi būtiski nomāca pienskābes baktēriju attīstību, izņēmums bija paraugi 1RA, CA, C2R,C2RA (13. att.), kuri pienskābes baktēriju attīstību būtiski nomāca.



13.att. Pienskābes baktēriju kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā (2022. pētījuma gadā)

Analizējot baktēriju kopskaita pieaugumu uzglabāšanas laikā (14. att.) noteikts, ka nebūtiski baktēriju skaits palielinājās paraugam 1R. Tas liecina, ka receptūra numur 1. palēnina baktēriju attīstību. Citi analizētie paraugi nedaudz palēnināja baktēriju kopskaita attīstību salīdzinoši ar kontroles variantu. Paraugā C1R (14. att.) baktēriju skaits palielinājās nebūtiski, bet tas tomēr bija lielāks salīdzinoši ar kontroles variantu.



14.att. Baktēriju kopskaita izmaiņas zemenēm uzglabāšanas laikā (2022. pētījuma gadā)

Izvērtējot trīs gadu zemeņu uzglabāšanas laikā analizētos datus (fizikāli – ķīmiskos, sensoros, mikrobioloģiskos) konstatēts, ka ir novērota tendence ar pārklājumu un/vai plēvi uzglabāto ogu derīguma termiņa paildzināšanai. Turklāt fizikāli-ķīmiskie, sensorie radītāji bija augstāki apstrādes variantam salīdzinoši ar kontroles paraugiem. Arī mikrobioloģiskie radītāji kopumā bija sliktāki pēc uzglabāšanas kontroles variantam salīdzinoši ar apstrādātiem un/vai plēvē uzglabātiem paraugiem. Līdz ar to ir pieradīta biopolimēra efektivitāte ogu derīguma termina pagarināšanai. Bet nav pieradīta biopolimēra rentabilitāte pielietojot to, kā ogu derīguma termiņa pagarināšanas iespēju (metodi).

KOMPOZĪTMATERIĀLI NO KARTUPEĻU CIETES UN BAKTERIĀLĀS CELULOZES

Darba atskaite par pavasari

I. Teorētiskais apskats

1.1. Bakteriālā celuloze (BC) un tās izmantošana

No naftas iegūtie polimēri (polietilēns, polipropilēns, polistirols u.c.) kļuva par nopietnu piesārņojuma avotu, jo tie praktiski nenoārdās dabā. Šī iemesla dēļ pēdējā laikā meklē netoksiskus un bionoārdāmus aizstājējus. Viens no šādiem alternatīviem materiāliem ir bakteriālā celuloze (BC). Atšķirībā no augu celulozes, BC ir labākas mehāniskās īpašības (augstāks kristāliskums, izturība, ūdens aizturēšana utt.) un augstāka tīrība (piemēram, nav lignīna un hemicelulozes). Taču tīras BC plēves pašlaik ir ļoti dārgas, jo baktēriju kultivēšana (*Gluconacetobacter, Komagataeibacter* u.c.) prasa sterilus apstākļus. Tāpēc BC visbiežāk izmanto kā kompozītmateriālu sastāvdaļu kopā ar lētiem biopolimēriem (kartupeļu vai kukurūzas ciete, dekstrāns, ksantāns utt.) un plastifikatoriem (sorbīts, glicerīns), lai iegūtu ļoti izturīgas plēves pārtikas iepakošanai [1]. Taču veiksmīga plēve prasa precīzu sastāvdaļu attiecību un noteiktu pagatavošanas procedūru. Tā kā viens no lētākajiem biopolimēriem Latvijā ir kartupeļu ciete, tā kļuva par galveno kompozītu sastāvdaļu.

1.2. Bionoārdāmi pārklājumi, to ražošana un izmantošana

Pārklājumi no ēdamiem biopolimēriem ir lēts veids svaigu augļu derīguma termiņa pagarināšanai: šī tehnoloģija ļauj aizvietot energoietilpīgu saldēšanu vai nobriešanas inhibitoru izmantošanu. Piemēram, banāni ar cietes un karagināna pārklājumu nesabojājas 12 dienu laikā (kontrole sāk bojāties pēc 6 dienām). Cietes pārklājumi palēlina etilēna biosintēzi (kas izraisa augļa nobriešanu), samazina gaisa apmaiņu ar vidi un masas zudumus iztvaikošanas dēļ. Pārklātu banānu uzglabāšanas termiņš vidēji palielinās par 40% lēnākas nobriešanas dēļ, par ko liecina izteikta cietība, augstāks hlorofila saturs un zemāks glikozes saturs. Pēc ārējā izskata pārklāti banāni praktiski neatšķiras no kontroles: novēroja identisku krāsojumu un atspīdumu. Rezultātā nesamazinās pārklāto banānu pievilcīgums pircējiem. Pārklājums novērš mizas plaisu rašanos, kas arī izskaidro lenāku augļu bojāšanos [2].

Vairākkārtēja augļu pārklāšana labāk samazina masas zudumus. Piemēram, trīs pārklājuma slāņi palielina plūmju ādas mitrumu par 20% (viens slānis — par 11%). Arī atklāja, ka sūkalu proteīni uzlabo pārklājumu kvalitāti. Cietes pārklājums samazina ūdens apmaiņu uz 60%, bet cietes-sūkalu proteīnu pārklājums — uz 75% (salīdzinājuma ar kontroli). Var secināt, ka pārklājumi no ēdamiem biopolimēriem ir lēts, efektīvs un videi draudzīgs risinājums, kas ļauj aizvietot plastmasas plēves [3].

Ēdamus pārklājumus var arī izmantot kā lētu piedevu nesēju: sastāvam var pievienot vitamīnus, antioksidantus, plastifikatorus, virsmas aktīvos līdzekļus, kā arī netoksiskus antibakteriālus un pretsēnīšu līdzekļus. Pārklājumus visbiežāk ražo no cietes, tāpēc ka šis bezkrāsains polisaharīds ir ļoti izplatīts ar piemērotām mehāniskām īpašībām, tam arī nav specifiskas garšas vai smaržas. Cietei piemīt arī izteiktas skābekļa barjera īpašības. Izplatītākie cietes avoti ir kukurūza (65% no pasaulē saražotas cietes), kartupeļi (13%) un kasava (11%). Lielākais cietes trūkums ir hidrofilitāte, ko parasti risina, pievienojot hidrofobas piedevas (piemēram, oleīnskābe, šelaka, lipīdi utt.). Taču jāatceras, ka pārklājums arī nedrīkst būt pārāk hidrofobs, jo pretējā gadījumā nebūs iespējams vienmērīgi pārklāt augļus vai dārzeņus. [4, 10.3390/coatings8050152].

Tween 80 ievērojami samazina virsmas spraiguma koeficientu, kas atvieglo pārklāšanu. Sorbitols un glicerīns ir ļoti izplatīti un lēti plastifikatori, kuri novērš plaisu veidošanos pārklājumā. Cieti lipīdi uzlabo pārklājuma pretestību pret ūdens iedarbību un samazina gāzu un ūdens tvaiku apmaiņu. Cietes kristāliskums (jeb nesazarotas amilozes saturs) arī ietekmē pārklājuma īpašības. Ļoti kristāliska ciete veido blīvāku pārklājumu, kas labāk ierobežo gāzu apmaiņu. Novēroja, ka vislabākos rezultātus dod pārklājumi, kuros cietes masas daļa ir mazāka nekā 5%. Plastifikatora daudzums ir tieši atkarīgs no cietes un

citu piedevu daudzuma: jo vairāk ir citu sastāvdaļu, jo vairāk pievieno plastifikatora. Glicerīna vai sorbitola daudzums parasti ir robežās no 0,6% līdz 25%. [4].

Sēnīšu izplatība augļos un dārzeņos ir svarīga problēma, jo apdraud cilvēku veselību. Ēdamiem pārklājumiem var pievienot mikotoksīnus un konservantus: benzoātus, sorbātus, karbonātus, parabēnus. Pastāv arī dabīgi aizvietotāji: ēteriskās eļļas, augu ekstrakti (mārsila, rozmarīnu, citronu sorgo, kanēļa eļļas, aloe vera utt.) un mikrobu antagonisti (baktērijas un raugi). [4]. Var secināt, ka cietes pārklājumi var kļūt par lētu, efektīvu un elastīgu risinājumu svaigu produktu uzglabāšanai. Galvenais šķērslis ir masveida ražošanas un izsmidzināšanas tehnoloģija, lai apstrādātu tūkstošiem tonnu augļu vai dārzeņu.

1.3. Bionoārdāmas plēves, to ražošana un izmantošana

Atšķirībā no pārklājumiem, plēvēm atšķiras pagatavošanas un uznešanas procedūra: plēves parasti žāvē un tikai tad aptin ražu, kas pēc savas būtības ļoti līdzīgs polietilēna iepakojumiem. Bionoārdāmās plēves var ražot no polisaharīdiem, lipīdiem vai proteīniem ar nelielu plastifikatora daudzumu. Labai plēvei jābūt izturīgai, tievai un viendabīgai, lai nodrošinātu labāko augļu aizsardzību pret ūdens iztvaikošanu un kaitīgiem mikroorganismiem. Tika veiksmīgi izstrādāta "sausā" (ekstrudēšana) un "mitrā" (liešana) plēvju ražošanas procedūra. Laboratorijas apstākļos bieži izmanto liešanu, jo tā ir ļoti lēta un vienkārša metode, taču ūdens izžāvēšana ir ļoti darbietilpīgs posms. Šī iemesla dēļ rūpnieciskā mērogā izmanto ekstrudēšanu, kas spēj saražot plēves ievērojami ātrāk. Taču šī metode ir grūtāka un dārgāka, jo prasa speciālu ekstrudēšanas aparātu (jeb ekstruderi) un vairākus optimizētus apstākļus: ekstrudēšanas ātrums, sildītāja temperatūra, spiediens, ekstrudera uzgaļi un formas utt. Gan liešana, gan ekstrudēšana ļauj iegūt augstas kvalitātes plēves, kuras praktiski neatšķiras pēc savas struktūras un mehāniskās izturības [5].

Ciete nav vienīgais polisaharīds, kas der bionoārdāmo plēvju ražošanai. Bieži izmanto aļģu polisaharīdus: agaru, karaginānu un alginātus. Šiem savienojumiem piemīt laba elastība un barjeru īpašības, un to lineāra struktūra stabilizē plēves, novēršot plaisu veidošanos. Vēl var izmantot augu sveķus (akācija, tara koks, guāra, ksantāna u.c.). Šie sveķi sastāv no hidrofīliem polisaharīdiem (pārsvarā sazarota arabinoze ar nelielu proteīnu daudzumu (~2%). Sveķi ir ļoti leastīgi, taču tiem ir pārāk liela šķīdība ūdenī. Tāpēc šos polisaharīdus visbiežāk izmanto kā piedevu cietei, lai uzlabotu plēves elastību. Citas noderīgas piedevas ir pektīns un celuloze. Pektīni ir anjonu kompleksi, kas sastāv no β-1,4 saistītiem metilētas α-D-galakturonskābes atlikumiem. Pektīniem ir labas mehāniskās īpašības, taču sliktas mitruma barjera īpašības, tāpēc tos iesaka izmantot kā plastifikatorus. Celuloze ir labs plēvju materiāls, jo tai ir labas barjera īpašības gāzēm un ūdenim, izteikta pretestība pret tauku un eļļu iedarbību, elastība. Celulozei nav krāsas, smaržas vai garšas. Celulozes metilēšana paaugstina tās šķīdību ūdenī (augu celuloze slikti šķīst, jo tai ir pārāk daudz starpmolekulāru ūdeņraža saišu, kas traucē saistīties ar ūdeni). Metilceluloze nodrošina labu aizsardzību pret mitrumu, bet hidroksipropilceluloze — zemu gāzu caurlaidību. Cita noderīga plēvju sastāvdaļa ir hitīns, kas pārsvarā sastāv no β-(1-4)-2-amino-D-glikozes. To iegūst no garnelēm, veicot ekstrakciju ar 10% nātrija hidroksīda šķīdumu. Hitosāns ir netoksisks un nealerģisks materiāls, kuram ir izteikta antibakteriāla iedarbība, laba mehāniskā izturība. Tomēr tā lielākais trūkums ir pārāk augsta šķīdība ūdenī [5].

Plēvju liešana prasa cietes karsēšanu ūdenī. Pati ciete ūdenī nešķīst, taču augstā temperatūrā notiek t.s. želatinizācija (cietes granulu nobriešana un kristālisku ķēžu sabrukšana). Iegūto emulsiju ielej formā un izžāvē. Ūdens iztvaikošana izveido jaunu sakārtotu struktūru no amilozes un amilopektīna. Vairāki apstākļi ietekmē plēves kvalitāti un mehāniskās īpašības: emulsijas pH (pārāk skāba vide hidrolizē un izšķīdina ogļhidrātus), žāvēšanas temperatūra un laiks, gaisa mitrums utt. Slikta apstākļu izvēle var radīt trauslas plēves. Polisaharīdu plēvju mehāniskā izturība parasti ir robežās no 15 līdz 70 MPa. Tā kā bionoārdāmās plēves sastāv no polāriem ogļhidrātiem, tie labi traucē nepolāru gāzu pārnesei (O_2 un CO_2). Plēves un pārklājumi ievērojami samazina gāzu pārneses rādītāju (PO_2 un PCO_2, attiecīgi). Piemēram, tomātu PCO_2 ar aizsargplēvi samazinās no 10,7 mL kg^{-1} h^{-1} (kontrole) līdz 2,8 mL kg^{-1} h^{-1} [5].

II. Praktiskie darbi

Kompozītplēvju un pārklājumu sastāvu izstrādes process

Zuluaga et al. veiksmīgi izstrādāja plēvi no kartupeļu cietes un BC uz ūdens pamata: 4% cietes (pēc masas), 1,3% glicerīna, 7,5% BC un 0,2% konservanta (kālija sorbāts) [1]. Kālija sorbāta vietā šajā darbā izmantoja nātrija benzoātu.

Bakteriālās celulozes apstrāde

Bakteriālo celulozi atdala no kultūršķīduma un mazgā tekošā ūdenī līdz neitrālam pH. Tad plēvi ievieto vārglāze, pievieno 0,5-1 L 1% NaOH šķīduma un vāra vienu stundu, lai atdalītu no tās baktērijas. Tad plēvi atkal mazgā tekošā ūdenī līdz neitrālam pH. Plēvi 3 reizes mazgā ar dejonizētu ūdeni un ar šķērēm sagriež nelielos gabalos. Tad BC gabaliņus vienu stundu dezintegrē virtuves blenderī ar nelielu daudzumu ūdens. Iegūto suspensiju centrifugē, atdala no lieka ūdens un tad sterilizē 121 °C. Celulozi uzglabā ledusskapī (4 °C) [6].

Vispārīga plēvju gatavošanas procedūra

Plēvju izveidei izmanto parastu liešanu silikona vai teflona formā. Visus komponentus suspendēja ūdenī un kārtīgi maisīja vismaz 30 minūtes. Tad suspensiju karsēja maisot vismaz 30 minūtes. Izslēdz karsēšanu, kad ciete pilnīgi želatinizējās. Pēc tam maisījumu degazēja vakuumā 30-60 minūtes. Tad maisījumu ielēja formā un žāvēja silikona formā 3 dienas 50 °C temperatūrā. Atšķirībā no Zaluaga raksta, pēc žāvēšanas negaidīja 15 dienas, lai paātrinātu plēvju izmēģināšanas ātrumu: plēves izņēma no krāsns un ļāva tām atdzist līdz istabas temperatūrai. Plēvju kvalitāti novērtēja subjektīvi pēc ārēja izskata.

Pārklājumu sastāvi (norādīta masas daļa)

1. Maisījums A:

- 7,5% desktrāna.
- 20% glicerīna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva bezkrāsainu un ļoti lipīgu sastāvu. Pārāk daudz glicerīna: neder kā pārklājums!

2. Maisījums B:

- 25% sorbitola.
- 3% dekstrāna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva dzeltenīgu pārklājumu. Ļoti lipīgs: neder kā pārklājums.

2.1. Maisījums B1:

- 5% sorbitola.
- 3% dekstrāna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva bezkrāsainu pārklājumu, kas praktiski nav lipīgs. Labi der tālākiem eksperimentiem.

2.2. Maisījums B2:

- 10% sorbitola.
- 3% dekstrāna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva bezkrāsainu maisījumu, kas ir ļoti līdzīgs B1. Diezgan lipīgs.

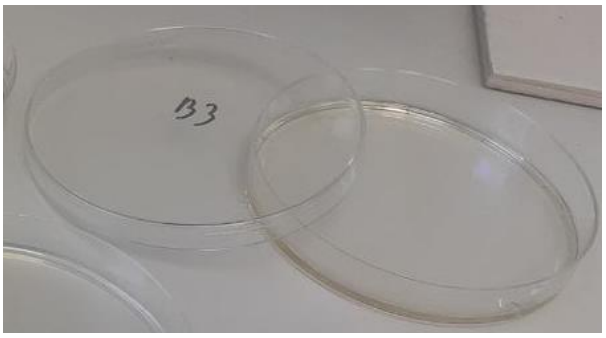
2.3. Maisījums B3:

- 15% sorbitola.

- 3% dekstrāna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva bezkrāsainu maisījumu, kas ir ļoti līdzīgs B1 un B2, bet izteikti lipīgs.



3. Maisījums C:

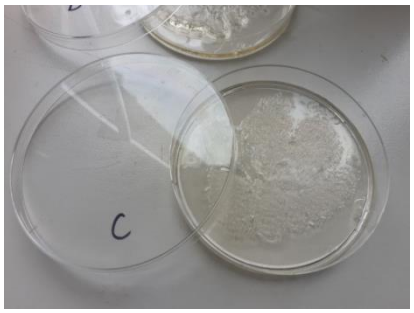
- 3% dekstrāna.

- 20% sorbitola.

- 1,5% BC.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva bezkrāsainu pārklājumu, kas ir mazāk lipīgs nekā B.



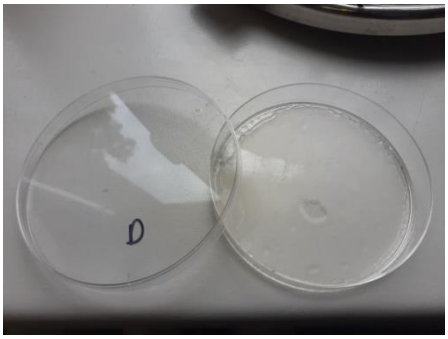
4. Maisījums D:

- 6% BC.

- 2% sorbitola.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva puscaurspīdīgu dzeltenīgu maisījumu, kas praktiski nav lipīgs.



5. Maisījums E:

- 1,5% kartupeļu cietes.
- 0,5% dekstrāna.
- 40% glicerīna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Praktiski identisks maisījumam A: pārāk lipīgs pēc žāvēšanas. Neder.

6. Maisījums F:

- 3,1% kartupeļu cietes.
- 3,3% BC.
- 15% glicerīna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva ļoti lipīgu pārklājuma sastāvu: pārāk liels glicerīna saturs.

Var secināt, ka sastāvi B1 un D labi der kā pārklājumi. Nepieciešams atrast citus optimālus sastāvus un salīdzināt tos savā starpā. Arī nepieciešams izmēģināt piedevas (piemēram, lipīdi, sūkalu proteīni u.c.), lai novērtētu to ietekmi uz pārklājumu īpašībām.

Plēvju sastāvi (norādīta masas daļa)

1. maisījums G:

- 7,5% BC.
- 4% cietes.
- 1,3% glicerīna.
- 0,2% nātrija sufīta (nātrija benzoāts vēl nebija pieejams).

Ieguva dzeltenīgi puscaurspīdīgu elastīgu plēvi.

2. Maisījumi G ar ksantānu (pagatavoja G kā kontroles plēvi)

3.1. Maisījums GX1:

- 4% cietes.
- 1,3% glicerīna.
- 7,5% BC.
- 0,5% ksantāna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva dzeltenu materiālu, kas ir cietāks nekā kontrole. Daudz plaisu.

3.2. Maisījums GX2:

- 4% cietes.
- 1,3% glicerīna.
- 7,5% BC.
- 1% ksantāna
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva dzeltenu cietu materiālu.

3.3. Maisījums GX3:

- 4% cietes.
- 1,3% glicerīna.
- 7,5% BC.
- 2% ksantāna
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva ļoti cietu plēvi, kas plīst pēc locīšanas.

Secinājums: ksantāns slikti der plēvju izstrādei. Plēves ir pārāk cietas.

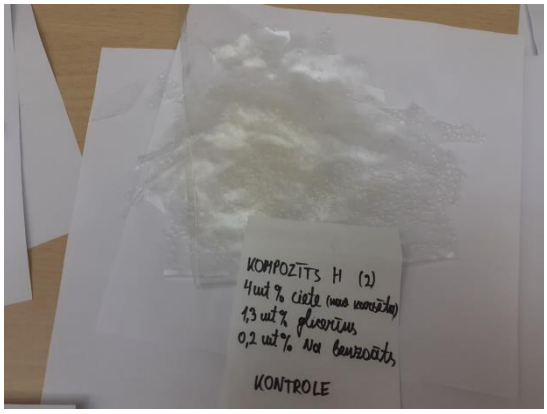
3. Maisījums H (plēves G kontrole bez BC):

- 4% cietes.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija sulfīta.

Ieguva dzeltenīgi puscaurspīdīgu trauslu plēvi. Seko, ka BC būtiski uzlabo elastīgumu.



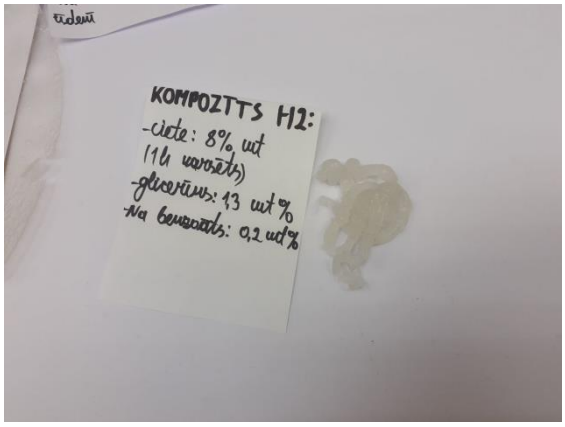
4. Maisījums H2:

- 8% cietes.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva ļoti lipīgu plēvi, kuru nespēja atdalīt no formas: plēve salīp kopā. Jāsamazina cietes saturs.



5. Maisījumi HX un HX2:

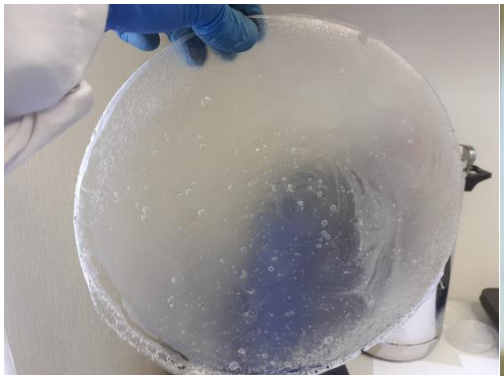
- 4% cietes.

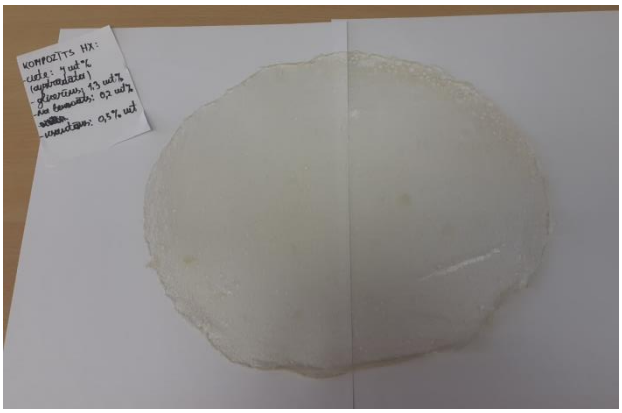
- 0,5% ksantāna.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva dzeltenīgu puscaurspīdīgu plēvi. Elastīga, taču ir nelieli caurumi.





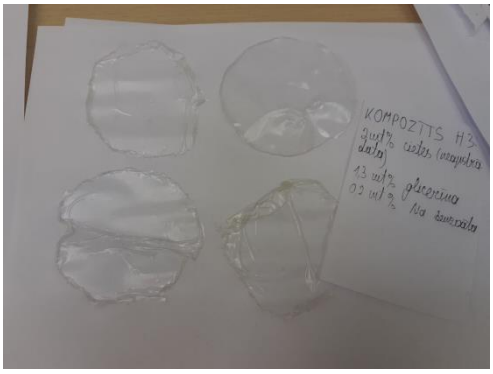
6. Maisījums H3:

- 2% cietes.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

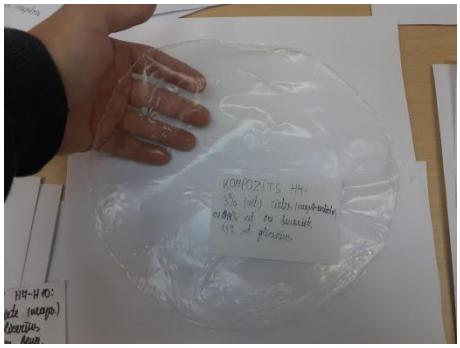
Ieguva plānu caurspīdīgu plēvi. Nav lipīga. Neplīst rokās. Labs sastāvs.



7. Maisījums H4:

- 3% cietes.
- 1,3% glicerīna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva caurspīdīgu elastīgu plēvi. Salīdzinoši labs sastāvs.

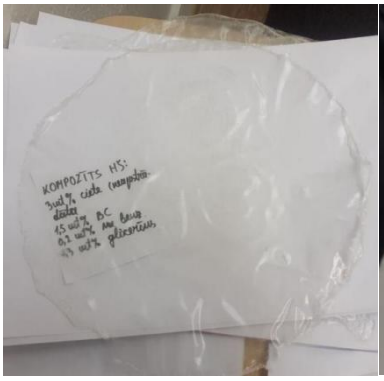


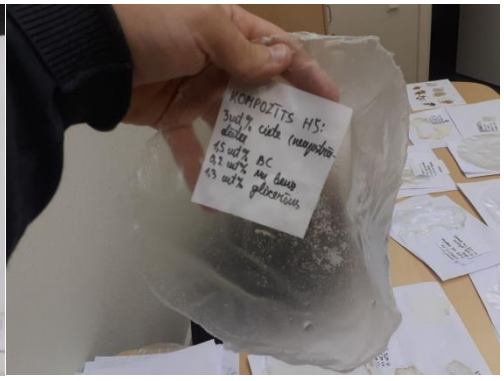
Pēc H4 sāka izmantot vakuuma eksikatoru, lai veiktu maisījuma degazāciju pirms liešanas.

8. Maisījums H5:

- 3% cietes.
- 1,5% BC.
- 1,3% glicerīna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva blīvu un elastīgu bezkrāsainu plēvi bez burbuļiem vai plīsumiem. Labs sastāvs. Seko, ka nepieciešams neliels daudzums BC, lai iegūtu kvalitatīvu plēvi. H5 ir optimāls sastāvs.





9. maisījums H6:

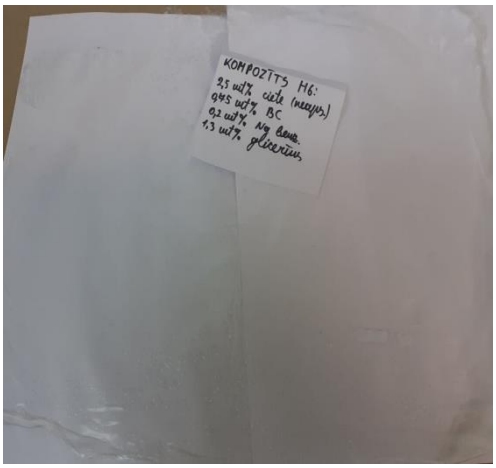
- 3% cietes.

- 0,75% BC.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva plānu elastīgu plēvi, kas ir ļoti līdzīga H4.



10. Maisījumi H7-H10 (ar mainīgu BC saturu)

11.1. Maisījums H7:

- 2,5% cietes.

- 0,5% BC.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva plānu elastīgu plēvi.

11.2. Maisījums H8:

- 2,5% cietes.

- 1% BC.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva plānu elastīgu plēvi.

11.3. Maisījums H9:

- 2,5% cietes.

- 1,5% BC.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva plānu elastīgu plēvi.

11.4. Maisījums H10:

- 2,5% cietes.

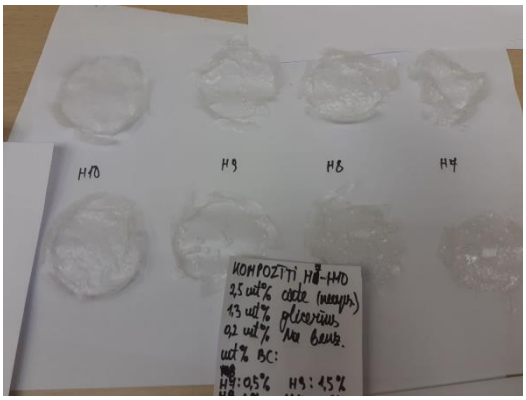
- 2% BC.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva plānu elastīgu plēvi.

Secinājums: plēves ir līdzīgas savā starpā.



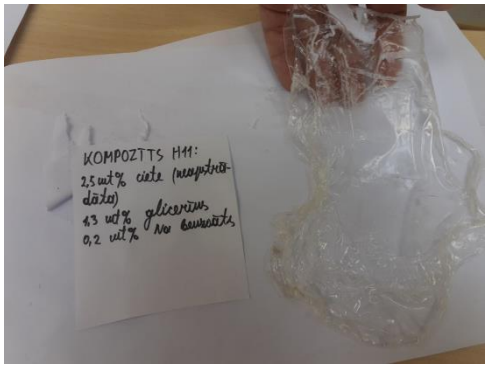
11. Maisījums H11 (H6 kontrole bez BC):

- 2,5% cietes.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva bezkrāsainu plānu plēvi, kas salīp kopā. Var secināt, ka ir ieteicams izmantot BC, lai paaugstinātu plēves izturīgumu.



12. Maisījums H5_AC (plēve ar acilētu cieti un acilētu BC).

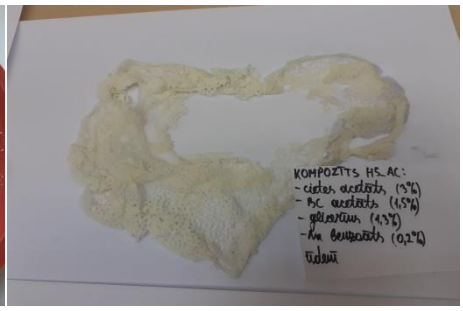
Vispirms veica cietes acilēšanu: 10 g kartupeļu cietes pirms acilēšanas žāvēja 24 stundas 50 °C temperatūrā. Tad cieti iebēra 100 mL burciņā no karstumizturīgā stikla, tad ielika magnēstisko maisītāju un pievienoja 10,30 mL (10,8 g; 180 mmol) etiķskābes. Iegūto emulsiju maisīja 10 minūtes. Pēc tam pa pilienam pievienoja 17,0 mL (18,4 g; 180 mmol) etiķskābes anhidrīda un maisīja 5 minūtes. Tad pievienoja 0,444 g joda (1,75 mmol) un apmaisīja līdz visi joda kristāli izšķīst. Tad stikla burku **neblīvi** aiztaisīja ciet ar korķi un ielika 300 W mikrovilnī. Reakcijas maisījumu uzmanīgi karsēja aptuveni 2 minūtes, nepieļaujot maisījuma vārīšanos. Tad reakcijas maisījumu atdzesēja un pakāpeniski pievienoja piesātinātu nātrija tiosulfāta šķīdumu, līdz pazūd joda krāsa. Pievinoja etanolu, lai izgulsnētu cieti. Tad cieti filtrē, mazgā ar etanolu un dejonizētu ūdens, centrifugē un žāvē. Ieguva 7,826 g acilētās cietes [7].

Tad veica bakteriālās celulozes (BC) acilēšanu: 10 g mitras sasmalicnātās BC trīs reizes mazgāja ar ledus etiķskābi un centrifugēja, lai atbrīvotu celulozi no ūdens. Tad celulozei pievienoja 15 mL ledus etiķskābes, 18,75 mL toluola un 0,100 mL perhlorskābes. Iegūto suspensiju enerģiski maisīja 1 minūti. Tad suspensijai uzmanīgi pievienoja 7,5 mL etiķskābes anhidrīda un atkal enerģiski maisīja 1 minūti. Tad to maisīja 1 stundu istabas temperatūrā. Pēc reakcijas beigām acilētu BC izmazgāja ar etanolu un tad ar dejonizētu ūdeni. Ieguva vismaz 7,5 g acilētās BC [8].

Tad pagatavoja plēvi H5_AC ūdenī:

- 3% cietes acetāta.
- 1,5% BC acetāta.
- 1,3% glicerīna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva dzeltenu graudainu plēvi ar caurumiem. Acilēta ciete slikti nobriest ūdenī un neveido vienveidīgu gelveida struktūru. Seko, ka nepieciešams saderīgs šķīdinātājs. Nepieciešams arī izmēģināt celulozes metilēšanu un salīdzināt rezultātus.

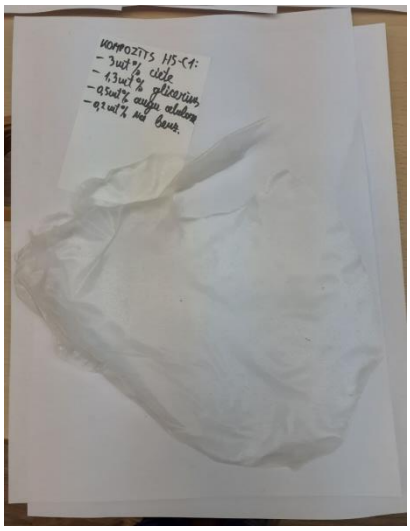


13. Maisījumi augu izcelsmes celulozi

13.1. Maisījums H5_C1:

- 3% cietes.
- 0,5% augu celulozes.
- 1,3% glicerīna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva puscaurspīdīgu plēvi graudainu plēvi. Nav tik elastīga salīdzinājumā ar H5.



13.2. Maisījums H5_C2:

- 3% cietes.
- 1% augu celulozes.
- 1,3% glicerīna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

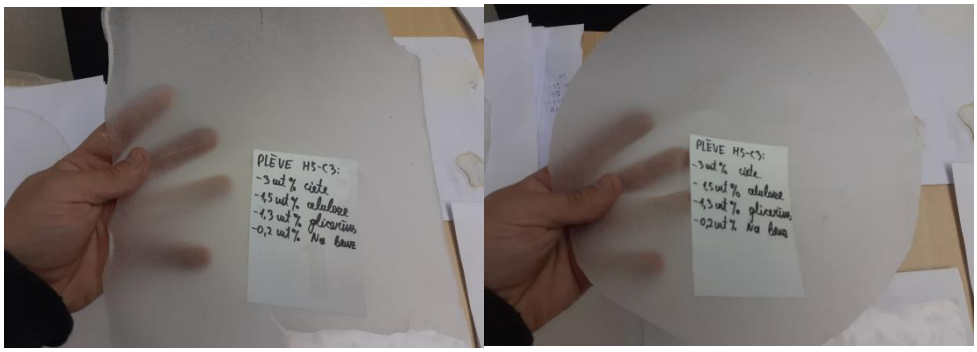
13.3. Maisījums H5_C3:

- 3% cietes.
- 1,5% augu celulozes.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva necaurspīdīgu baltu plēvi. Ļoti trausla un graudaina.



13.4. Maisījums H5_C4:

- 3% cietes.

- 2% augu celulozes.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva necaurspīdīgu baltu plēvi. Ļoti trausla un graudaina.

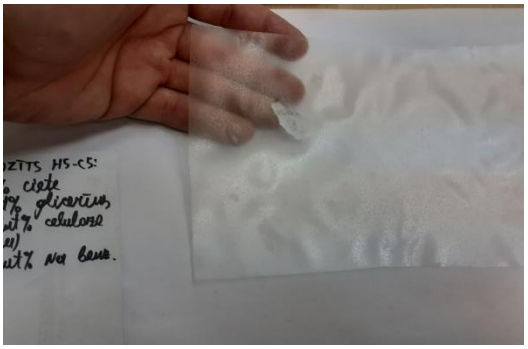
13.5. Maisījums H5_C5:

- 3% cietes.

- 0,25% augu celulozes.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.



Ieguva caurspīdīgu un elastīgu plēvi. Nedaudz graudaina. Seko, ka augu celuloze der tikai ļoti nelielos daudzumos. Augu celuloze piešķir plēvēm nepatīkamu “smilšpapīra” sajūtu. Bakteriālā celuloze labāk der plēvju izgatavošanai.

14. Maisījumi ar bakteriālu celulozi bez cietes.

14.1. Maisījums G2:

- 7,5% BC.

- 0,25 nātrija benzoāta.

Ieguva baltu papīram līdzīgu plēvi. Plēve ir ļoti trausla.

14.2. Maisījums G3:

- 7,5% BC.
- 1,3% glicerīna.
- 0,25 nātrija benzoāta.

Ieguva ļoti plānu elastīgu plēvi, kas salīp kopā.

Var secināt, ka ciete ir svarīga plēvju sastāvdaļa.

15. Maisījumi I ar agaru

15.1. Maisījums I1 (kontrole):

- 4% cietes.
- 1,3% glicerīna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva plēvi, kas pēc savām īpašībām ir identiska maisījumam H.

15.2. Maisījums I2:

- 3,5% cietes.
- 0,5% agara.
- 1,3% glicerīna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva dzeltenīgu elastīgu plēvi, kas ir līdzīga kontrolei.

15.3. Maisījums I3:

- 3% cietes.
- 1% agara.
- 1,3% glicerīna.
- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva dzeltenu elastīgu plēvi, kas pēc savām īpašībām ir līdzīga kontrolei.

15.4. Maisījums I4:

- 2,5% cietes.

- 1,5% agara.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva tumši dzeltenu cietu plēvi.

15.5. Maisījums I5:

- 2% cietes.

- 2% agara.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva tumši dzeltenu trauslu plēvi.

15.6. Maisījums I6:

- 1,5% cietes.

- 2,5% agara.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva cietu brūnu kristālisku vielu. Plēve netika iegūta.

15.7. Maisījums I7:

- 1% cietes.

- 3% agara.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva cietu tumši brūnu kristālisku vielu. Plēve netika iegūta.

15.8. Maisījums I8:

- 0,5% cietes.

- 3,5% agara.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva cietu tumši brūnu kristālisku vielu. Plēve netika iegūta.

15.9. Maisījums I9:

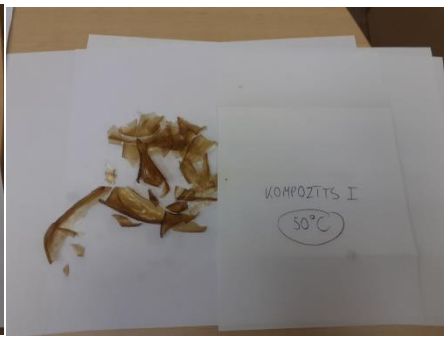
- 1% agara.

- 1,3% glicerīna.

- 0,2% nātrija benzoāta.

Ieguva cietu brūnu kristālisku vielu. Plēve netika iegūta.

Secinājums: liels agara daudzums slikti der plēvju izgatavošanai.



.

Tālākais darba plāns:

1. Izstrādāt optimālu pārklājumu sastāvu.
2. Izmēģināt plēves un pārklājumus, salīdzināt apstrādātus augļus/dārzeņus ar kontroli.
3. Savākt kvantitatīvus datus par plēvēm un pārklājumiem (Junga modulis, plīsuma punkts, stiepes izturība, biezums, gāzu un ūdens tvaiku caurlaidība, atspīdums utt. — sadarbībā ar RTU vai LU).

Izmantotā literatūra:

1. Montoya, Ú.; Zuluaga, R.; Castro, C.; Goyanes, S.; Gañán, P. Development of composite films based on thermoplastic starch and cellulose microfibrils from Colombian agroindustrial wastes. *J. Thermoplast. Compos. Mater.* **2012**, 1–14. DOI: 10.1177/0892705712461663.

2. Thakur, R.; Pristijono, P.; Bowyer, M.; Singh, S. P.; Scarlett, C. J.; Stathopoulos, C. E.; Vuong, Q. V.; A starch edible surface coating delays banana fruit ripening. *Food Sci. Technol*. **2019**, *100*, 341–347. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.055.

3. Basiak, E.; Linke, M.; Debeaufort, F.; Lenart, A.; Geyer, M. Dynamic behaviour of starch-based coatings on fruit surfaces. *Postharvest Biol. Tec*. **2019**, *147*, 166–173. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2018.09.020.

4. Sapper, M.; Chiralt, A. Starch-Based Coatings for Preservation of Fruits and Vegetables. Coatings. **2018**, *8*, 152; DOI:10.3390/coatings8050152.

5. Kocira, A.; Kozłowicz, K.; Panasiewicz, K.; Staniak, M.; Szpunar-Krok, E.; Hortýnska, P. Polysaccharides as Edible Films and Coatings: Characteristics and Influence on Fruit and Vegetable Quality — A Review. *Agronomy*. **2021**, *11*, 813. DOI: 10.3390/agronomy11050813.

6. Zikmanis, P. Biopolimērus saturošu kompozītu izveide ar perspektīvu pielietojumu augļu/ogu pārklājumos un iepakojuma materiālos. Zinātniskais darbs. **2021**.

7. Cherif Ibrahima Khalil Diop, Hai Long Li, Bi Jun Xie, John Shi. Effects of acetic acid/acetic anhydride ratios on the properties of corn starch acetates. *Food Chemistry*. **2011**, *126*, 1662–1669. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.050.

8. Dae-Young Kim, Yoshiharu Nishiyama, Shigenori Kuga. Surface acetylation of bacterial cellulose. *Cellulose*. **2002**, *9*, 361–367. DOI: 10.1023/A:1021140726936.

BAKTERIĀLĀS CELULOZES PARAUGU FIZIKĀLI MEHĀNISKĀ ANALĪZE

- BC paraugiem (skatīt tabulu) tika noteiktās strukturālas, mehāniskās un viskoelastiskās īpašības
  Visi mērījumu rezultāti ir pievienoti pielikumā 1.

1. HS kontrole	SEM, XRD, stiepe, reoloģija, uzbriešana, blīvums
2.A.S.x7	SEM, XRD, stiepe, reoloģija, uzbriešana, blīvums
3. A.S.+g.e.x3	SEM, XRD, stiepe, reoloģija, uzbriešana, blīvums
4. A.s. x1 gaļas. Eksrt.	SEM, XRD, stiepe, reoloģija, uzbriešana, blīvums
5. HS kontrole	SEM, XRD, stiepe, reoloģija, uzbriešana, blīvums
6. Sūkalas kontrole	SEM, XRD, stiepe, reoloģija, uzbriešana, blīvums
7. Sūkalas ar enzīmiem	SEM, XRD, stiepe, reoloģija, uzbriešana, blīvums
8. sūkalas ar CSL.	SEM, XRD, stiepe, reoloģija, uzbriešana, blīvums

- **Stiepes analīze**

Tinius Olsen 25ST (USA), ātrums 1 mm/min.

Pēc izņemšanas no vides uzreiz tika testēti 3 paraugi (10 mm x 40 mm).

- **RTG analīze**

Panalytical X'Pert PRO. CuKα λ = 0.154 nm; 2θ = 2 - 25 deg, 40 kV, 0.125 deg/s.

Paraugi tika liofilizēti pirms analīzes.

- **SEM analīze**

Tescan, Mira//LMU Schottky, 25 kV, gold-palladium (Emitech, K550X).

Paraugi tika liofilizēti un pārklāti ar zelta palādija sakausējumi.

- **Uzbriešana**

Uzbriešana tika veikta DI ūdenī. Žāvēšana veikta termoskapī pie 105 grādiem.

- **Blīvums**

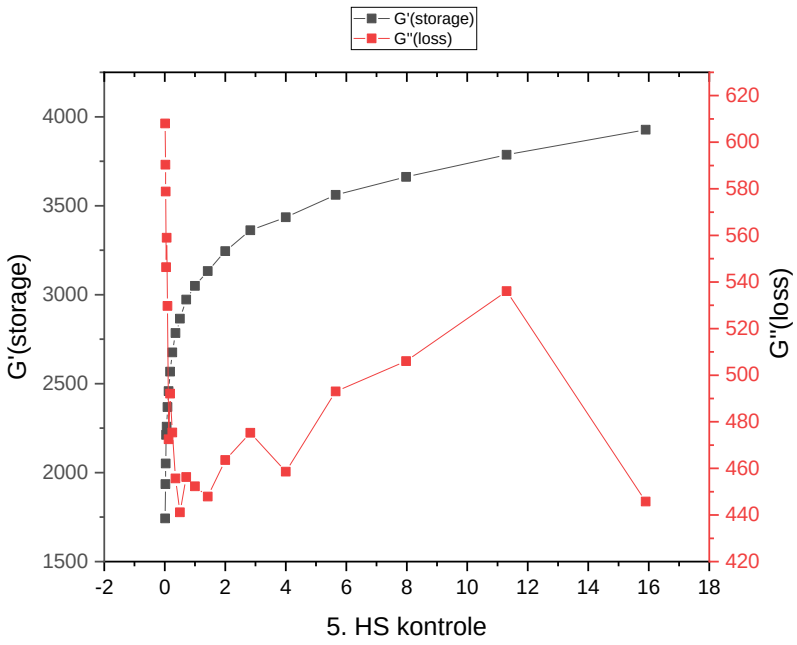
Blīvums tika aprēķināts ar svēršanas metodi zinot parauga ģeometriskos izmērus

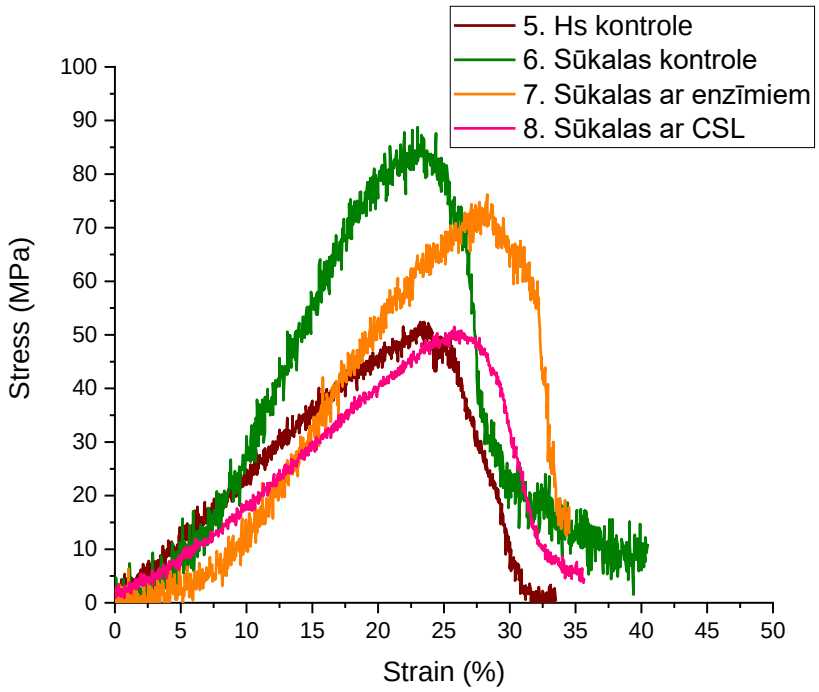
- **Reoloģija**

Anton Paar Conus-Plate MCR 702.

Pagarinājuma un frekvences kontrole, 1 Hz oscilācijas režīms. Viskoelastiskās īpašības atkarībā no deformācijas.

Stiepes dati


G'(storage)
G''(loss)
G'(storage)
G''(loss)
5. HS kontrole


5. Hs kontrole
6. Sūkalas kontrole
7. Sūkalas ar enzīmiem
8. Sūkalas ar CSL
Stress (MPa)
Strain (%)

Tabula: Stiepes analīzes datu apkopojums

	modulis MPa	error	stiprība MPa	error	Pagarinājums %	error	sausais atlikums %	uzbrieša nas pakape %	blīvums g/cm3
1. HS kontrole	241,3	33,4	45,1	8,8	31,8	2,6	0,49	2938	0,958
2.A.S.x7	210,7	26,4	117,4	28,7	38,5	11,4	0,4	2162	1,328
3. A.S.+g.e.x3	131,8	19,1	22,9	5,1	67,2	21,5	2	1328	1,055
4. A.s. x1 gaļas. Eksrt.	49,7	8,0	25,8	5,6	62,0	3,5	1,64	1653	0,931
5. HS kontrole	241,3	33,4	45,1	8,8	31,8	2,6	0,79	2194	1,039
6. Sūkalas kontrole	173,3	39,3	88,2	4,7	36,9	3,1	0,86	2431	1,098
7. Sūkalas ar enzīmiem	232	60,0	67,5	9,5	30,3	3,3	1,3	1362	1,076
8. sūkalas ar CSL.	175,5	9,7	45,4	9,7	39,4	9,5	1,27	1245	1,4

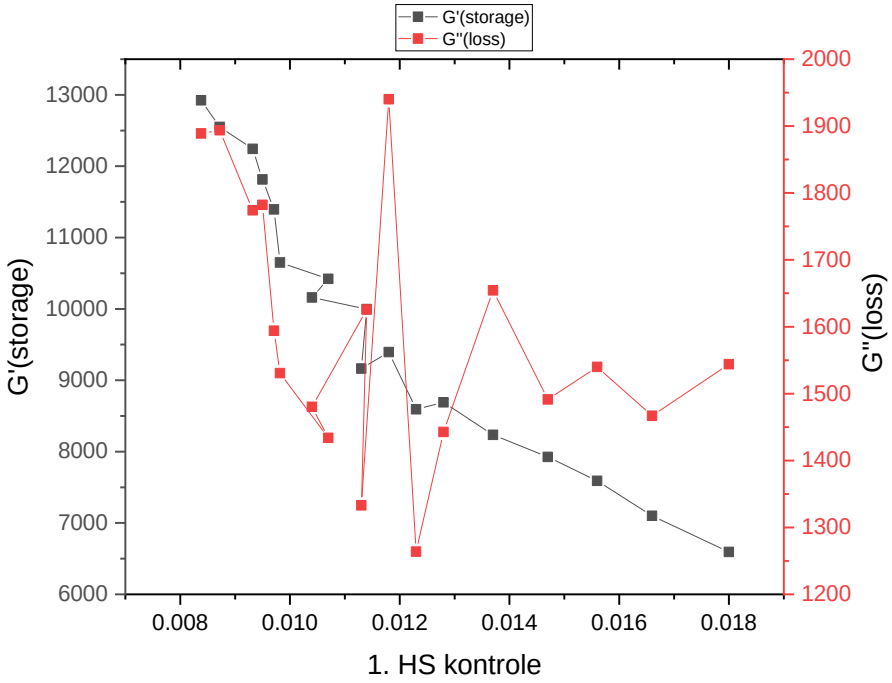
Mehāniskās īpašības

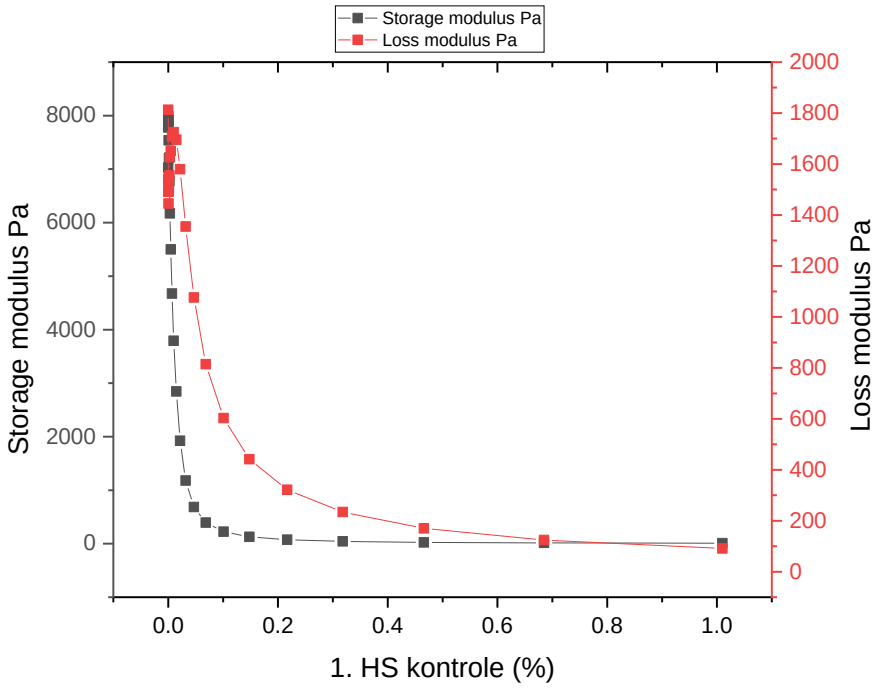
5. HS kontrole			6. Sūkalas kontrole			7. Sūkalas ar enzīmiem			8. sūkalas ar CSL.		
modulis Mpa	trūkšanas spēks Mpa	Pagarinājums%	modulis Mpa	trūkšanas spēks Mpa	Pagarinājums%	modulis Mpa	trūkšanas spēks Mpa	Pagarinājums%	modulis Mpa	trūkšanas spēks Mpa	Pagarinājums%
233	52,4	33	154	88,7	39,7	230	76,2	33,9	167	51,5	35,1
232	32,7	33,8	129	91,9	38,6	173	57,4	27,3	189	41,5	28,1
211	50,1	32,3	193	81,4	36,5	293	68,9	29,8	170	33,7	49,2
289	45	27,9	217	90,8	32,6				176	54,9	45
241,3	**45,1**	**31,8**	**173,3**	**88,2**	**36,9**	**232,0**	**67,5**	**30,3**	**175,5**	**45,4**	**39,4**
33,4	**8,8**	**2,6**	**39,3**	**4,7**	**3,1**	**60,0**	**9,5**	**3,3**	**9,7**	**9,7**	**9,5**

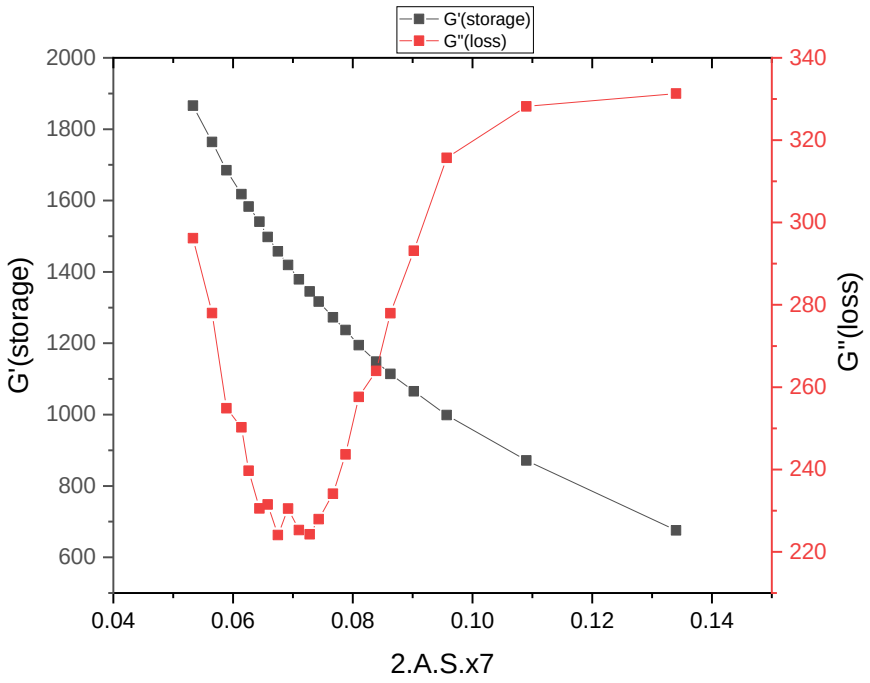
3. A.S.+g.e.x3			**4. A.s. x1 gaļas. Eksrt.**			**1. HS kontrole**			**2.A.S.x7**		
modulis Mpa	trūkšanas spēks Mpa	modulis Mpa	trūkšanas spēks Mpa	Pagarinājums%	modulis Mpa	trūkšanas spēks Mpa	Pagarinājums%	Pagarinājums%	modulis Mpa	trūkšanas spēks Mpa	Pagarinājums%
234	28,8	233	52,4	33	115	106	51	51,5	52,3	26,5	59,1
97,4	20,2	232	32,7	33,8	354	96,2	36	91,7	40,7	19,8	65,9
63,9	19,8	211	50,1	32,3	163	150	28,6	58,4	56	31	60,9
131,8	**22,9**	**241,3**	**45,1**	**31,8**	**210,7**	**117,4**	**38,5**	**67,2**	**49,7**	**25,8**	**62,0**
90,1	**5,1**	**33,4**	**8,8**	**2,6**	**126,4**	**28,7**	**11,4**	**21,5**	**8,0**	**5,6**	**3,5**

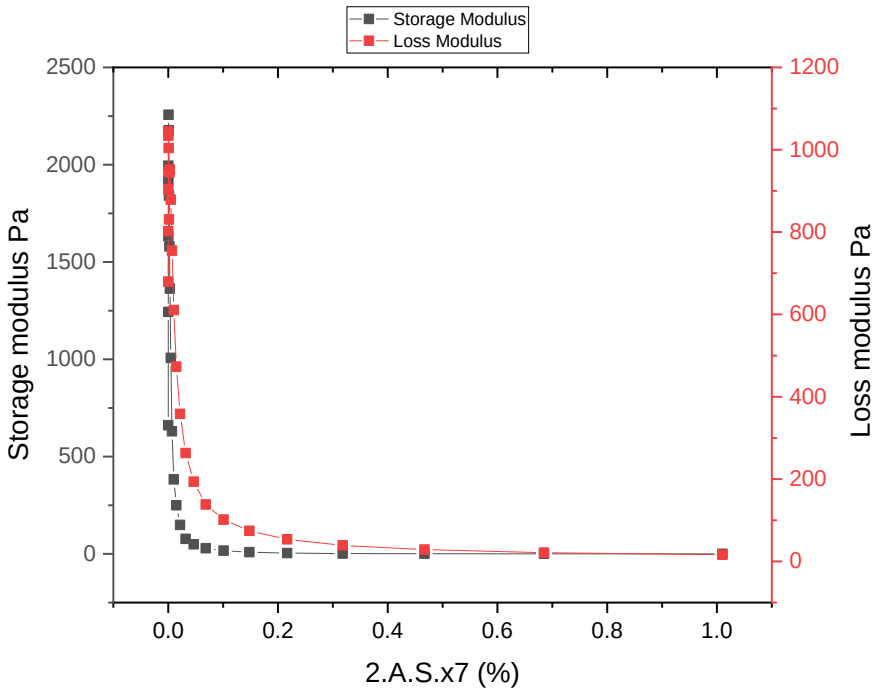
BC paraugu reoloģija

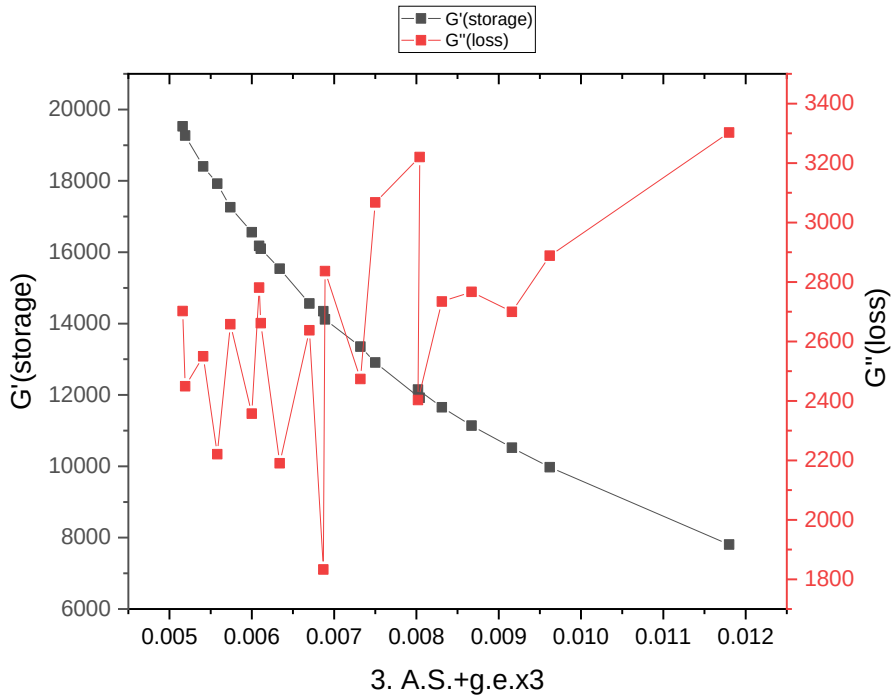
X- Shear Strain % , G’ -storage modulus Pa, G’’-loss modulus Pa

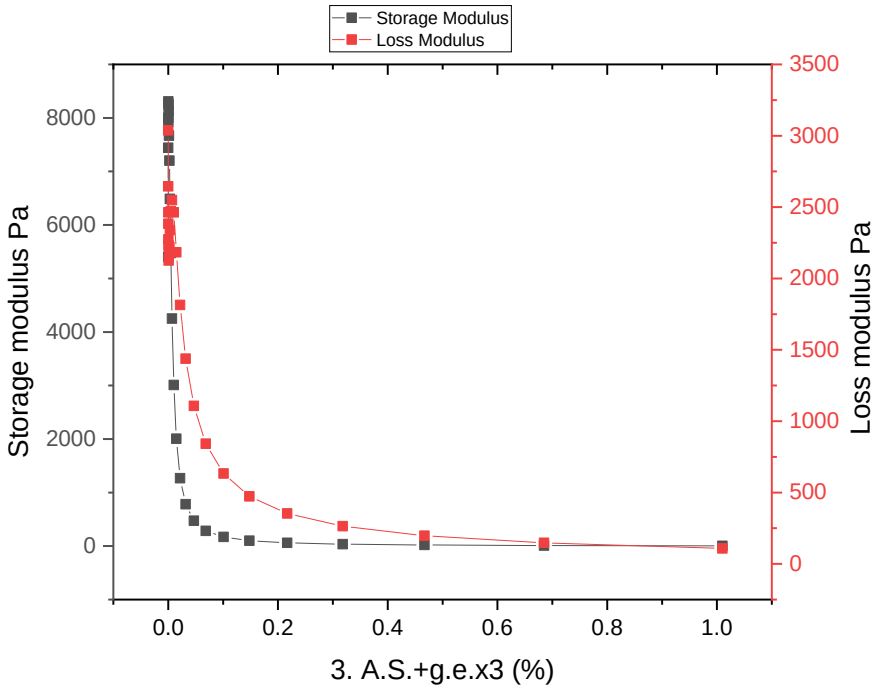


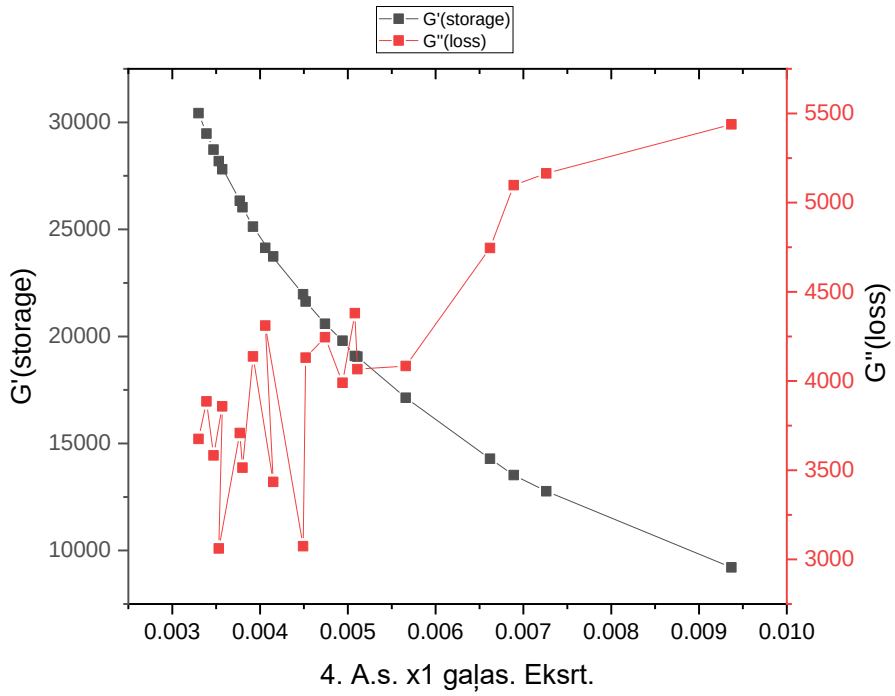


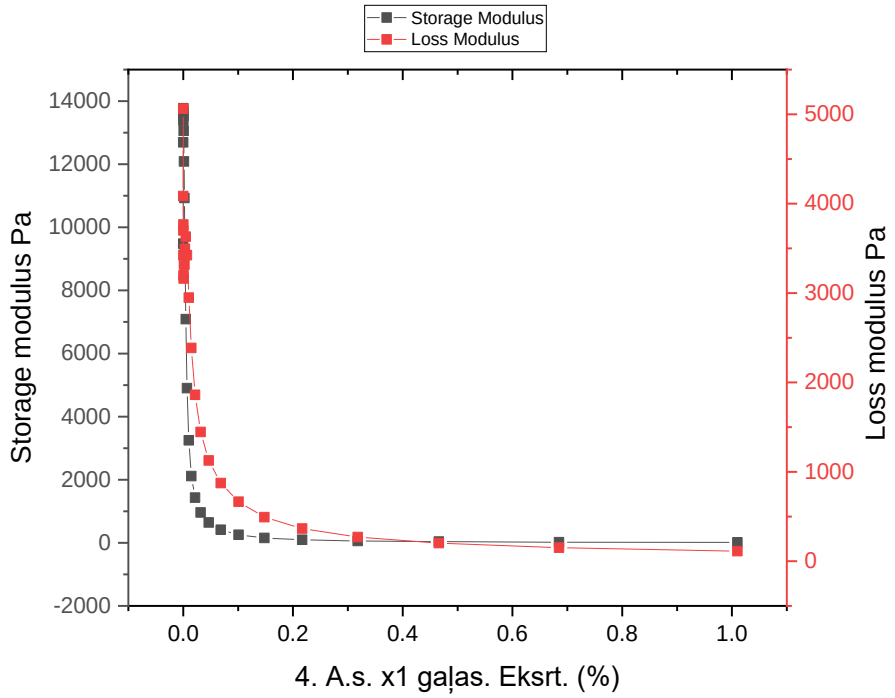

G'(storage)
G"(loss)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
340
320
300
280
260
240
220
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
0.14
2.A.S.x7
G'(storage)
G"(loss)

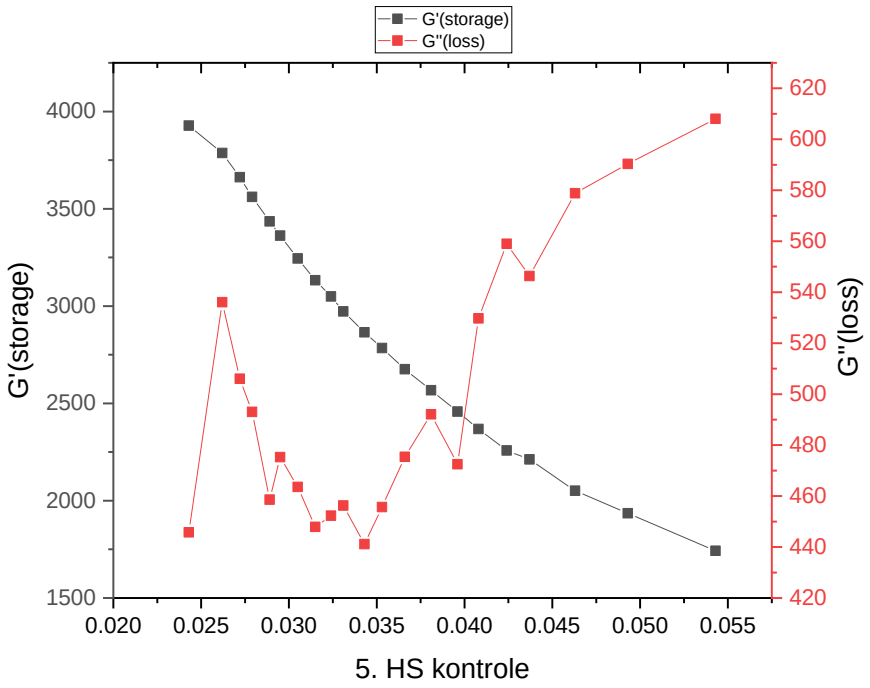

Storage Modulus
Loss Modulus
2500
2000
1500
1000
500
0
1200
1000
800
600
400
200
0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
2.A.S.x7 (%)
Storage modulus Pa
Loss modulus Pa

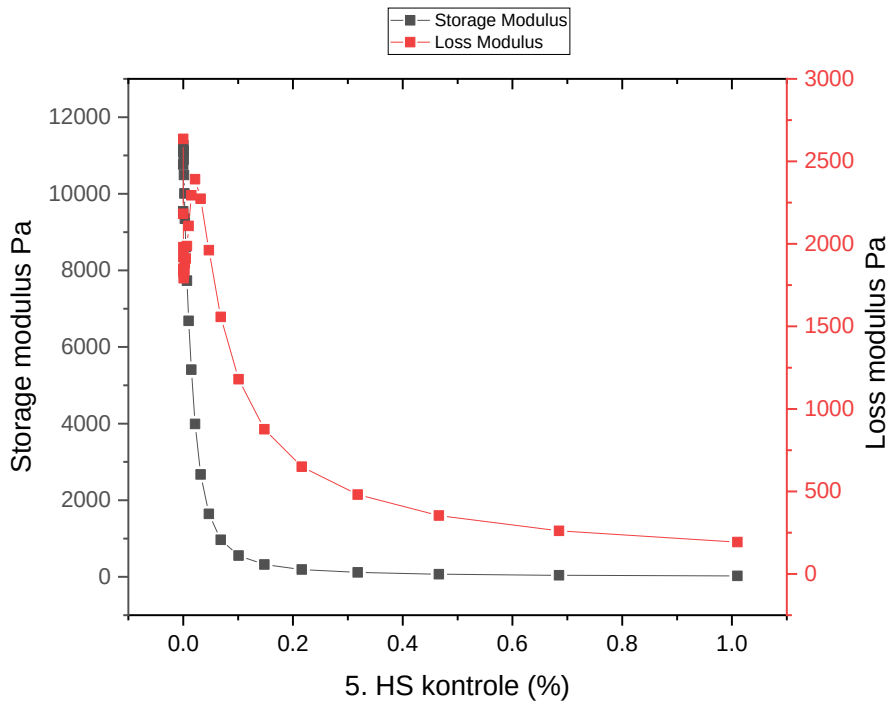

G'(storage)
G"(loss)
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
G'(storage)
3400
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
G"(loss)
0.005
0.006
0.007
0.008
0.009
0.010
0.011
0.012
3. A.S.+g.e.x3

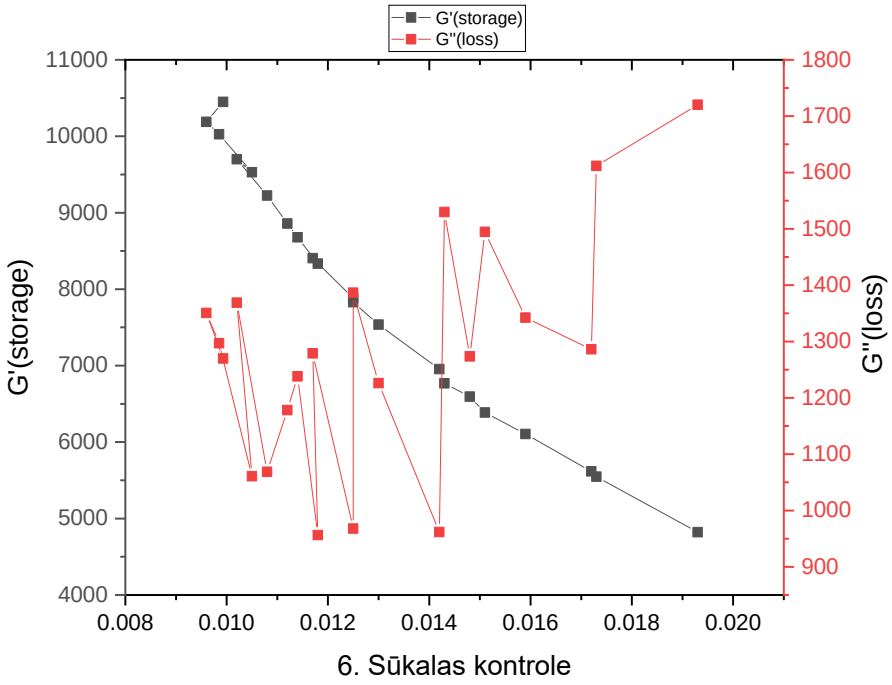

Storage Modulus
Loss Modulus
8000
6000
4000
2000
0
Storage modulus Pa
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Loss modulus Pa
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
3. A.S.+g.e.x3 (%)

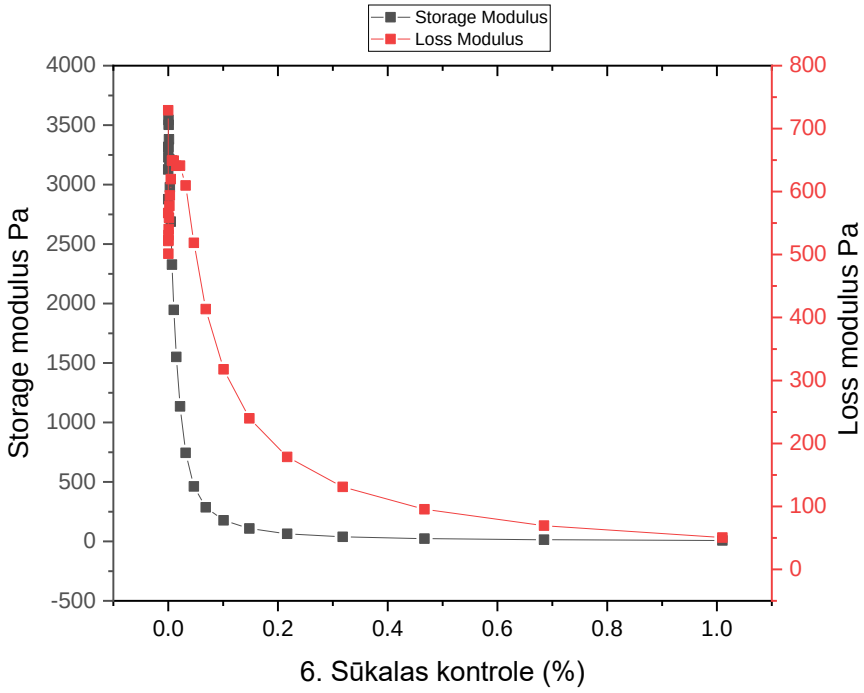

G'(storage)
G"(loss)
30000
25000
20000
15000
10000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
0.003
0.004
0.005
0.006
0.007
0.008
0.009
0.010
4. A.s. x1 gaļas. Eksrt.

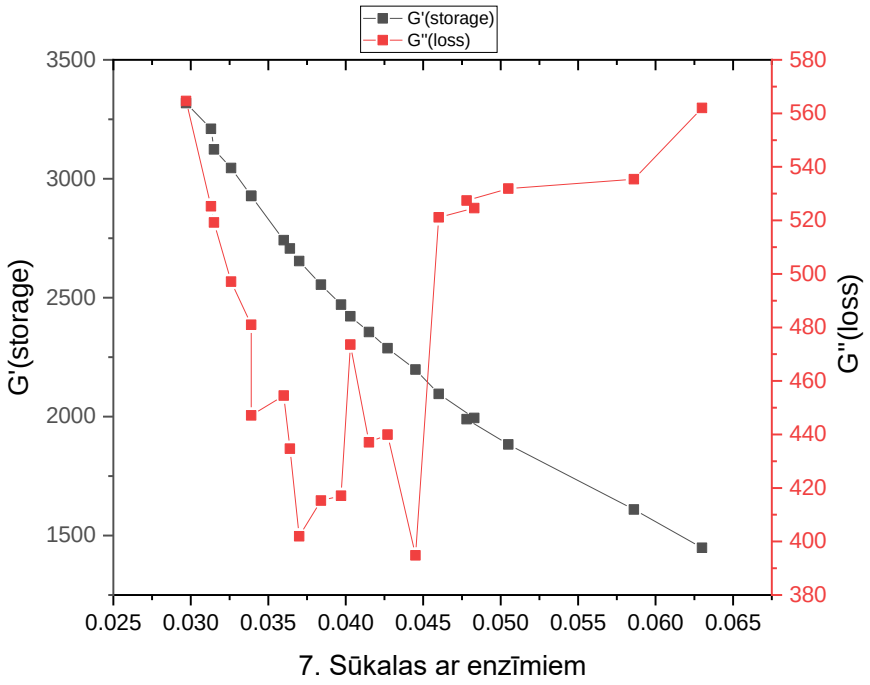

Storage Modulus
Loss Modulus
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
4. A.s. x1 gaļas. Eksrt. (%)

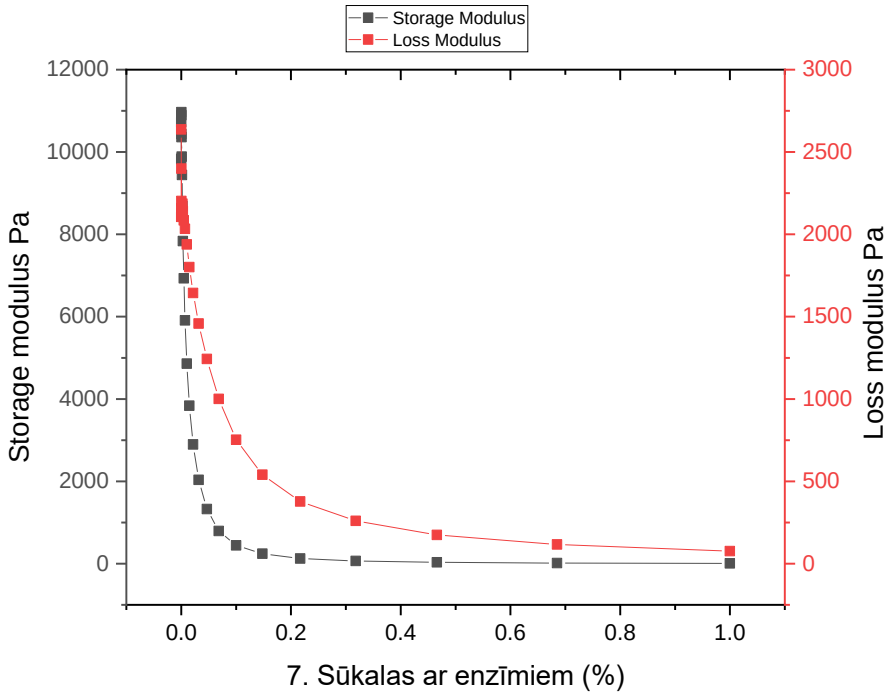

G'(storage)
G"(loss)
G'(storage)
G"(loss)
5. HS kontrole
4000
3500
3000
2500
2000
1500
620
600
580
560
540
520
500
480
460
440
420
0.020
0.025
0.030
0.035
0.040
0.045
0.050
0.055

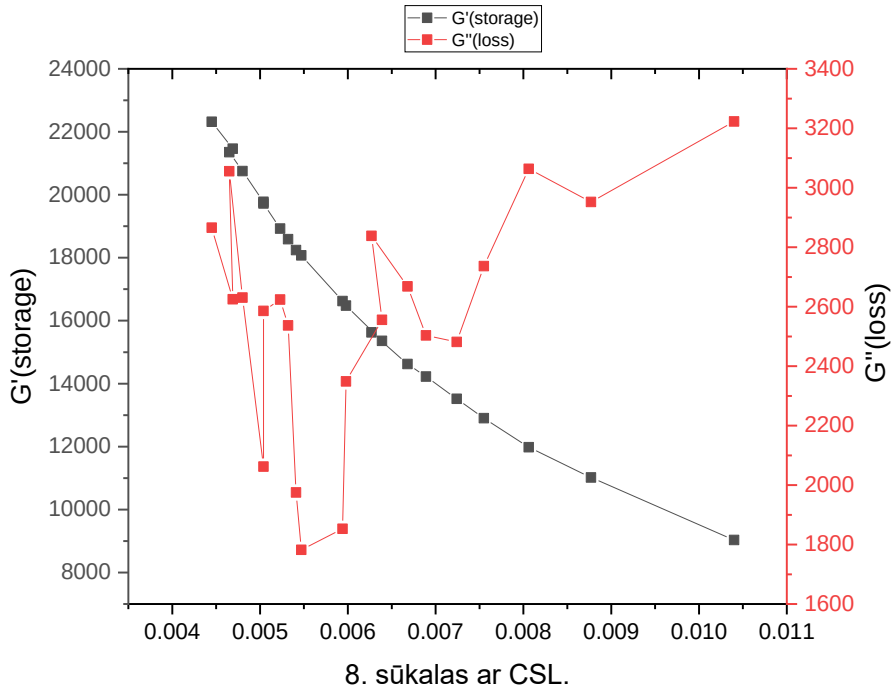

Storage Modulus
Loss Modulus
Storage modulus Pa
Loss modulus Pa
5. HS kontrole (%)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

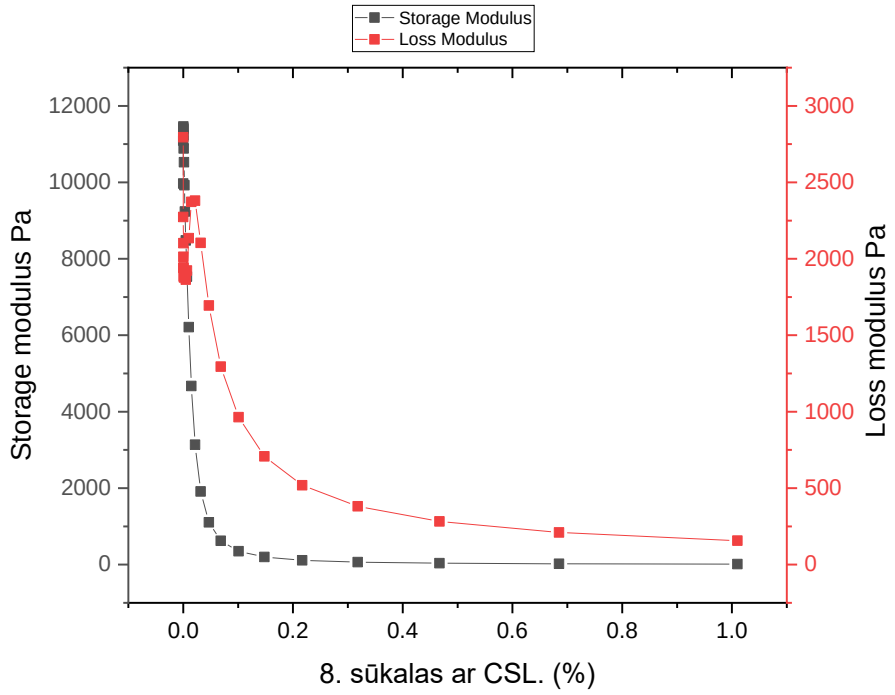

G'(storage)
G''(loss)
G'(storage)
G''(loss)
6. Sūkalas kontrole


Storage Modulus
Loss Modulus
Storage modulus Pa
Loss modulus Pa
6. Sūkalas kontrole (%)

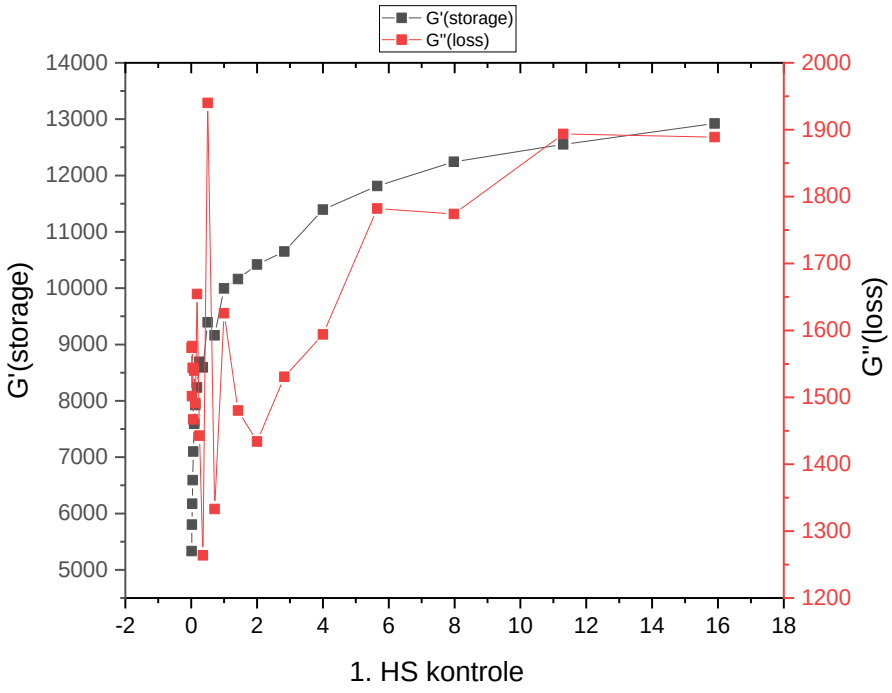

G'(storage)
G''(loss)
3500
3000
2500
2000
1500
580
560
540
520
500
480
460
440
420
400
380
0.025
0.030
0.035
0.040
0.045
0.050
0.055
0.060
0.065
7. Sūkalas ar enzīmiem

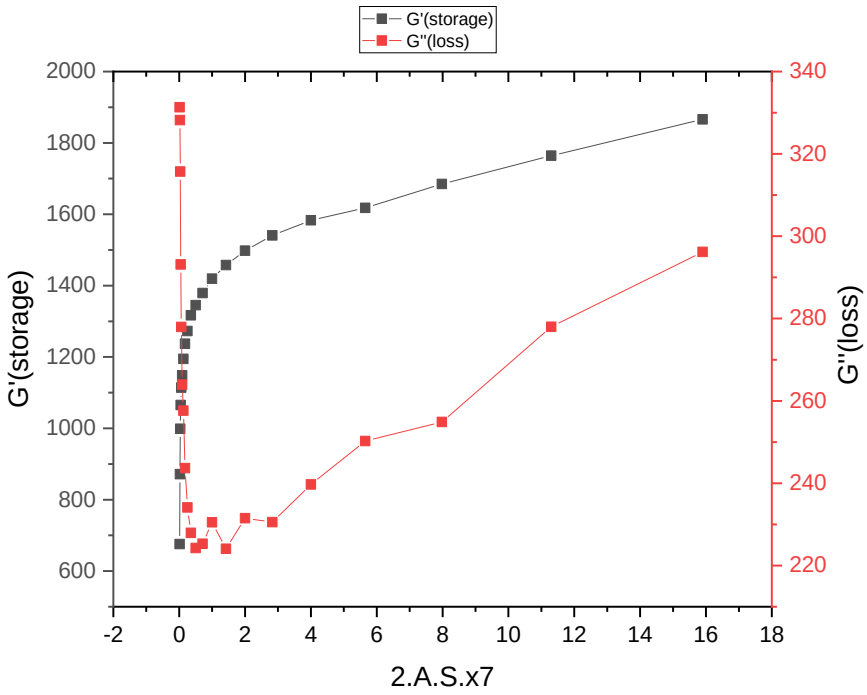

Storage Modulus
Loss Modulus
Storage modulus Pa
Loss modulus Pa
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
7. Sūkalas ar enzīmiem (%)

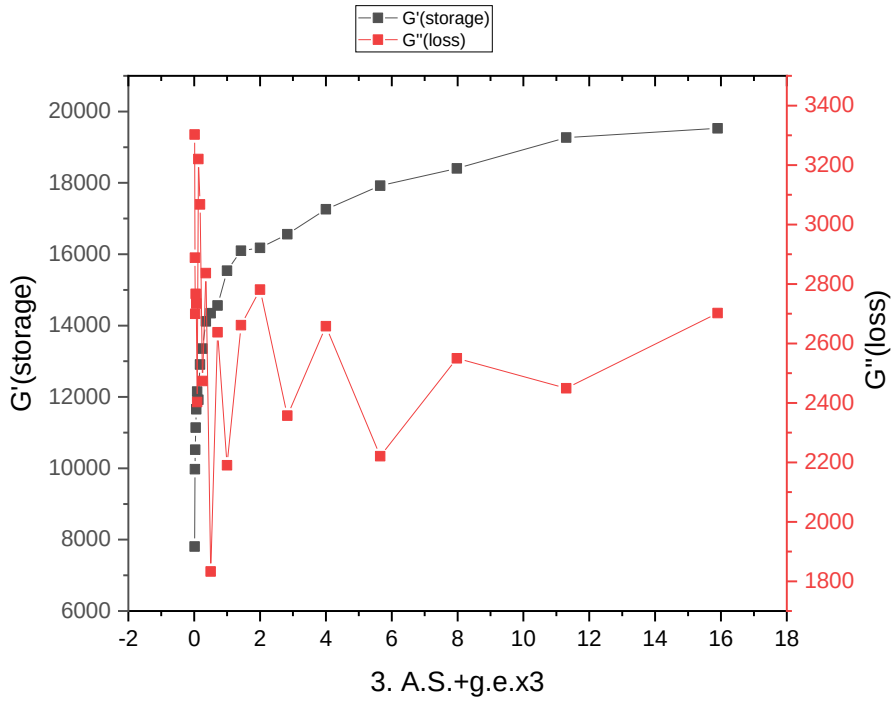


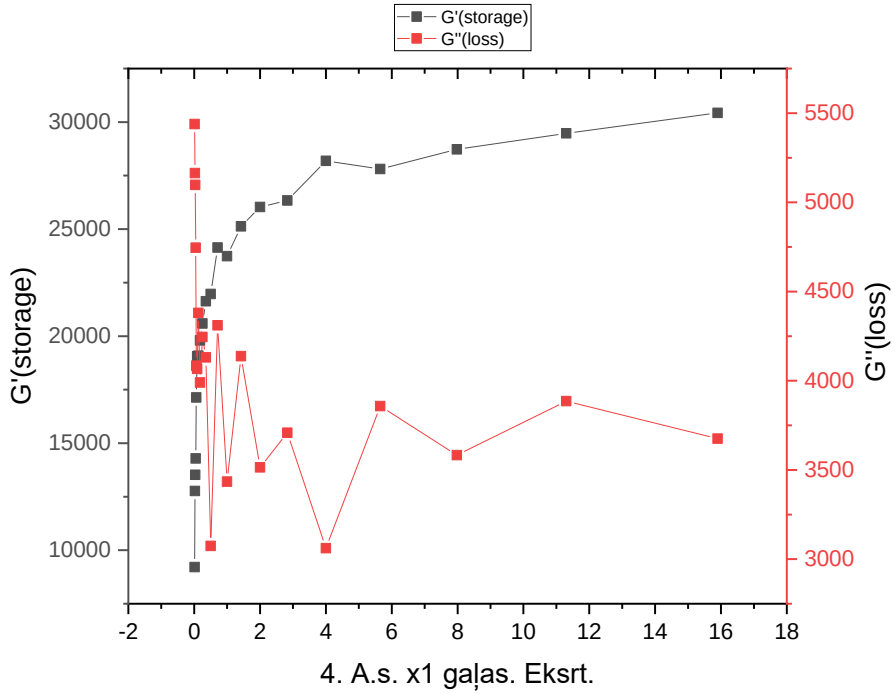


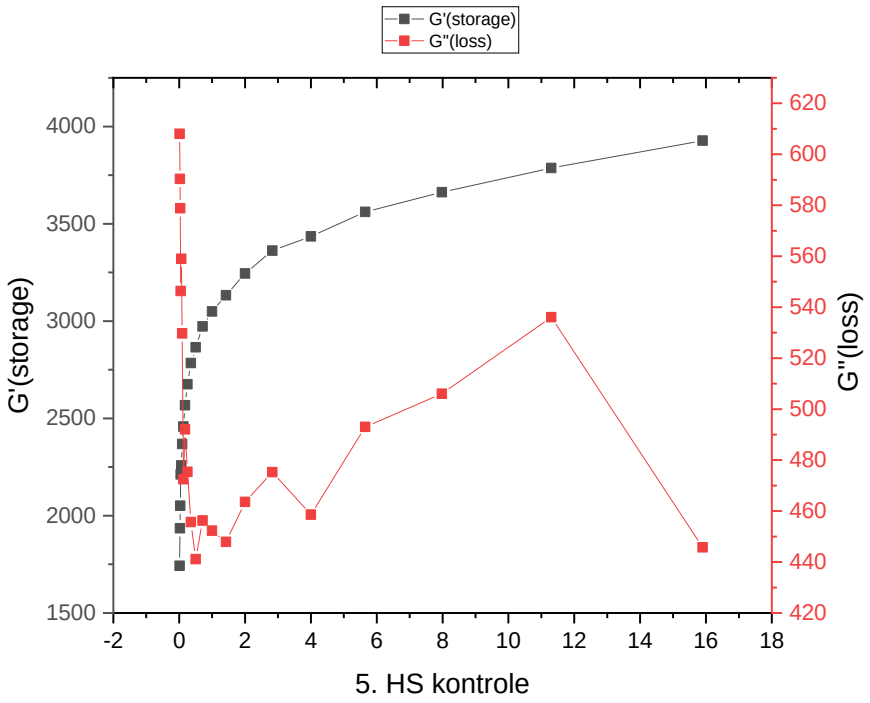
X – Hz , G’ -storage modulus Pa, G’’-loss modulus Pa

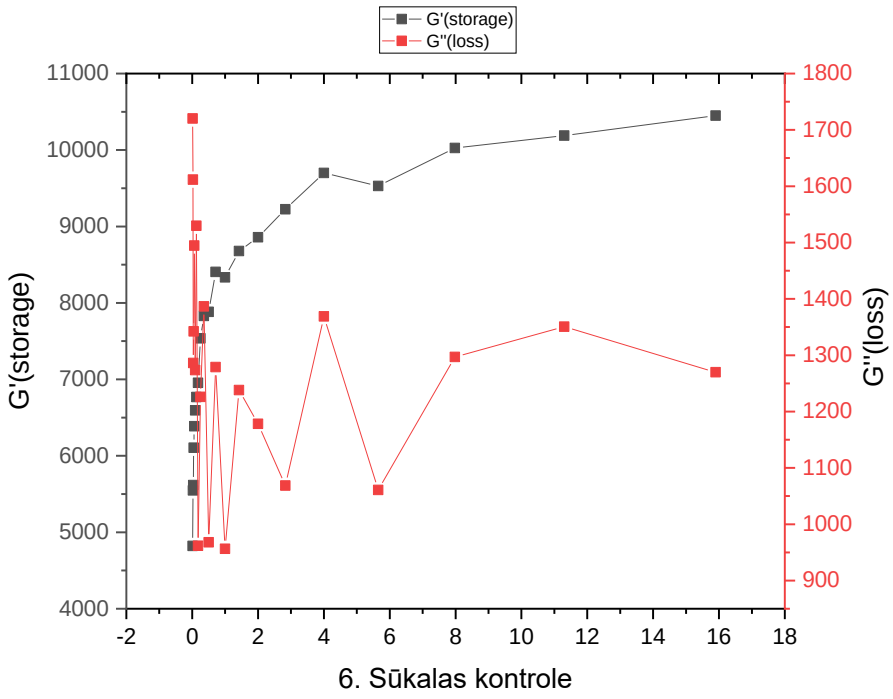

G'(storage)
G''(loss)
G'(storage)
G''(loss)
1. HS kontrole

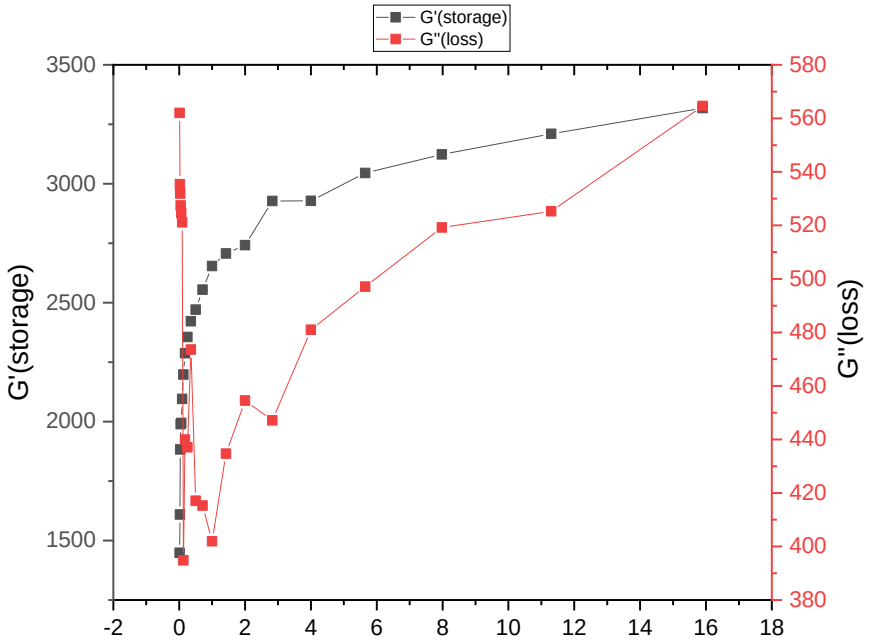

G'(storage)
G''(loss)
G'(storage)
G''(loss)
2.A.S.x7


G'(storage)
G''(loss)
G'(storage)
G''(loss)
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
3400
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
3. A.S.+g.e.x3

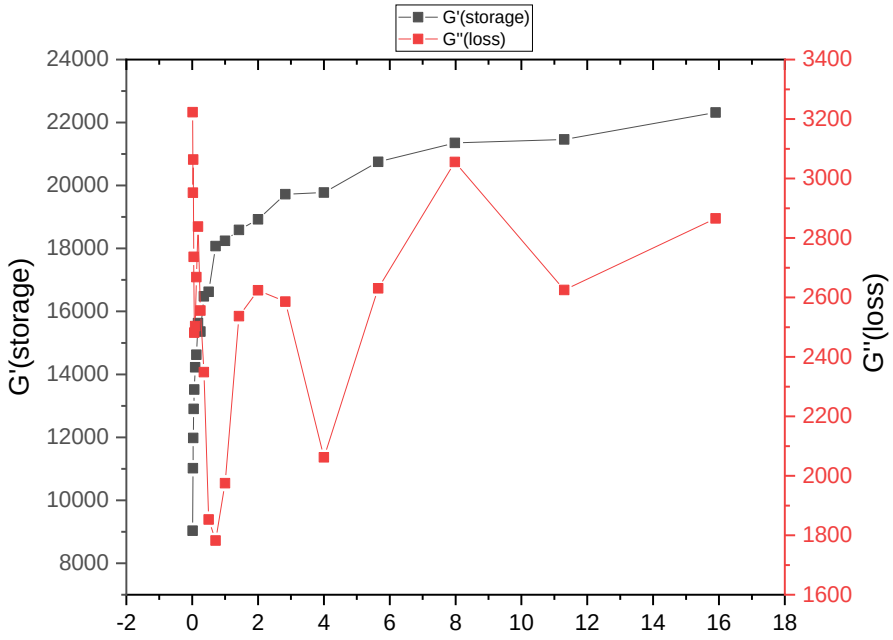

G'(storage)
G''(loss)
G'(storage)
G''(loss)
30000
25000
20000
15000
10000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
4. A.s. x1 gaļas. Eksrt.


G'(storage)
G''(loss)
G'(storage)
G''(loss)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
620
600
580
560
540
520
500
480
460
440
420
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
5. HS kontrole


G'(storage)
G''(loss)
G'(storage)
G''(loss)
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
1800
1700
1600
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
6. Sūkalas kontrole



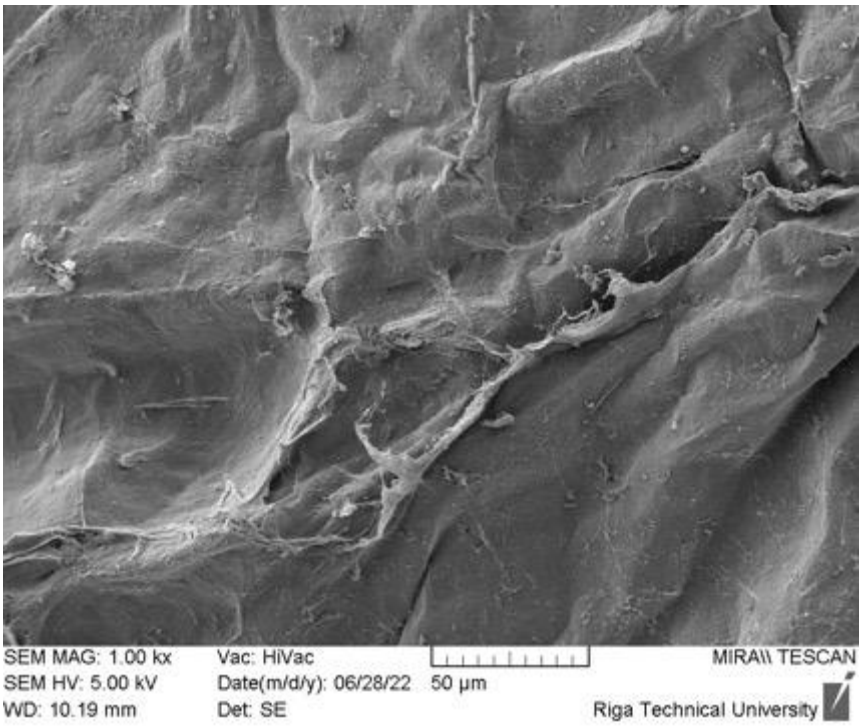
7. Sūkalas ar enzīmiem

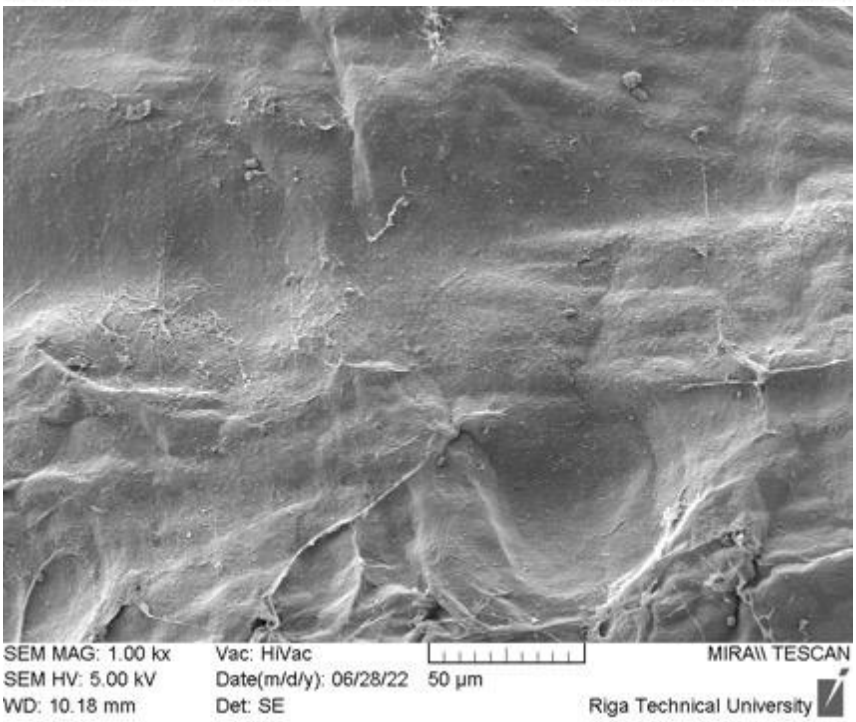


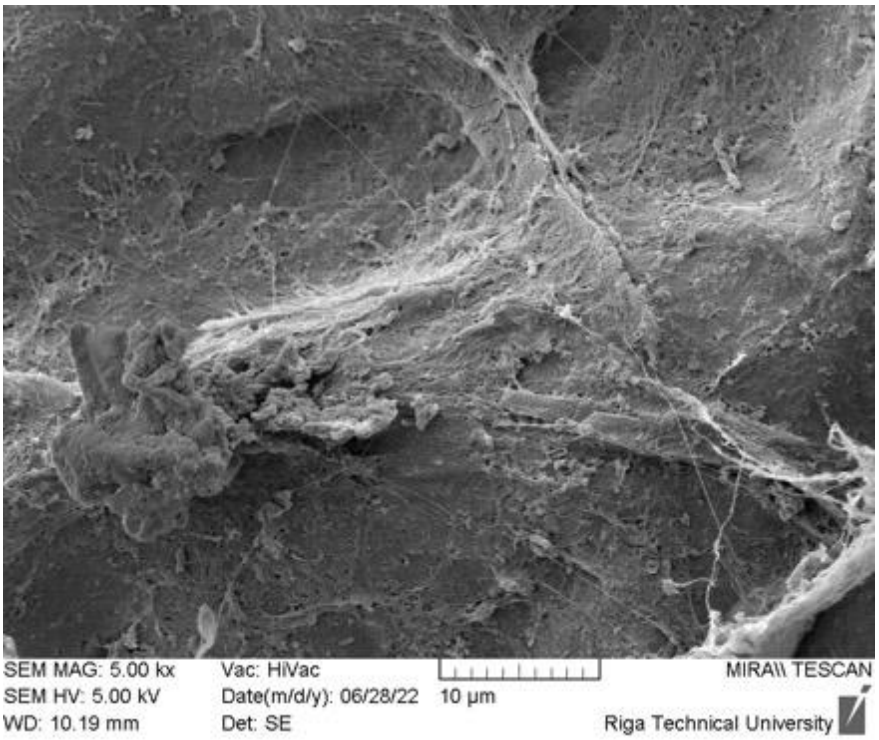
8. sūkalas ar CSL.

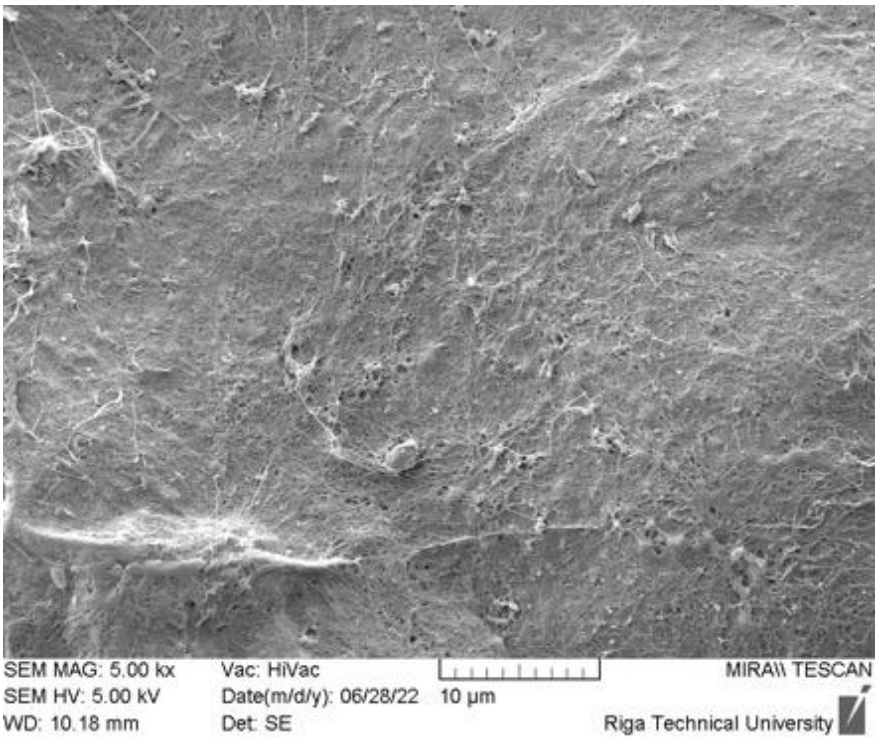
BC SEM mikroskopīja

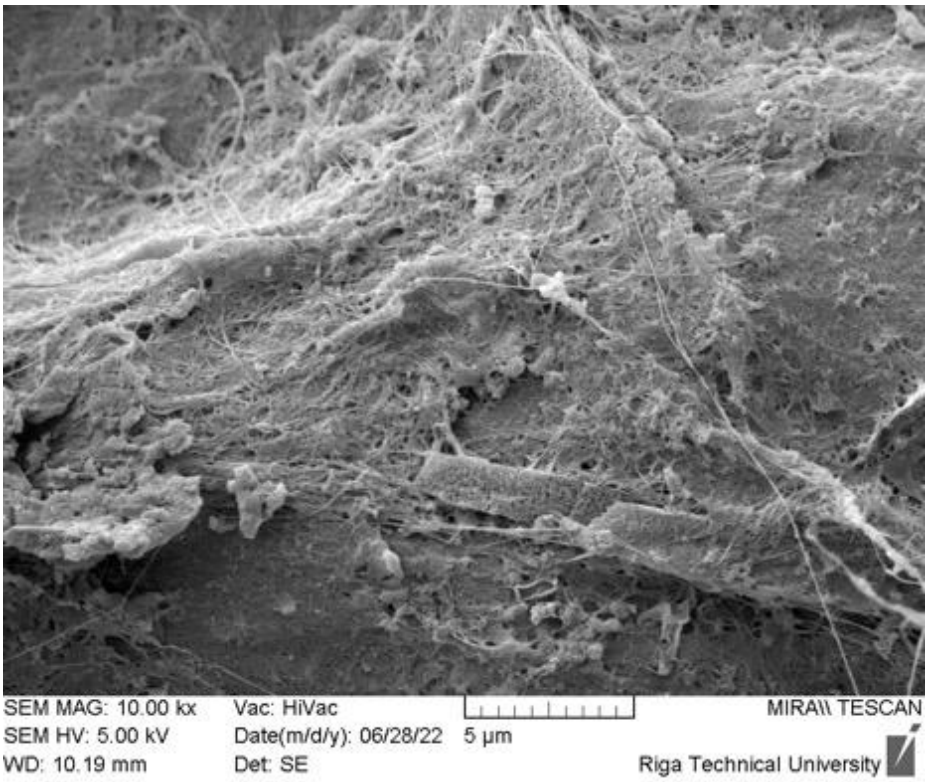
1. HS kontrole

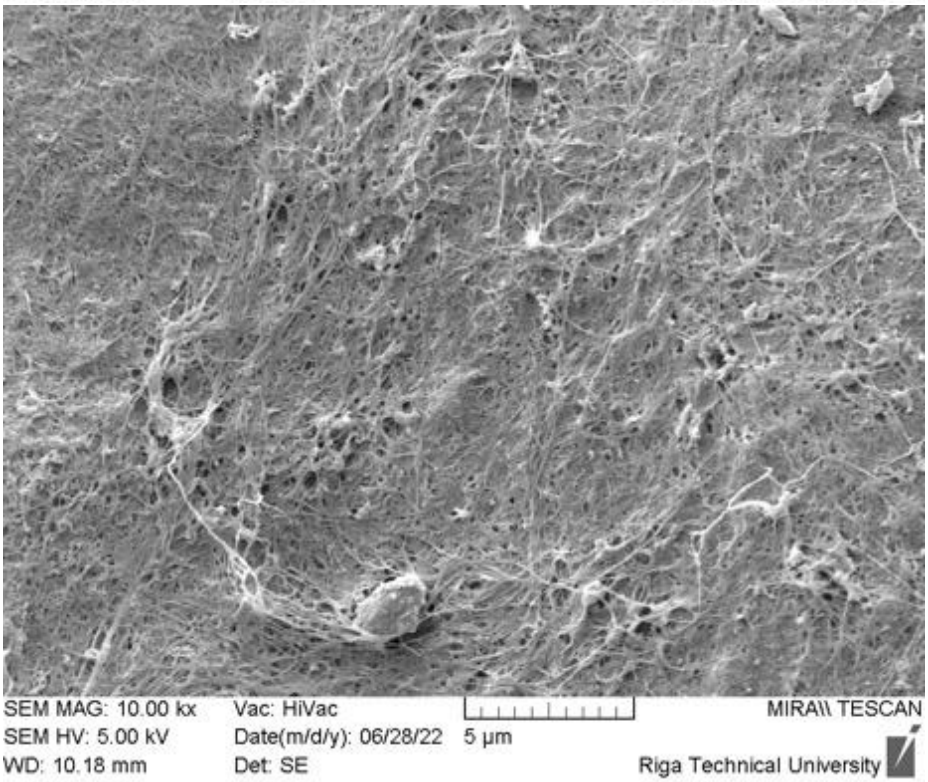


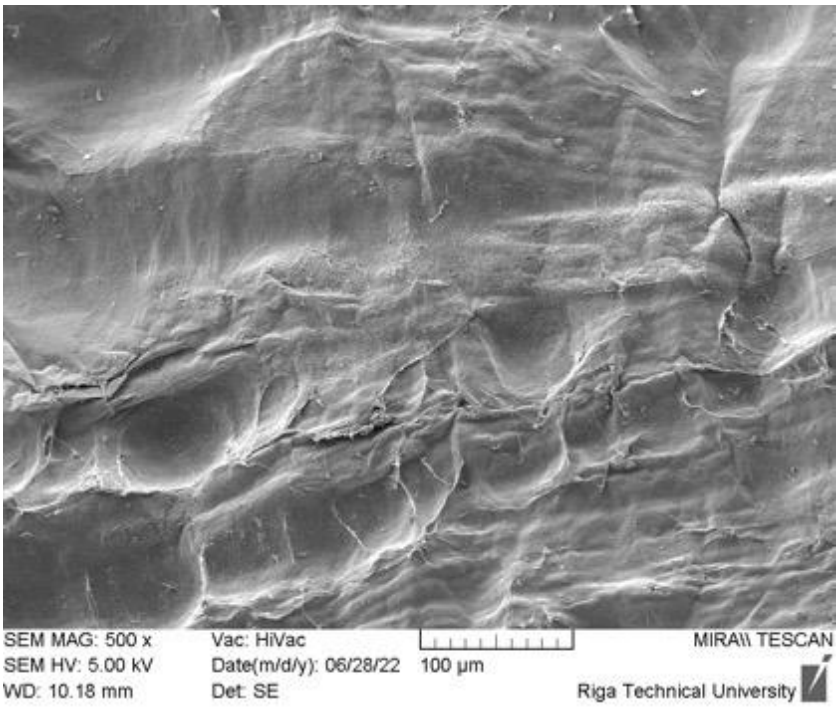



SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.19 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

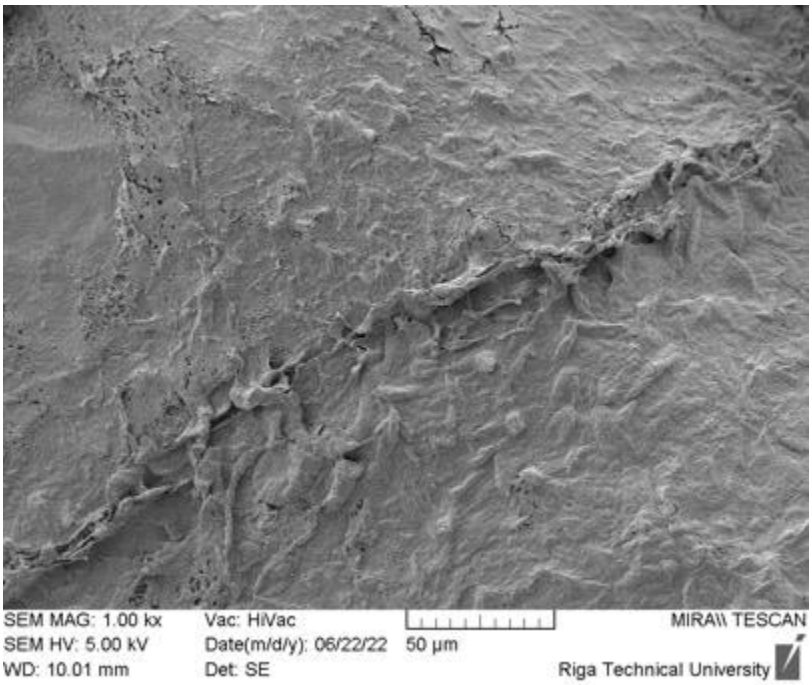

SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.18 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

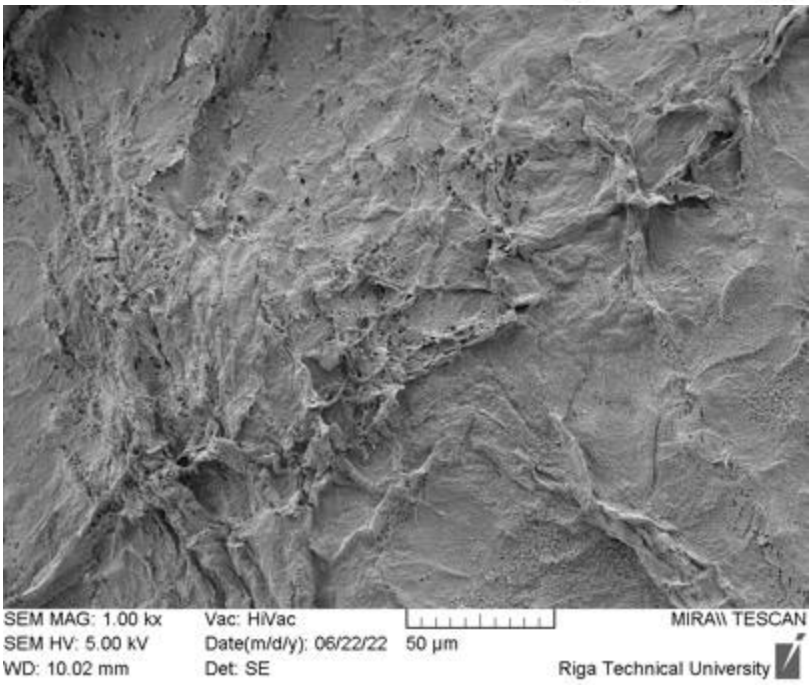

SEM MAG: 10.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.19 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
5 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

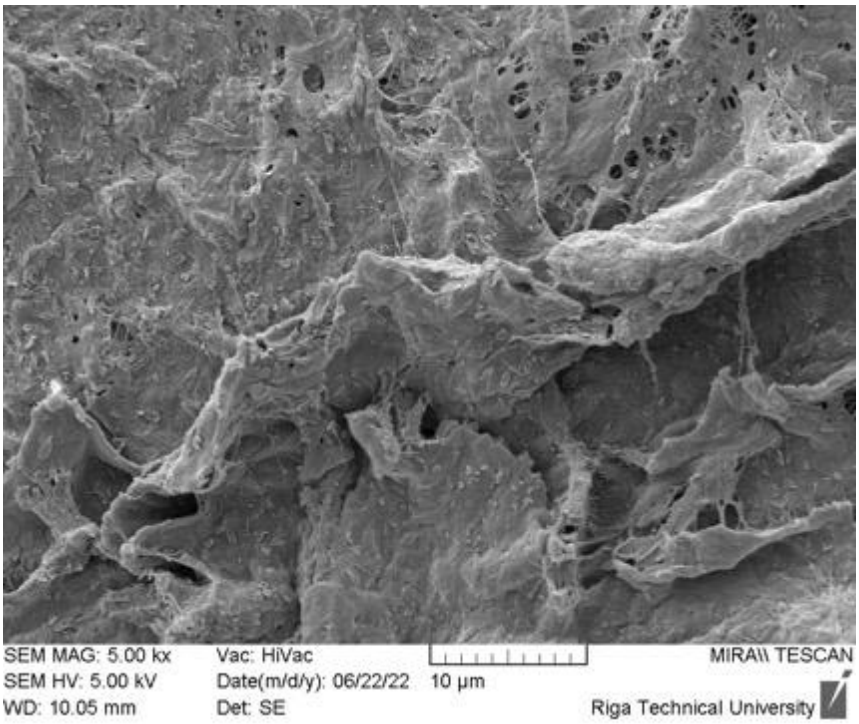

SEM MAG: 10.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.18 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
5 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

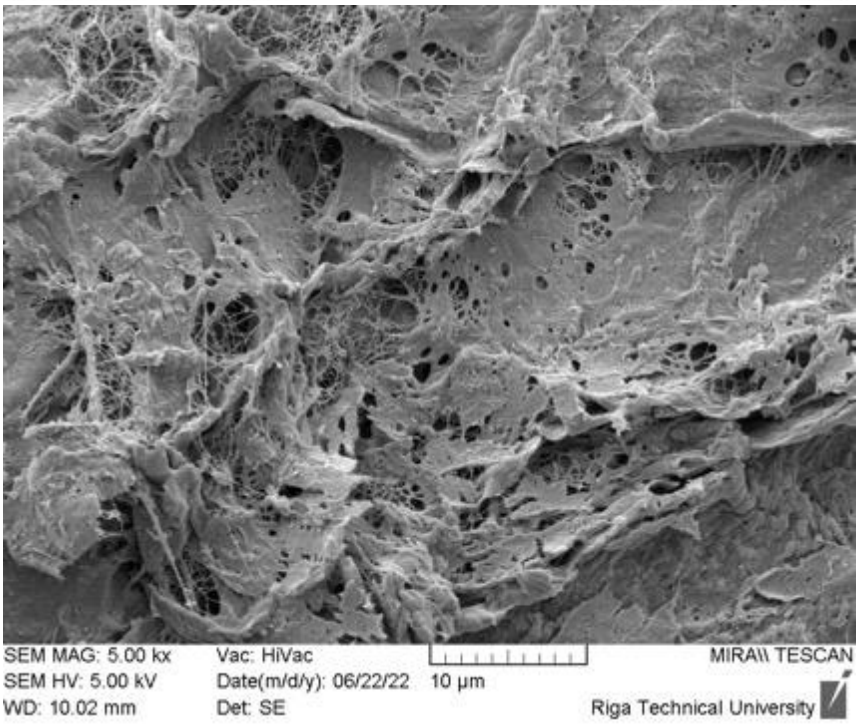

SEM MAG: 500 x
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.18 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
100 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

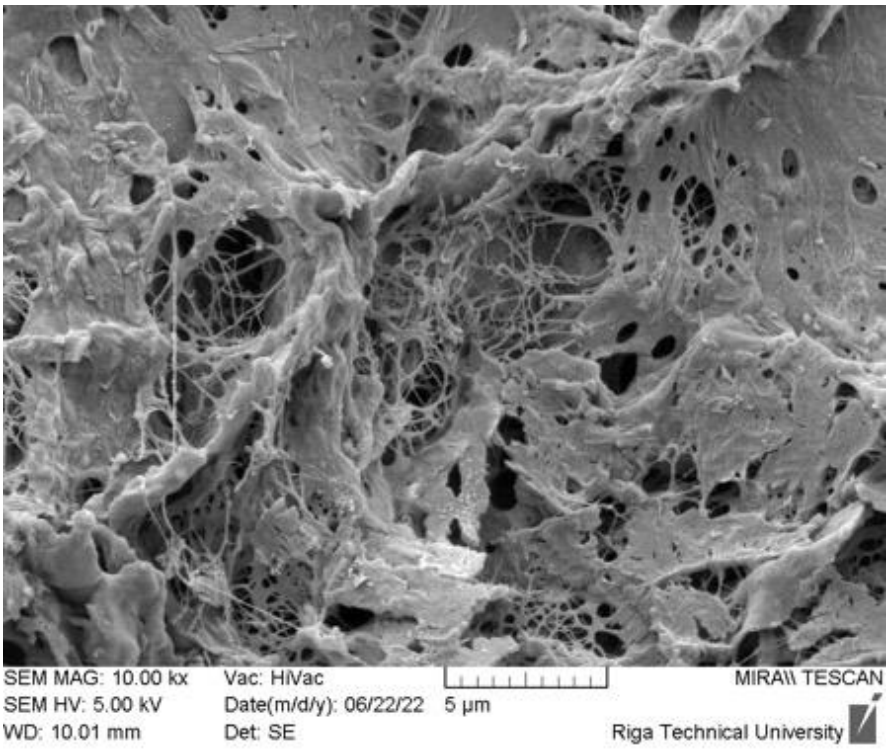
2.A.S.x7

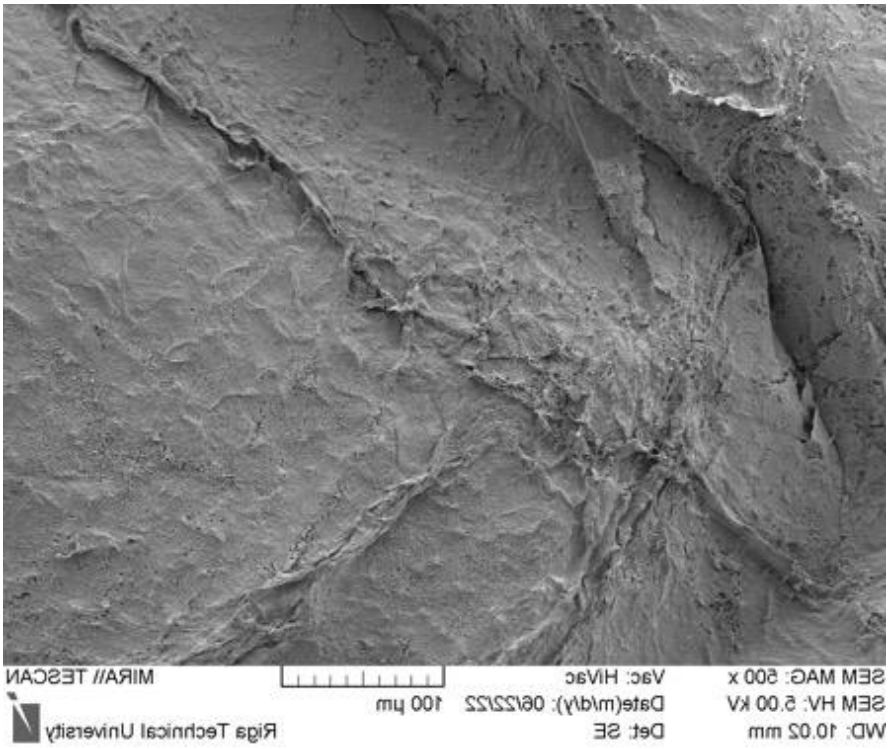

SEM MAG: 1.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.01 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
50 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University


SEM MAG: 1.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.02 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
50 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

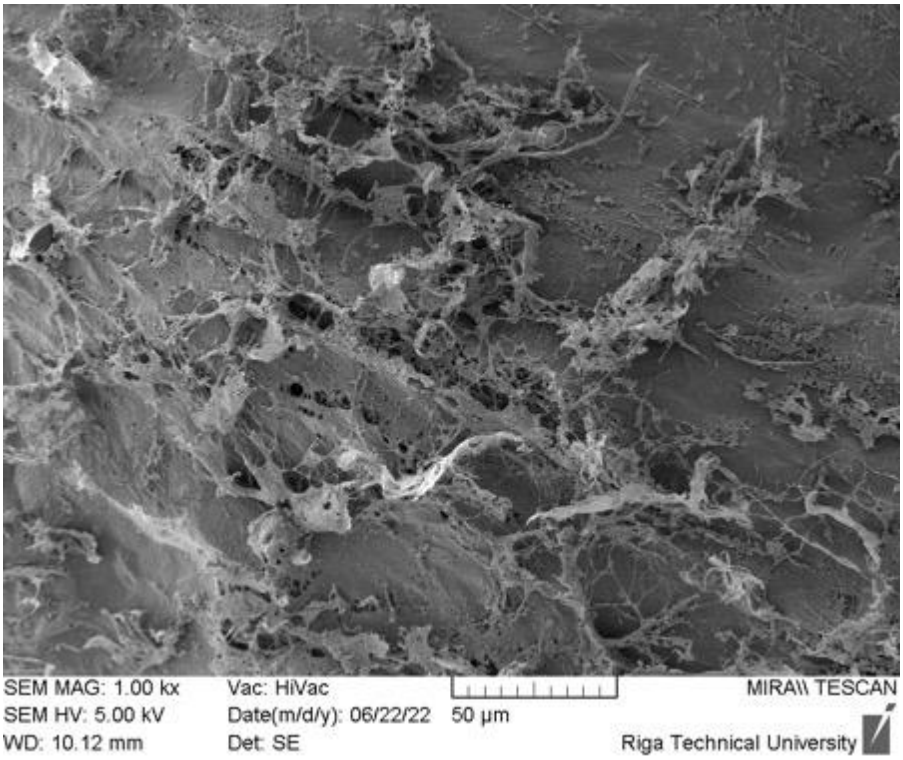

SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.05 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

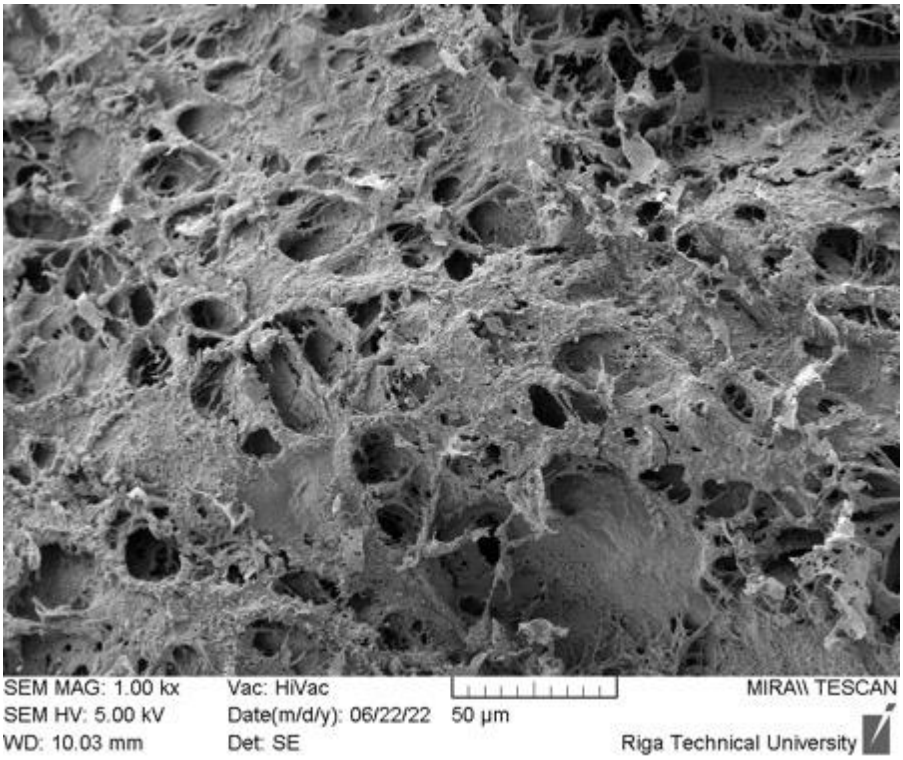

SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.02 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

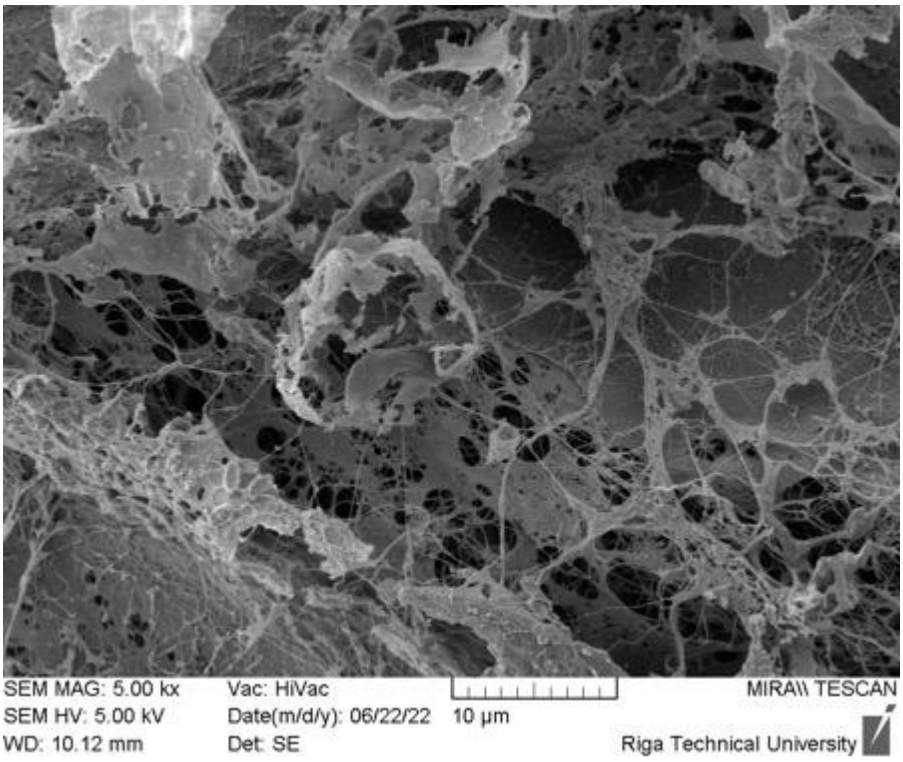

SEM MAG: 10.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.01 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
5 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

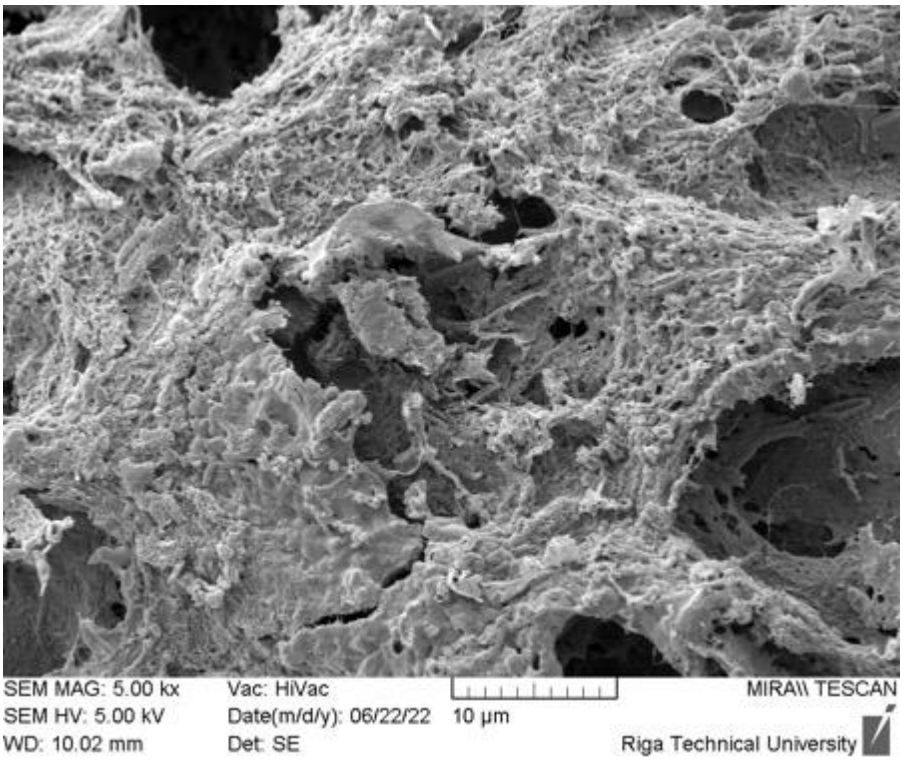

SEM MAG: 500 x
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.02 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
100 µm
MIRA// TESCAN
Riga Technical University

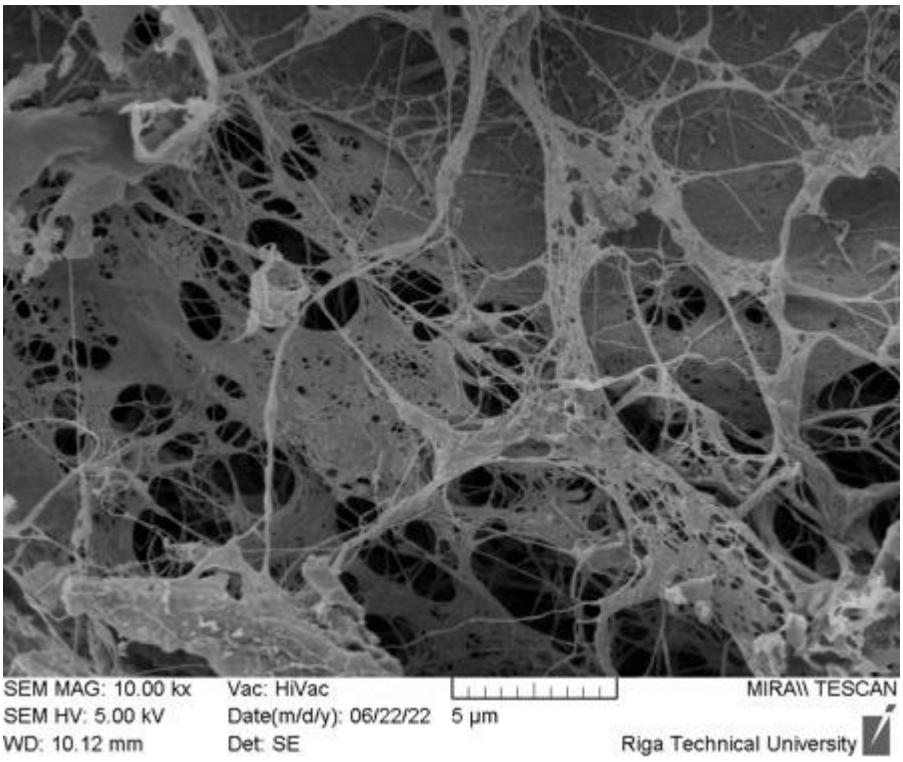
3. A.S.+g.e.x3

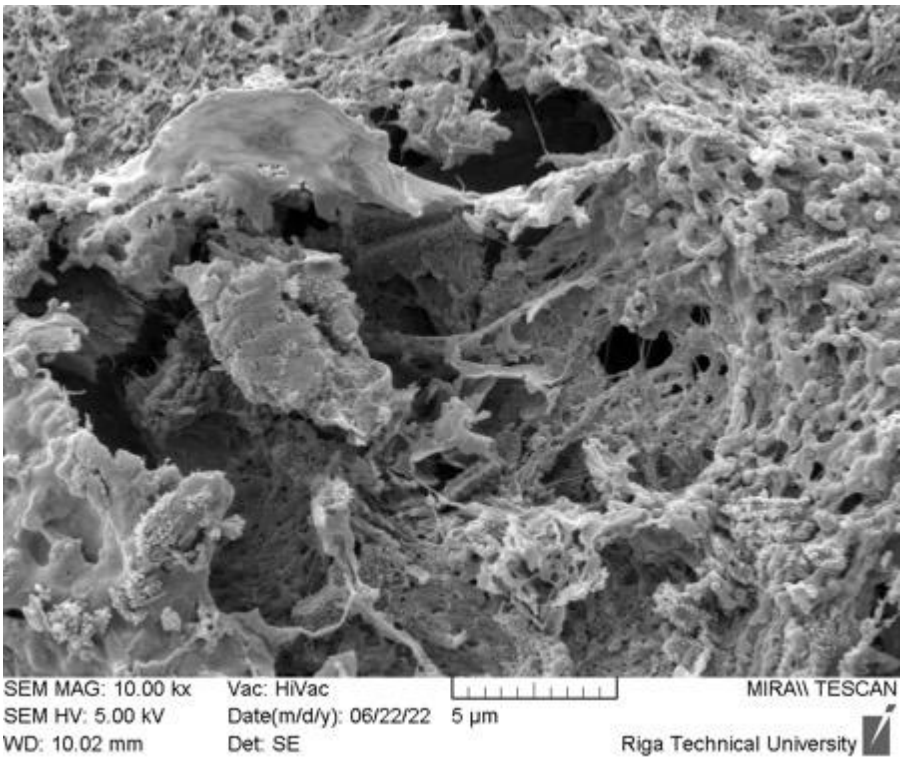

SEM MAG: 1.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.12 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
50 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

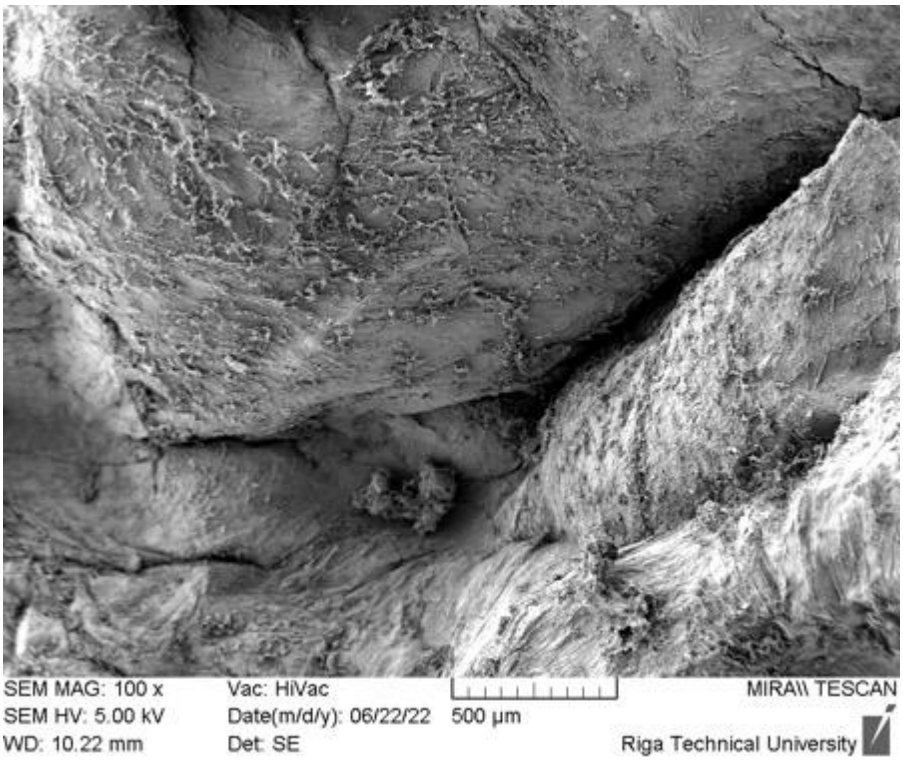

SEM MAG: 1.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.03 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
50 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

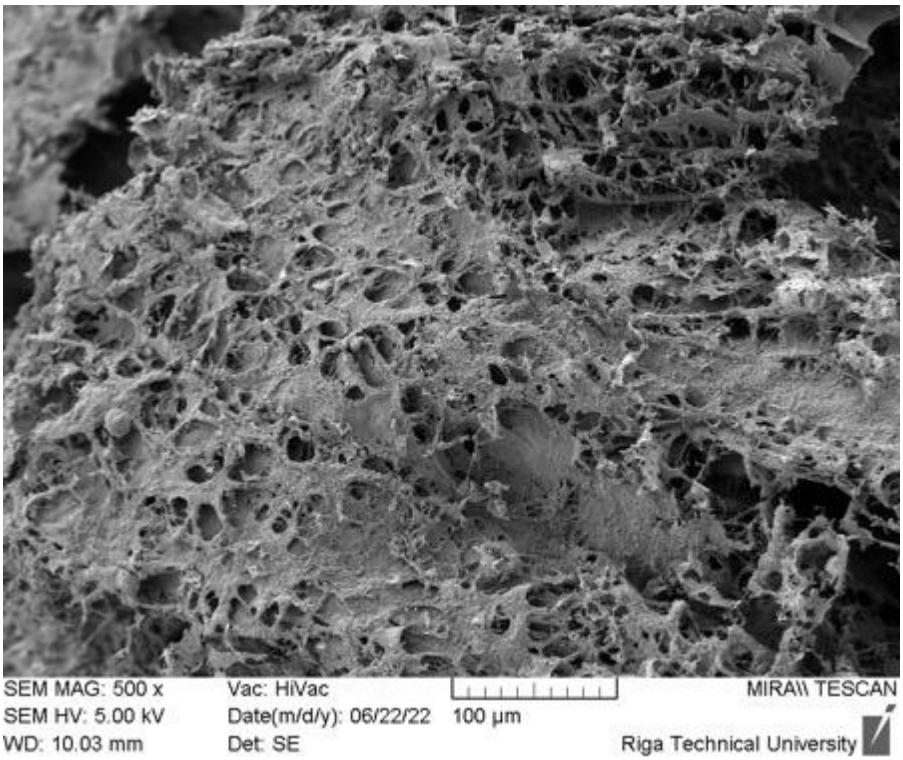

SEM MAG: 5.00 kx
Vac: HiVac
MIRA\\ TESCAN
SEM HV: 5.00 kV
Date(m/d/y): 06/22/22
10 µm
WD: 10.12 mm
Det: SE
Riga Technical University


SEM MAG: 5.00 kx
Vac: HiVac
MIRA\\ TESCAN
SEM HV: 5.00 kV
Date(m/d/y): 06/22/22
10 µm
WD: 10.02 mm
Det: SE
Riga Technical University

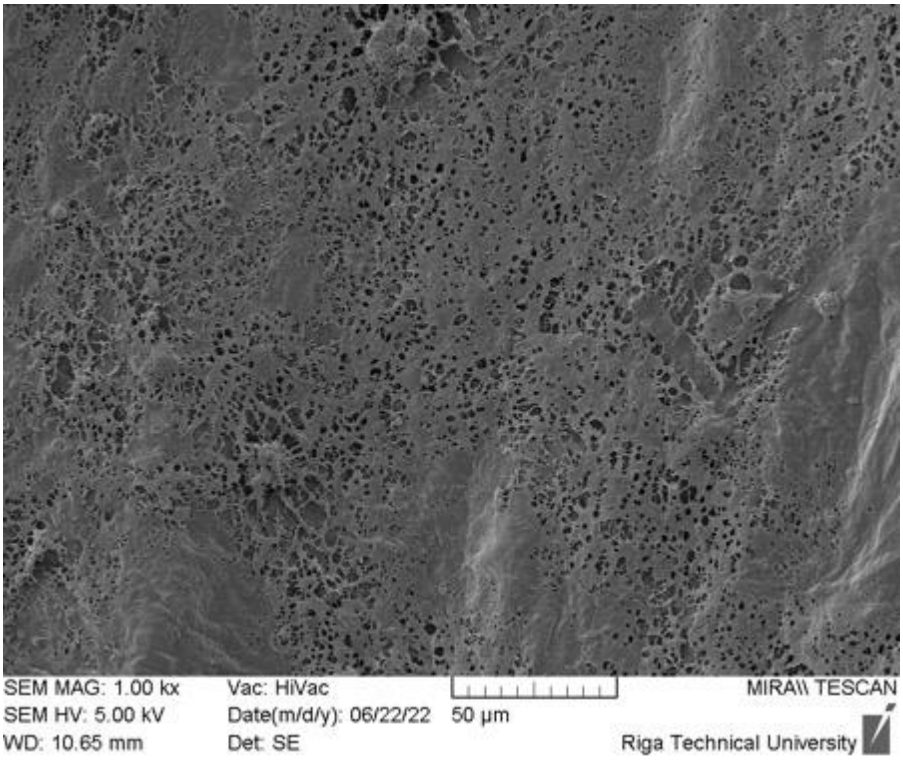

SEM MAG: 10.00 kx
Vac: HiVac
MIRA\\ TESCAN
SEM HV: 5.00 kV
Date(m/d/y): 06/22/22
5 μm
WD: 10.12 mm
Det: SE
Riga Technical University

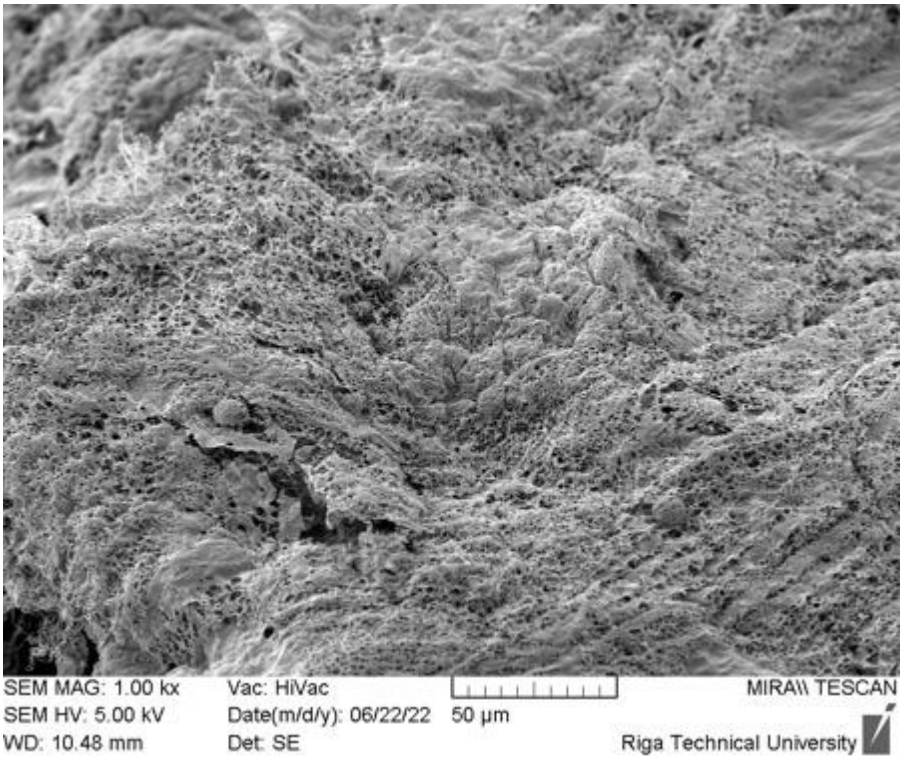

SEM MAG: 10.00 kx
Vac: HiVac
MIRA\\ TESCAN
SEM HV: 5.00 kV
Date(m/d/y): 06/22/22
5 μm
WD: 10.02 mm
Det: SE
Riga Technical University

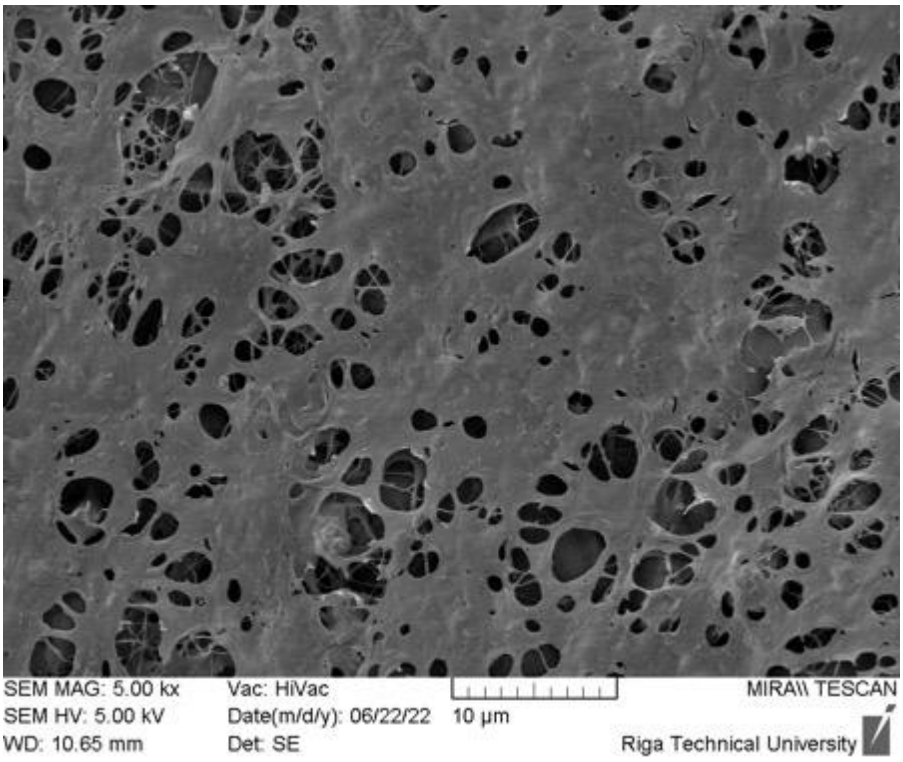

SEM MAG: 100 x
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.22 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
500 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

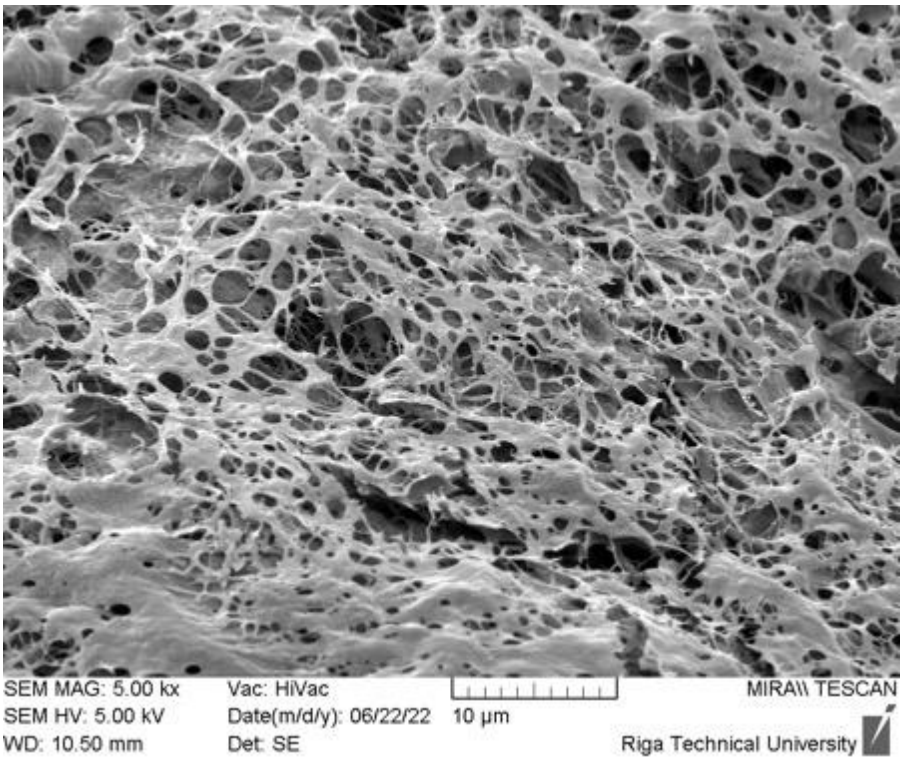

SEM MAG: 500 x
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.03 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
100 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

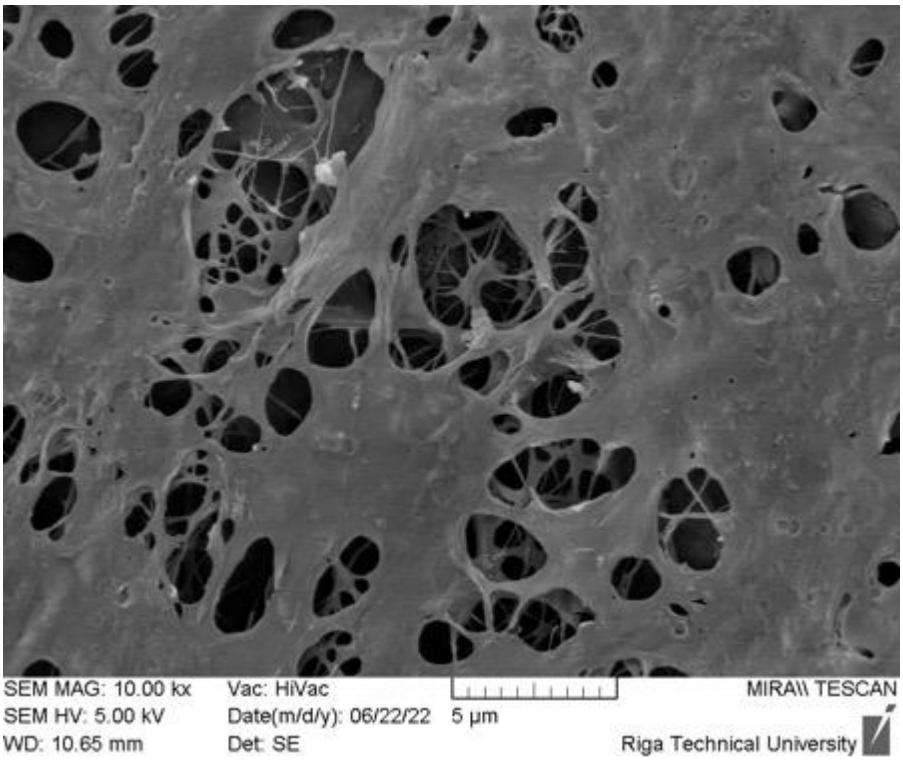
5. A.s. x1 gaļas. Eksrt.

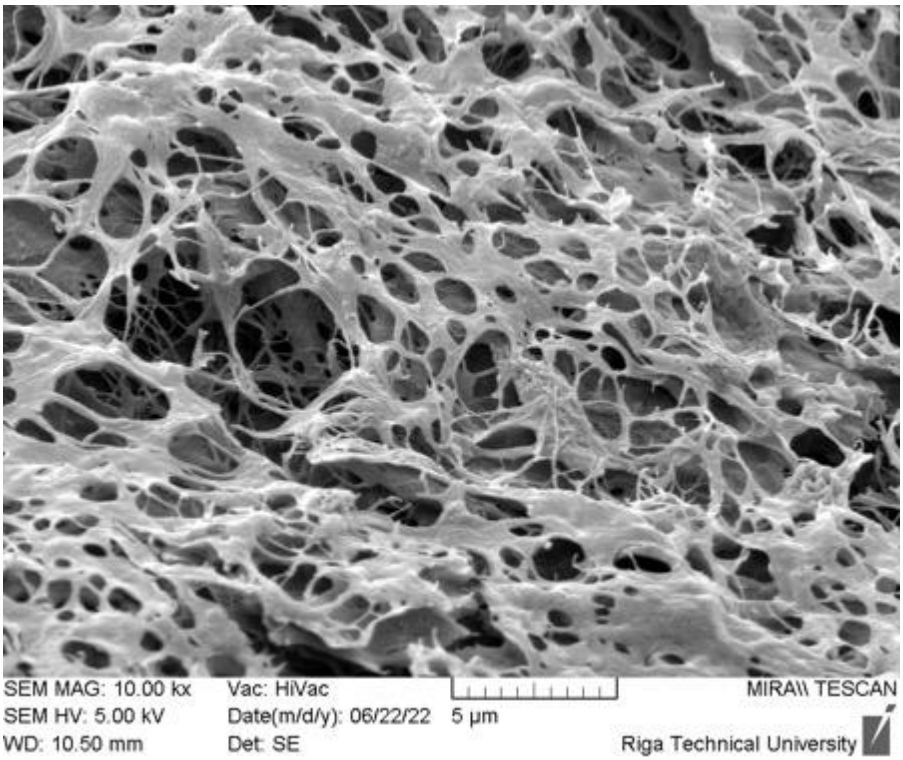


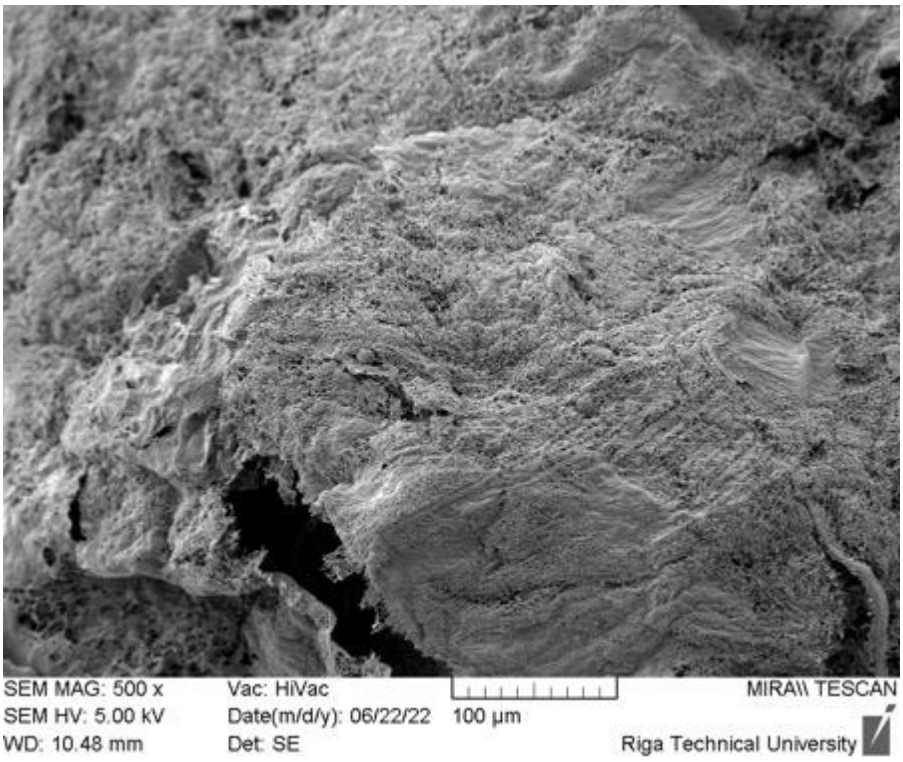



SEM MAG: 5.00 kx
Vac: HiVac
MIRA\\ TESCAN
SEM HV: 5.00 kV
Date(m/d/y): 06/22/22
10 µm
WD: 10.65 mm
Det: SE
Riga Technical University

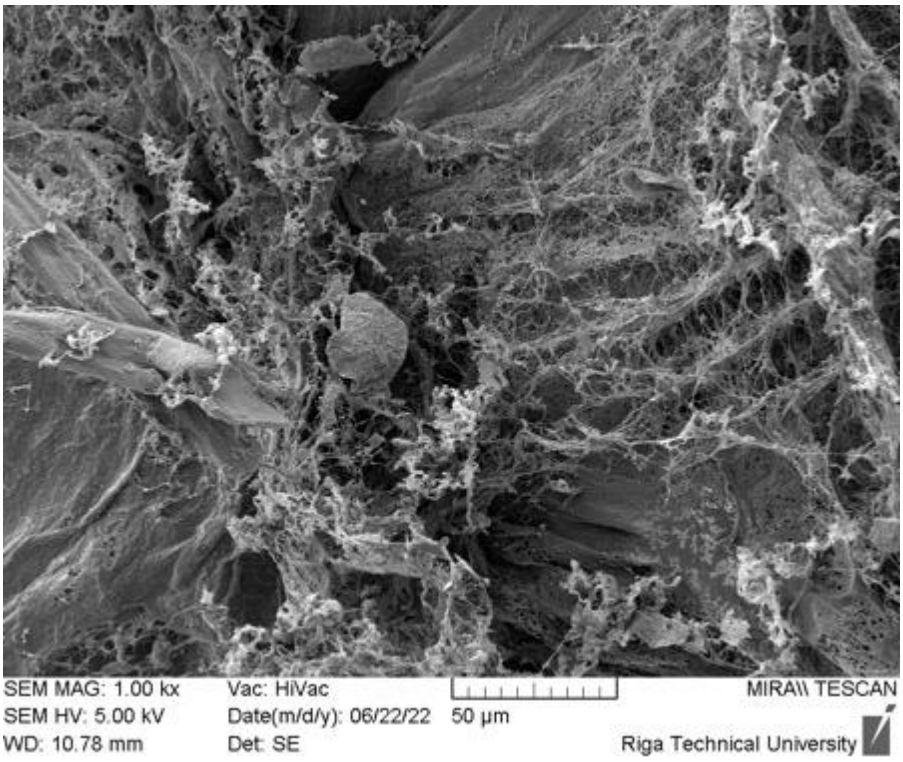

SEM MAG: 5.00 kx
Vac: HiVac
MIRA\\ TESCAN
SEM HV: 5.00 kV
Date(m/d/y): 06/22/22
10 µm
WD: 10.50 mm
Det: SE
Riga Technical University

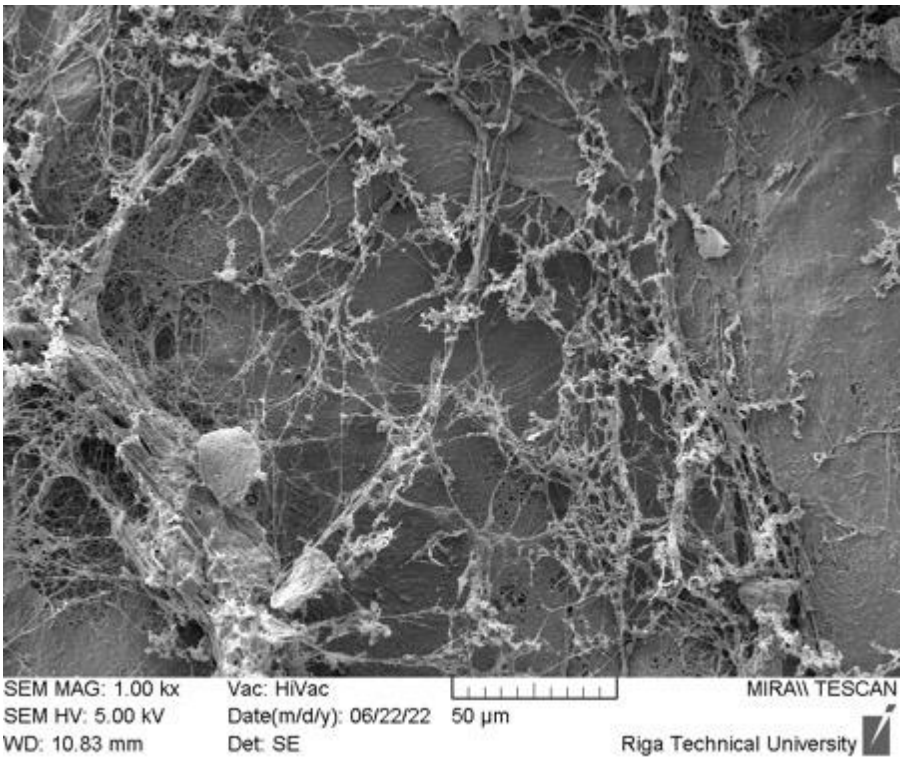

SEM MAG: 10.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.65 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
5 μm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

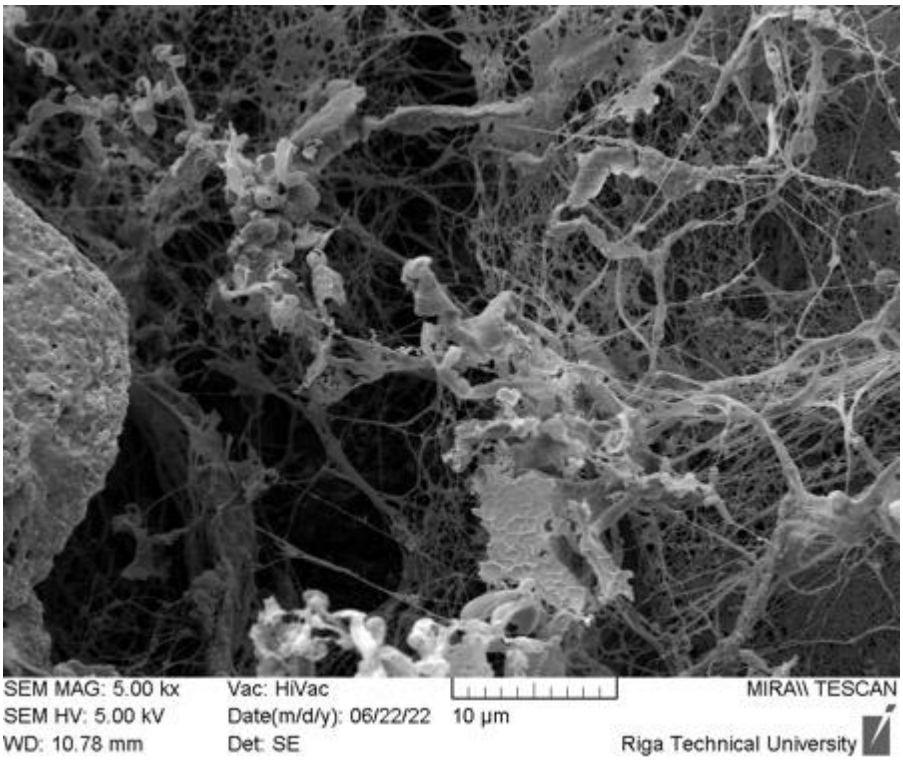

SEM MAG: 10.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.50 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
5 μm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

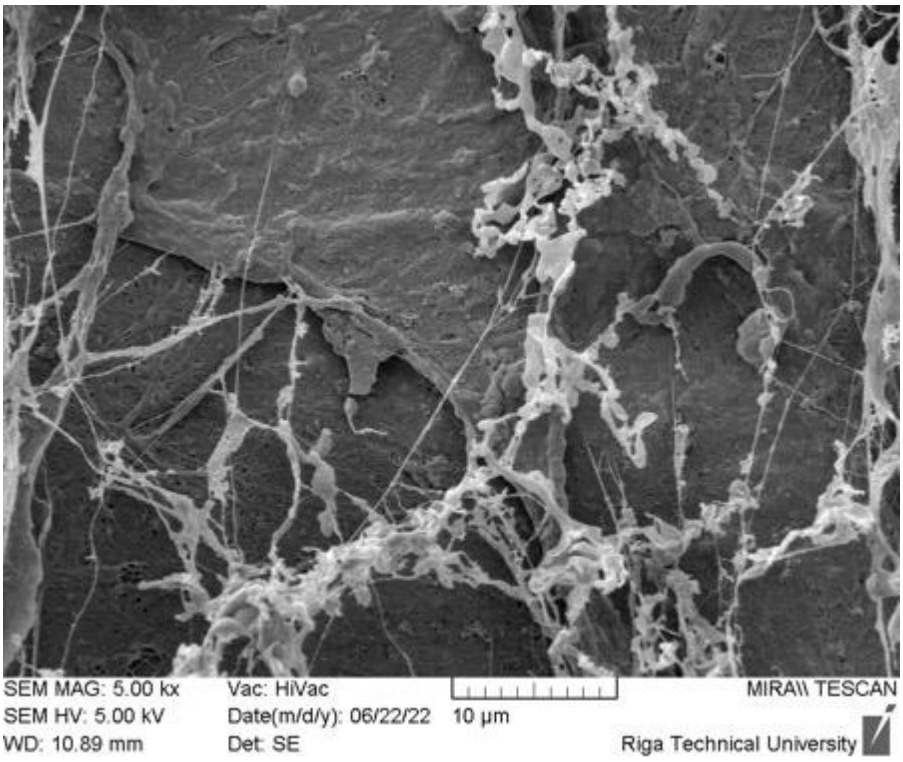

SEM MAG: 500 x
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.48 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
100 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

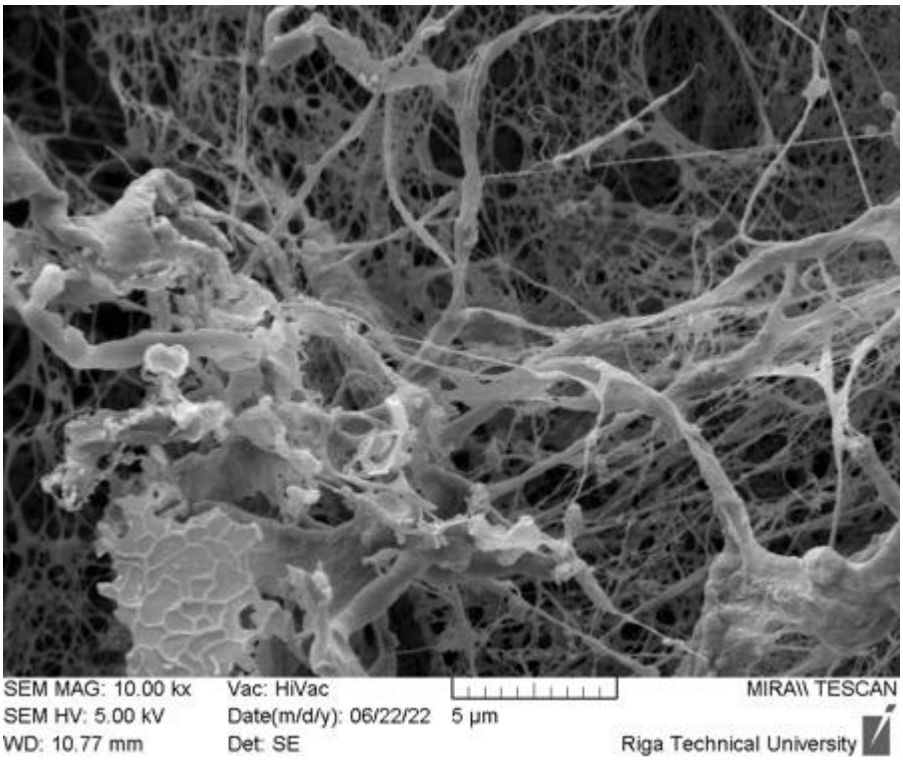
5. HS kontrole

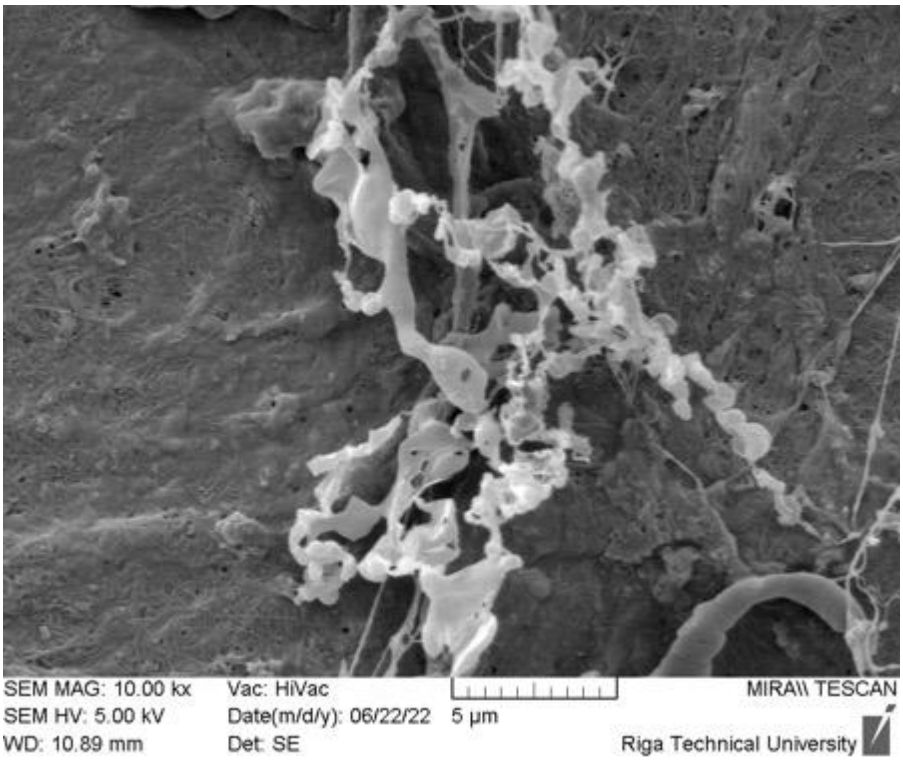


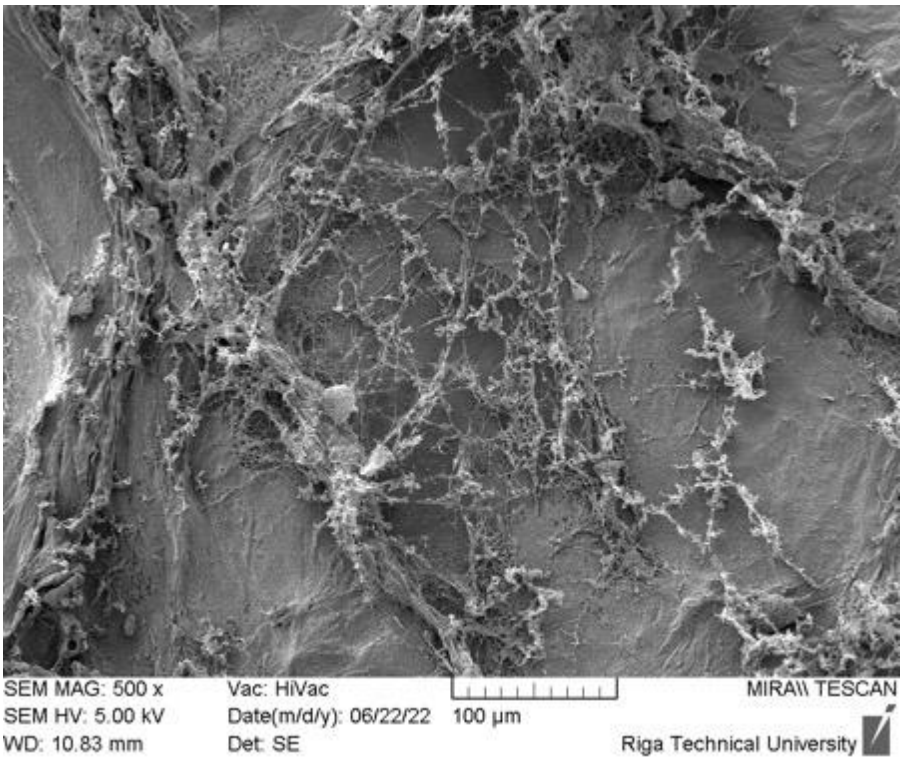



SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.78 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

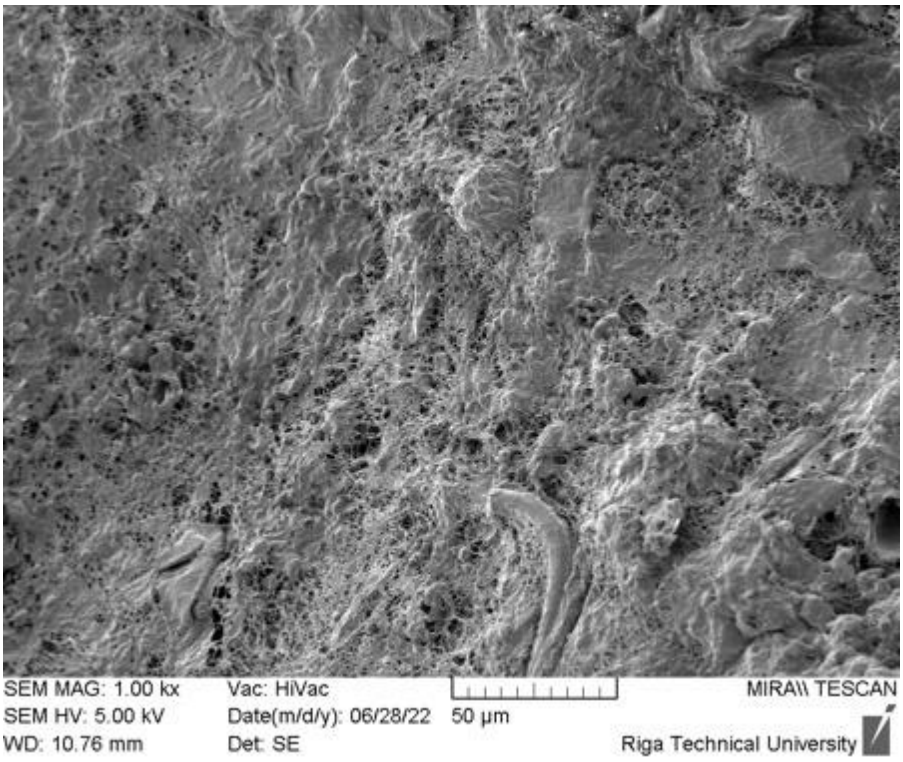

SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.89 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

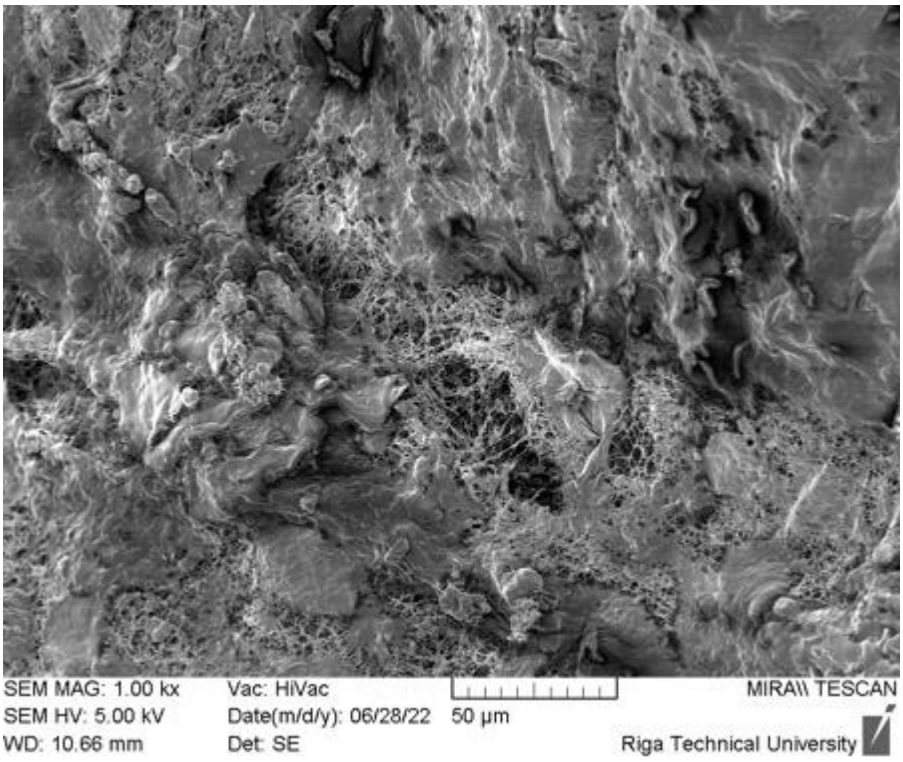

SEM MAG: 10.00 kx
Vac: HiVac
MIRA\\ TESCAN
SEM HV: 5.00 kV
Date(m/d/y): 06/22/22
5 μm
WD: 10.77 mm
Det: SE
Riga Technical University

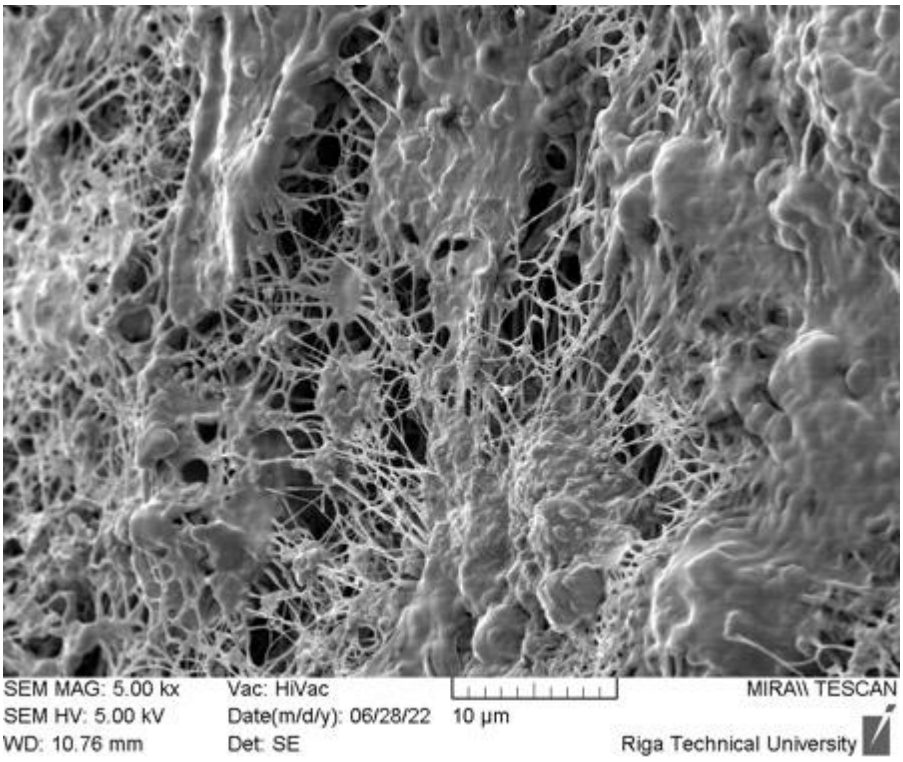

SEM MAG: 10.00 kx
Vac: HiVac
MIRA\\ TESCAN
SEM HV: 5.00 kV
Date(m/d/y): 06/22/22
5 μm
WD: 10.89 mm
Det: SE
Riga Technical University

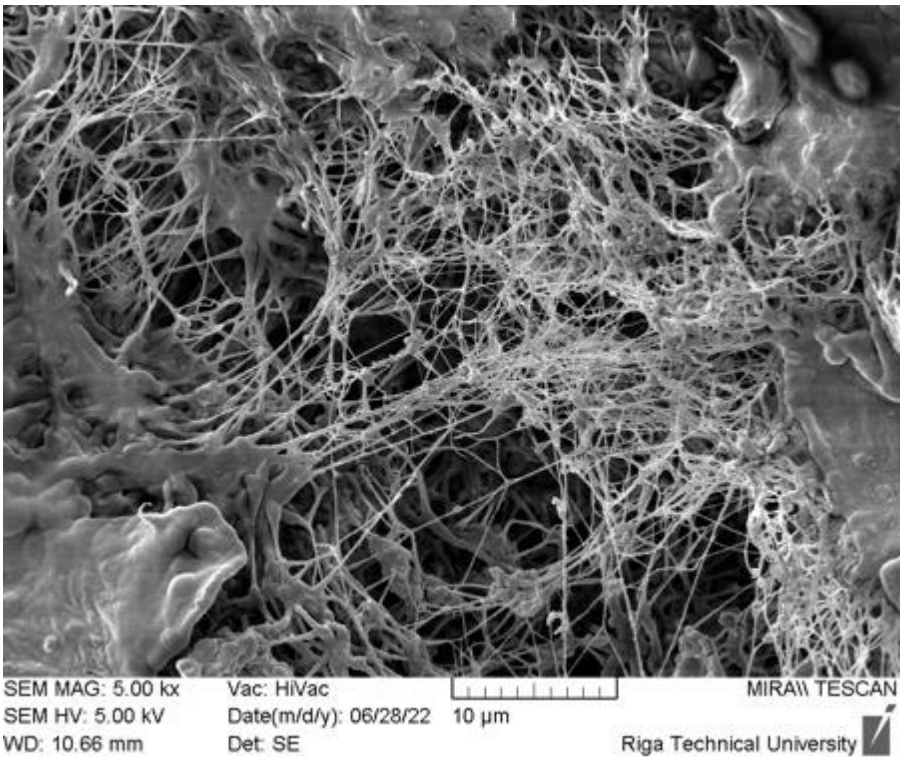

SEM MAG: 500 x
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.83 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/22/22
Det: SE
100 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

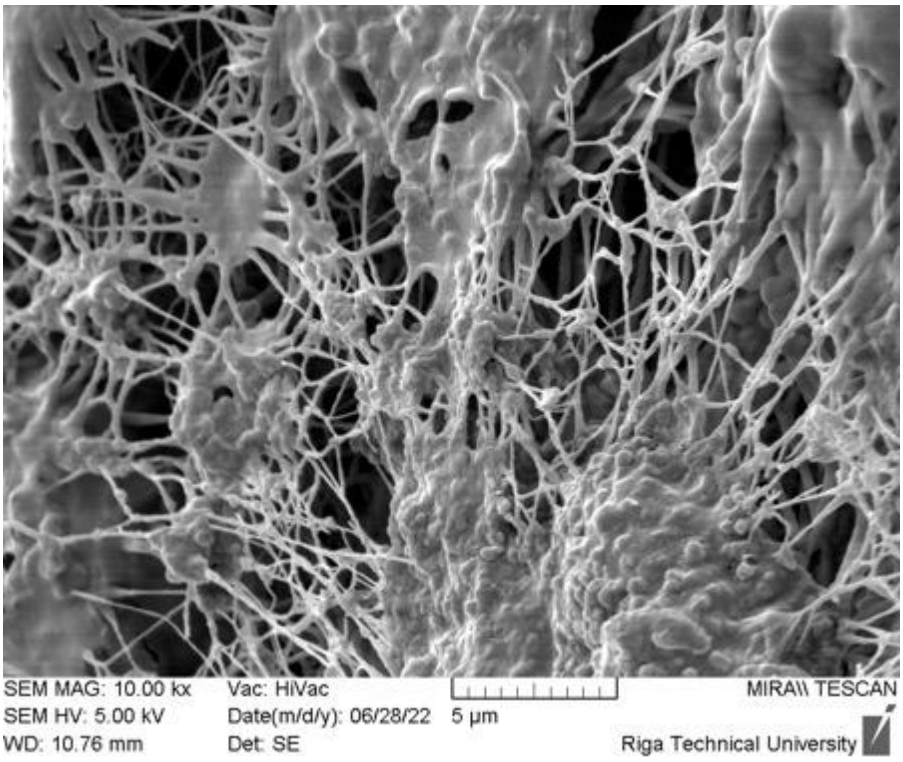
6. Sūkalas kontrole

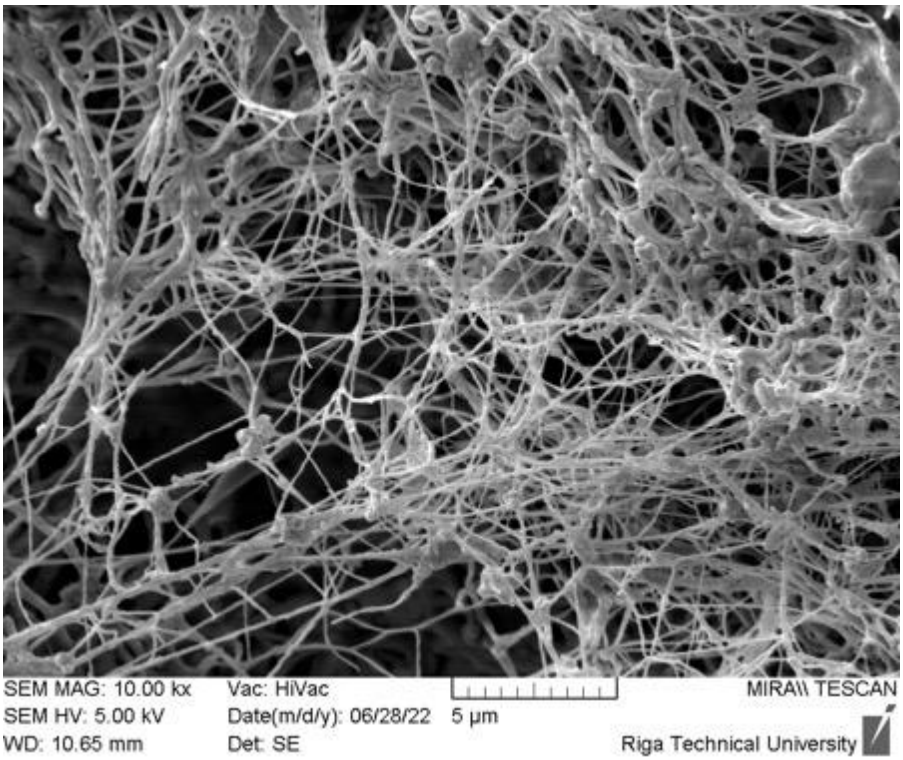


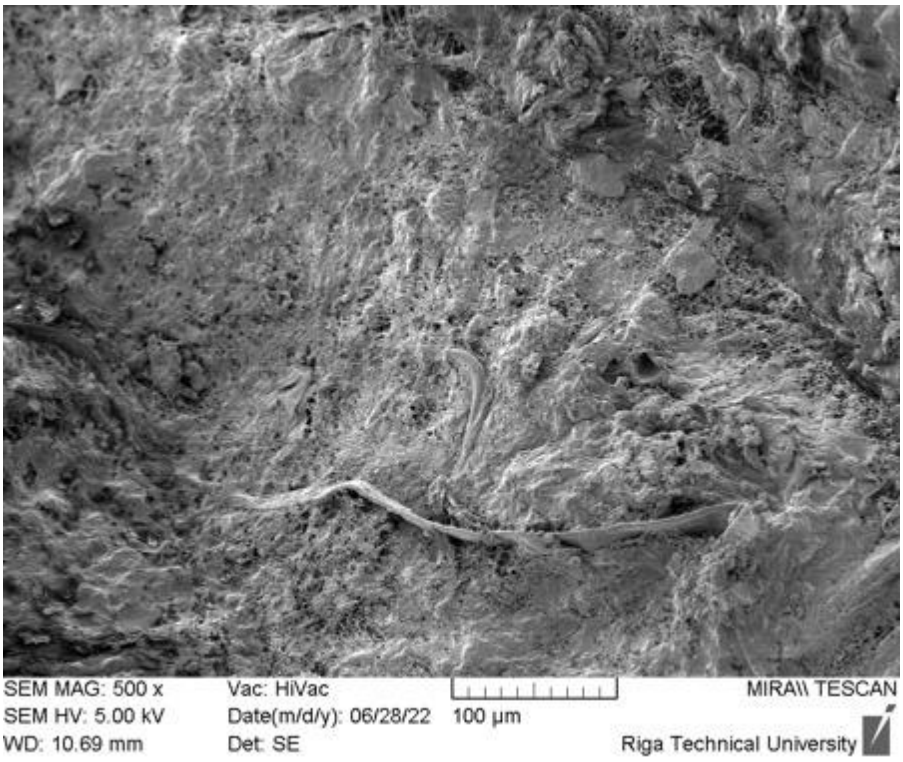


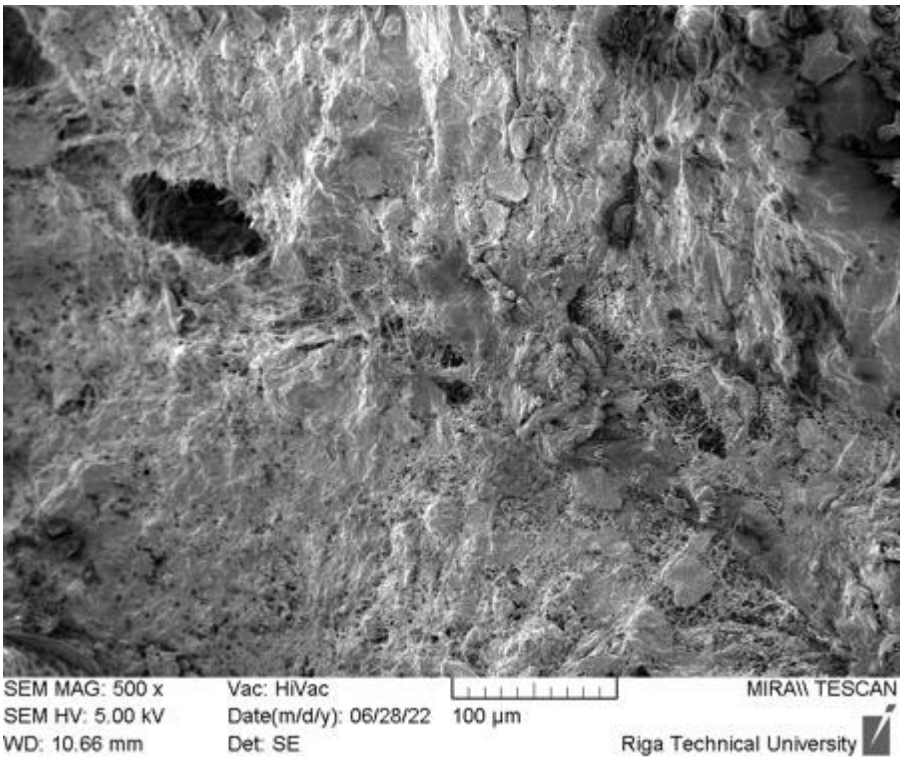

SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.76 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University


SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.66 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

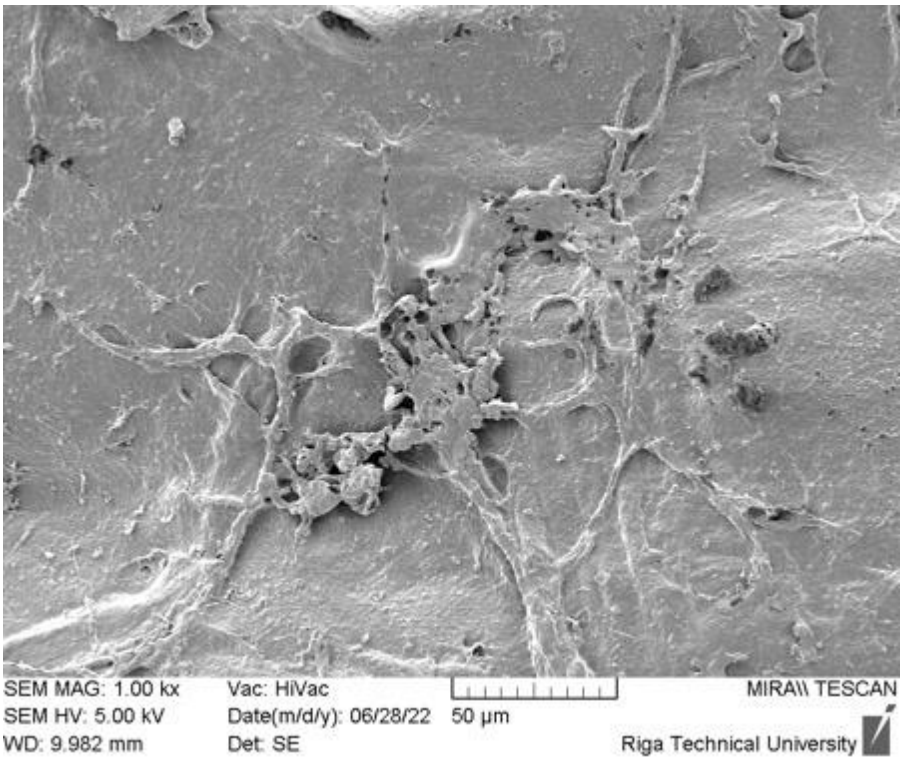

SEM MAG: 10.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.76 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
5 μm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

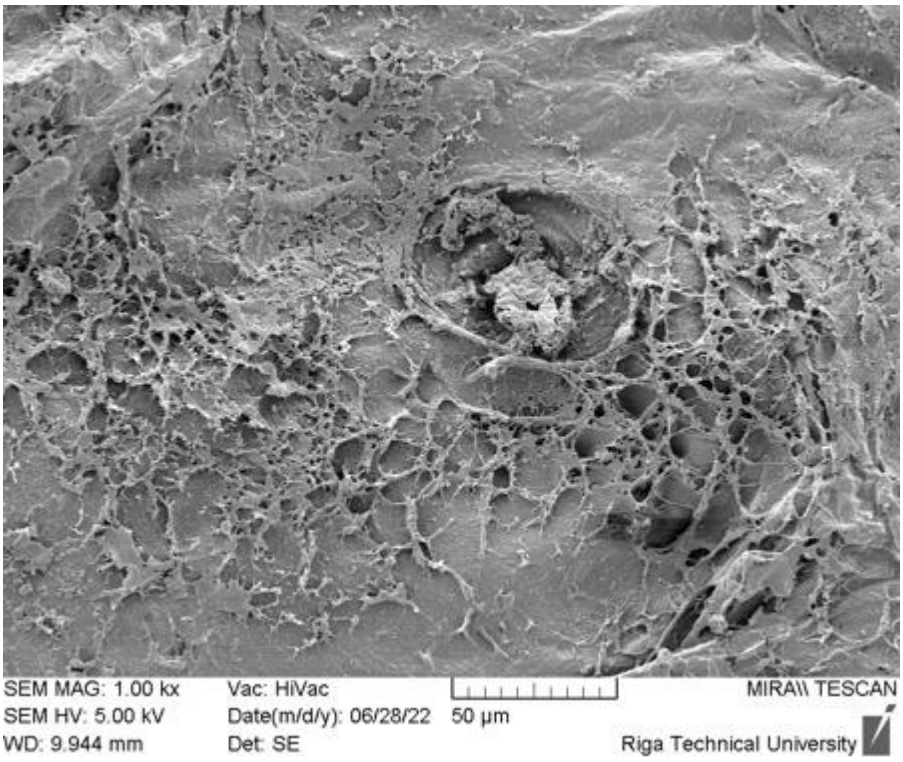

SEM MAG: 10.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.65 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
5 μm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

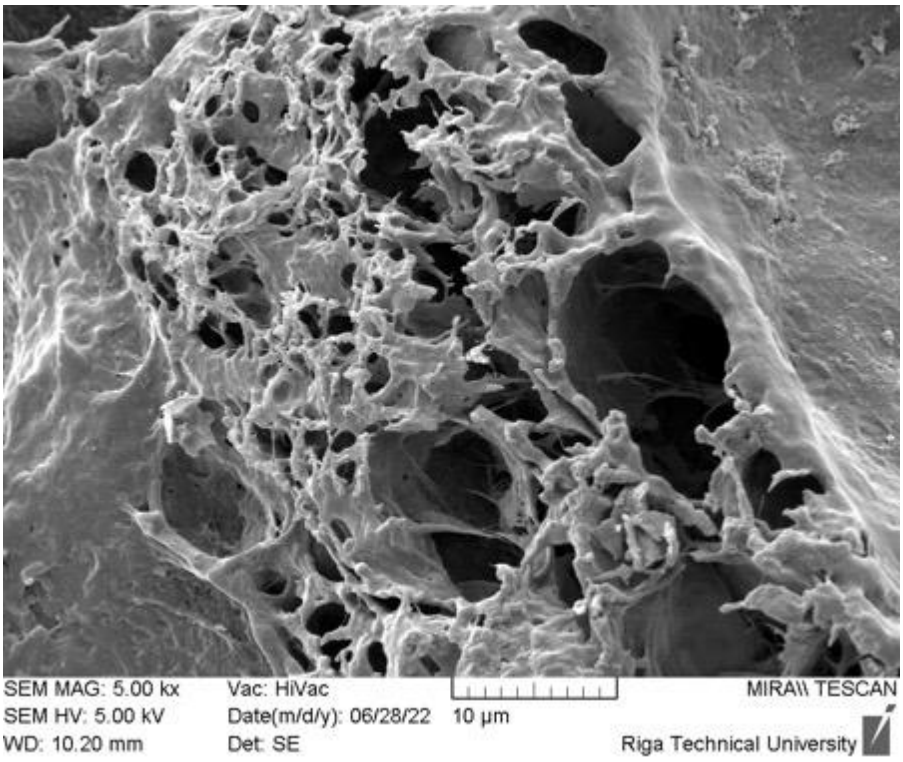

SEM MAG: 500 x
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.69 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
100 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

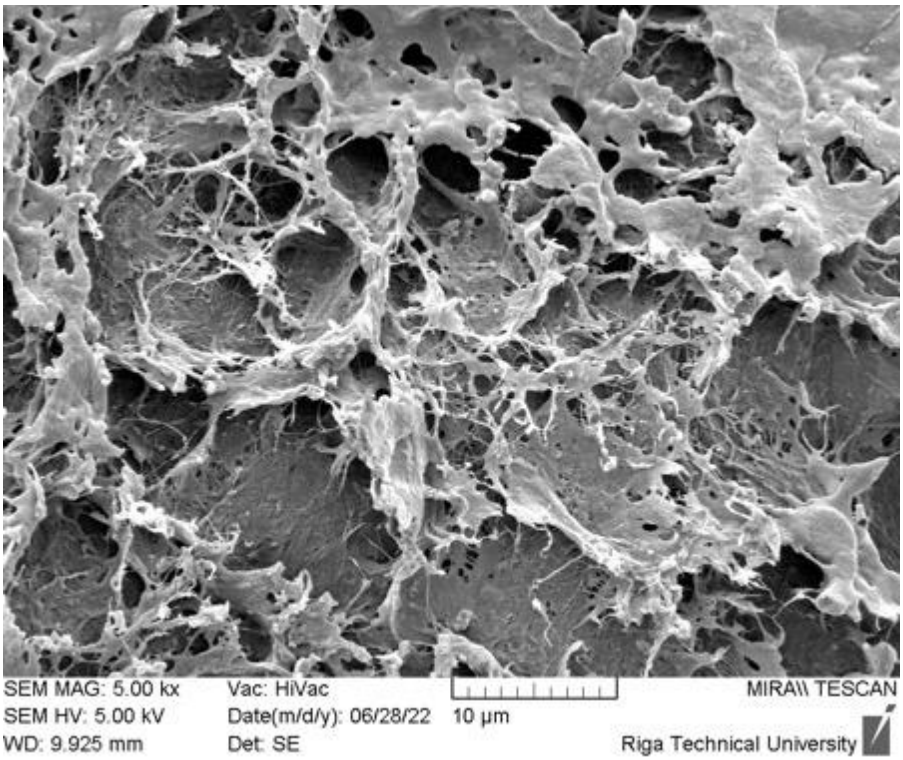

SEM MAG: 500 x
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.66 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
100 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

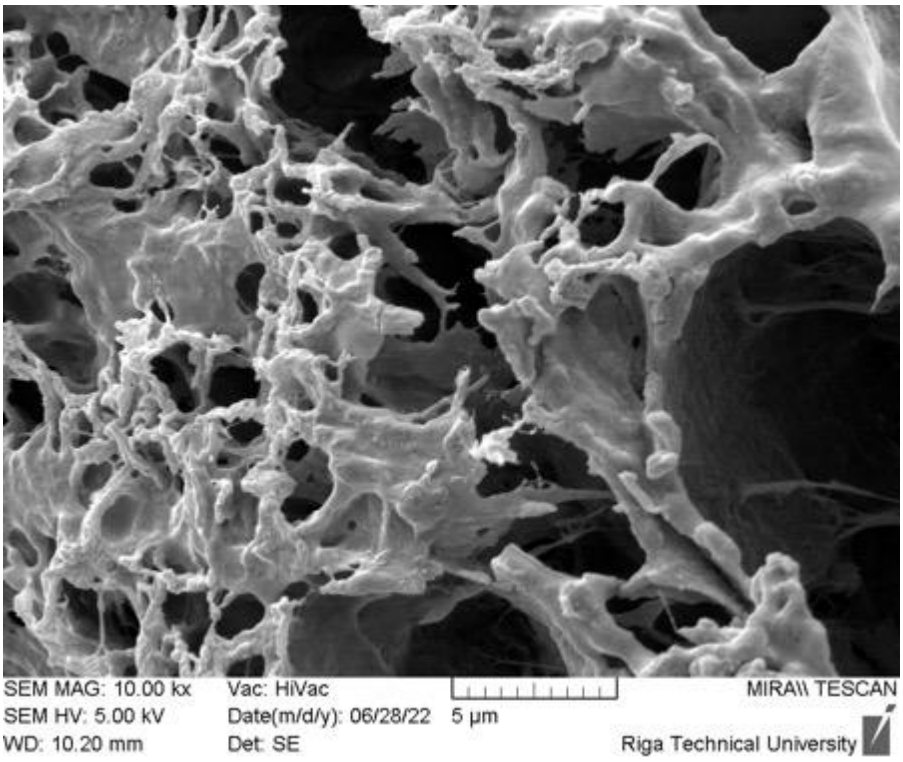
7. Sūkalas ar enzīmiem

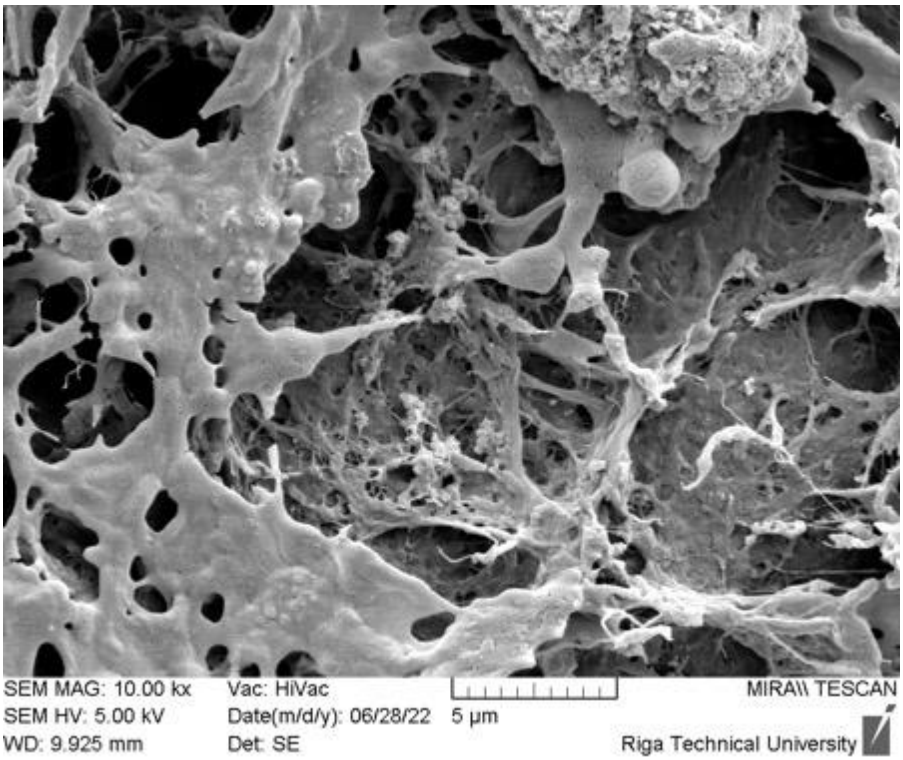


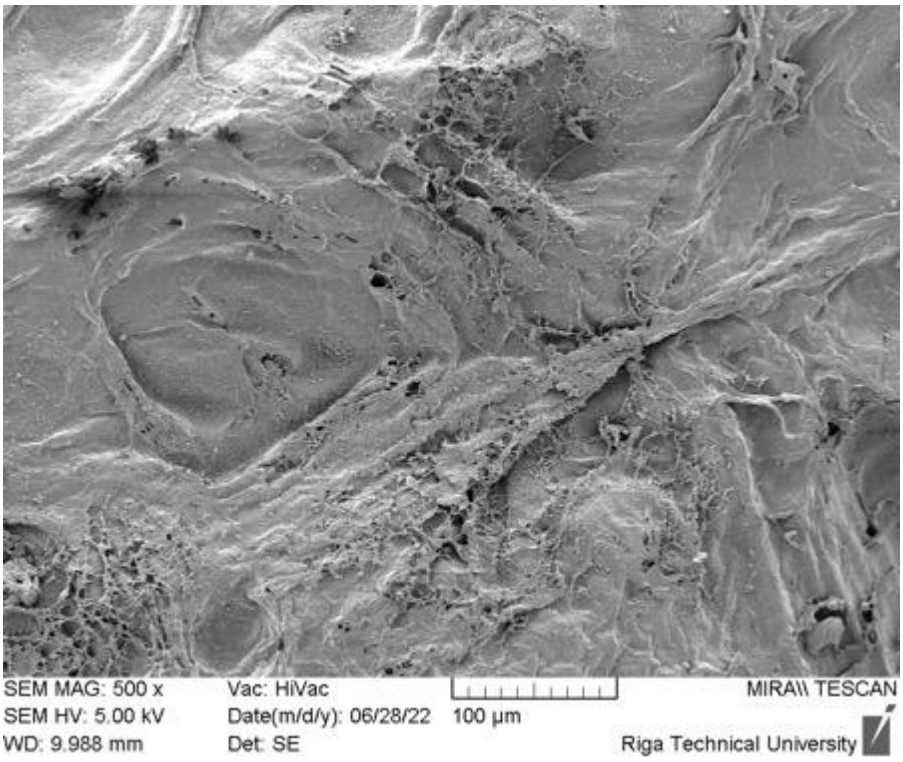



SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.20 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

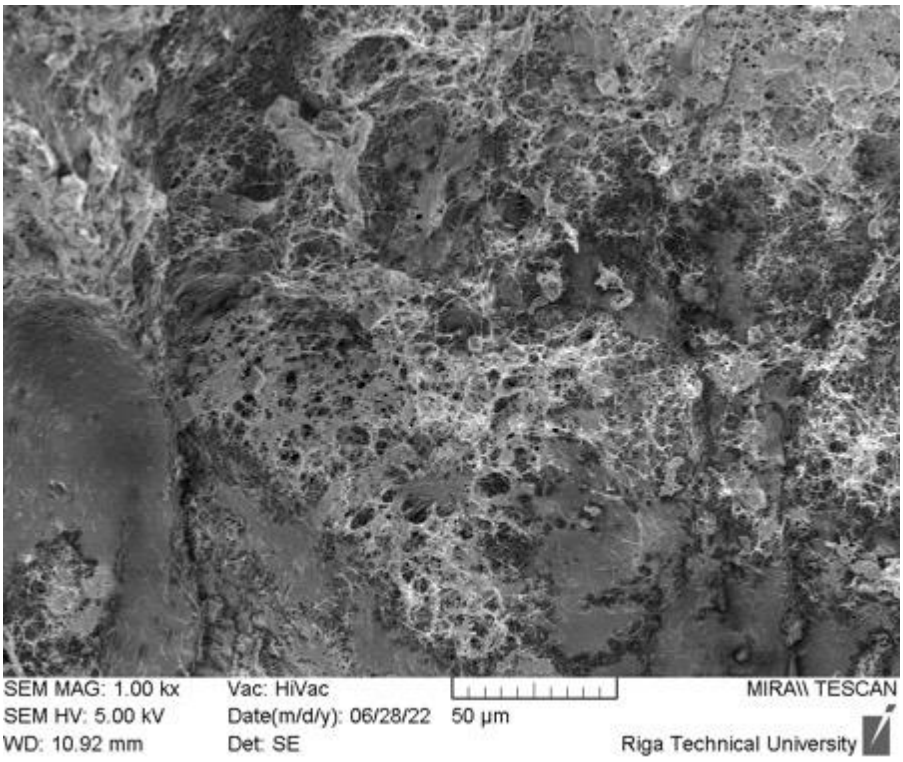

SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 9.925 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

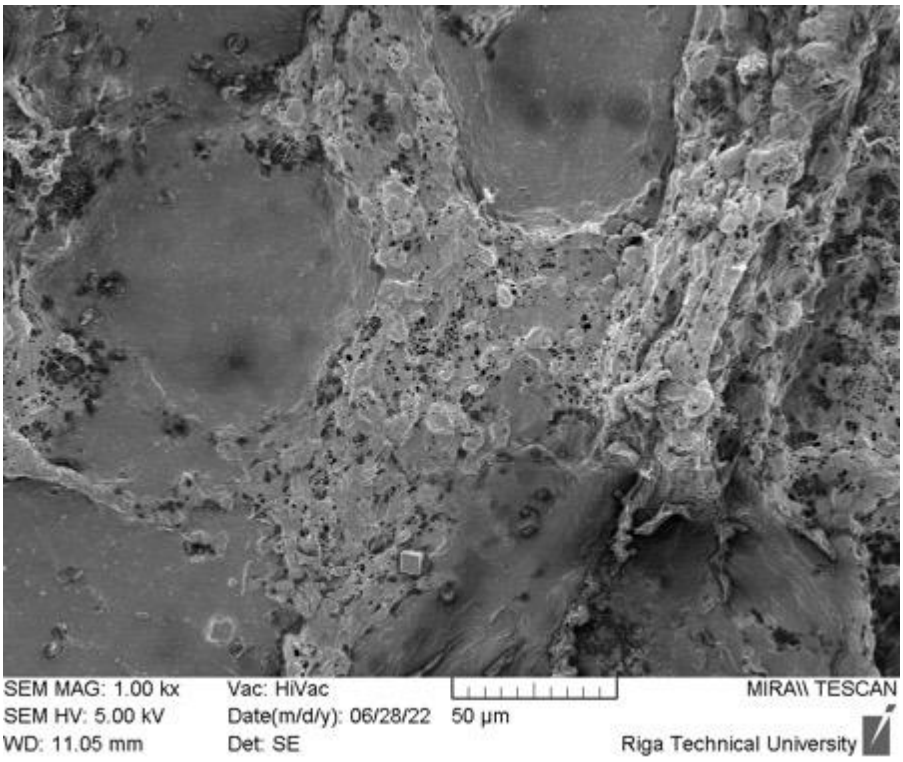

SEM MAG: 10.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.20 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
5 μm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

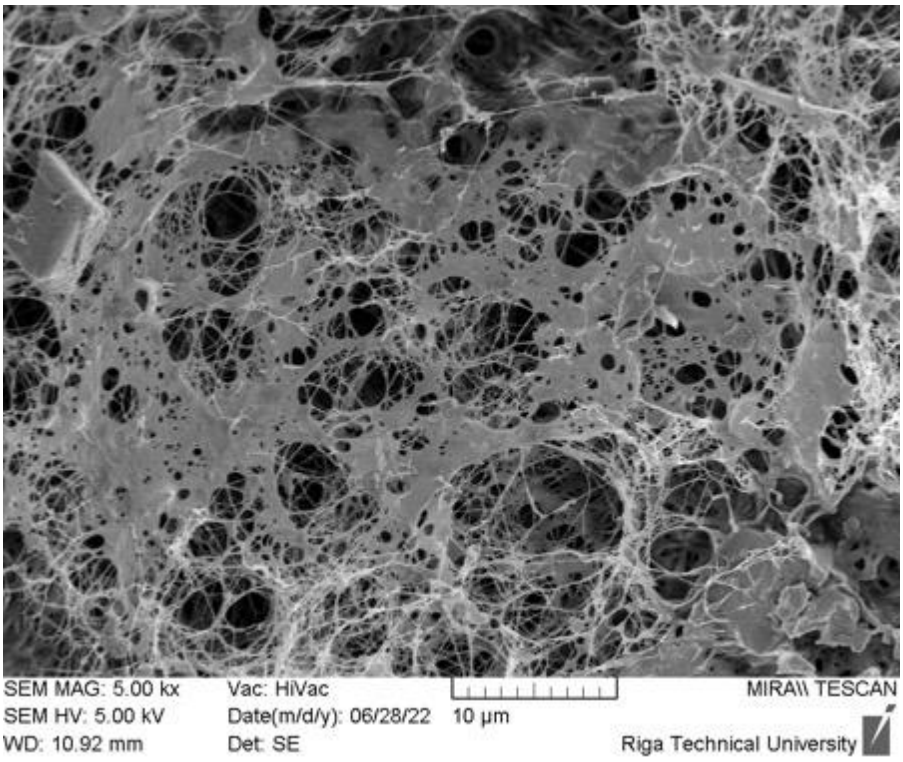

SEM MAG: 10.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 9.925 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
5 μm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

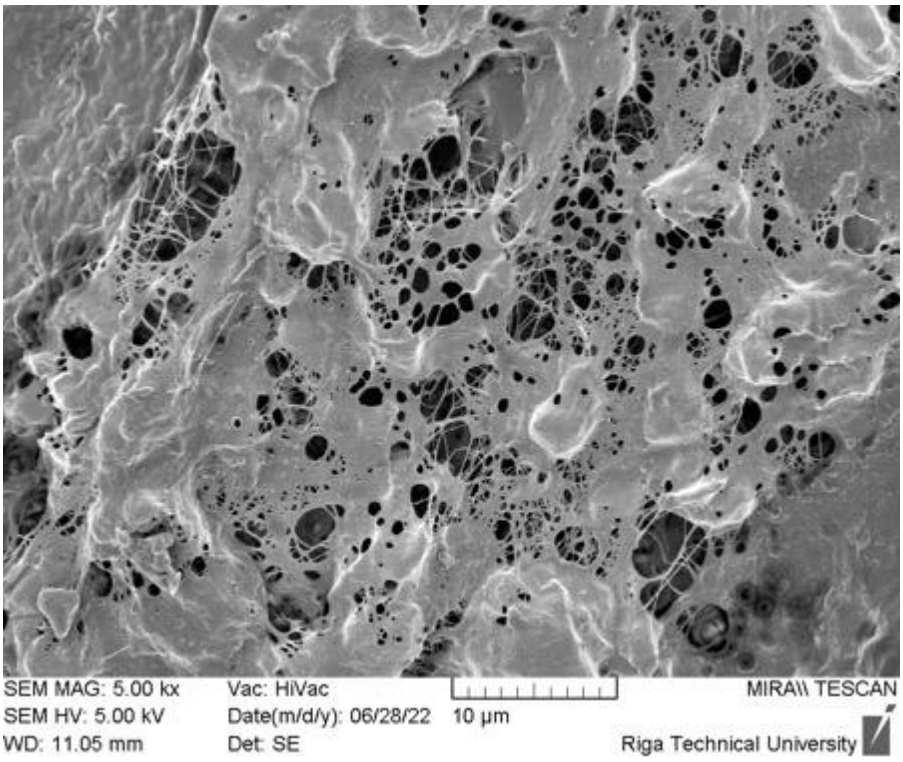

SEM MAG: 500 x
SEM HV: 5.00 kV
WD: 9.988 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
100 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

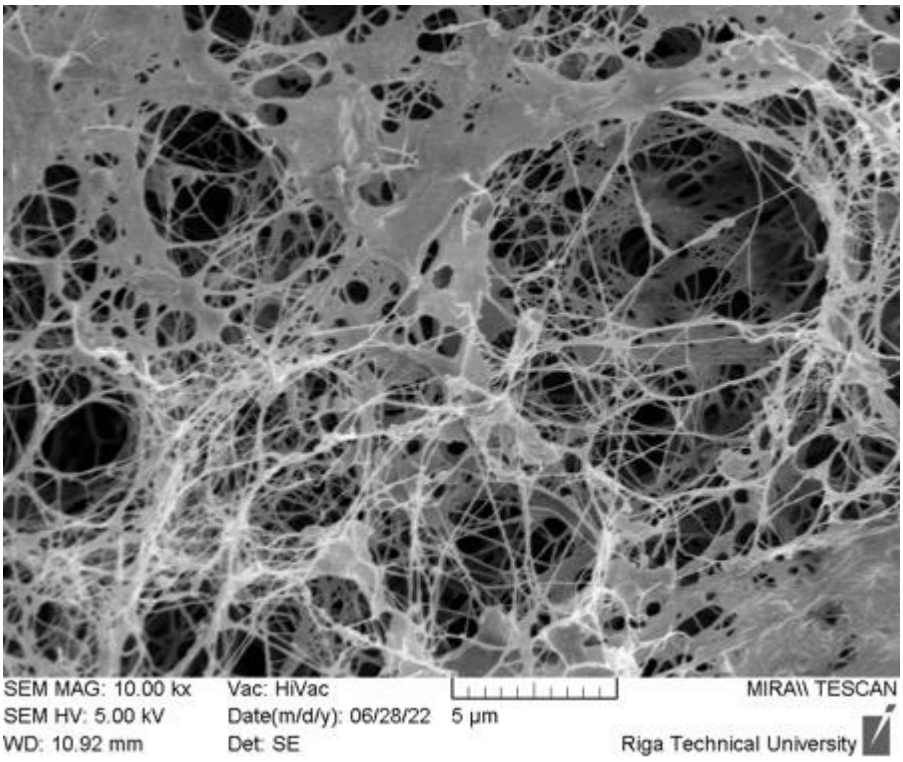
8. sūkalas ar CSL.

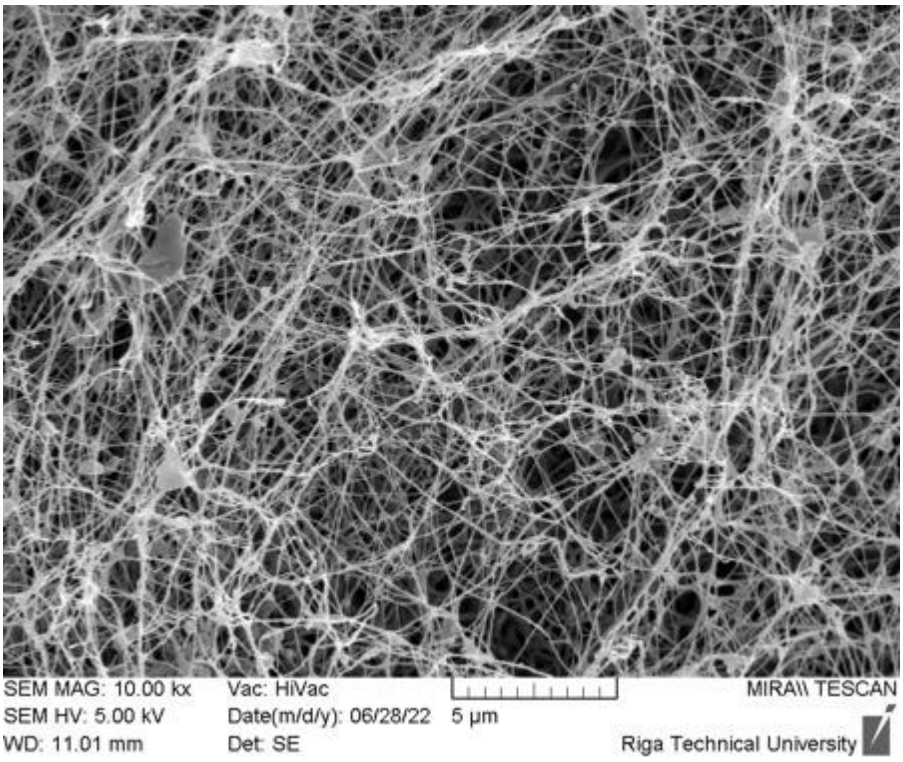


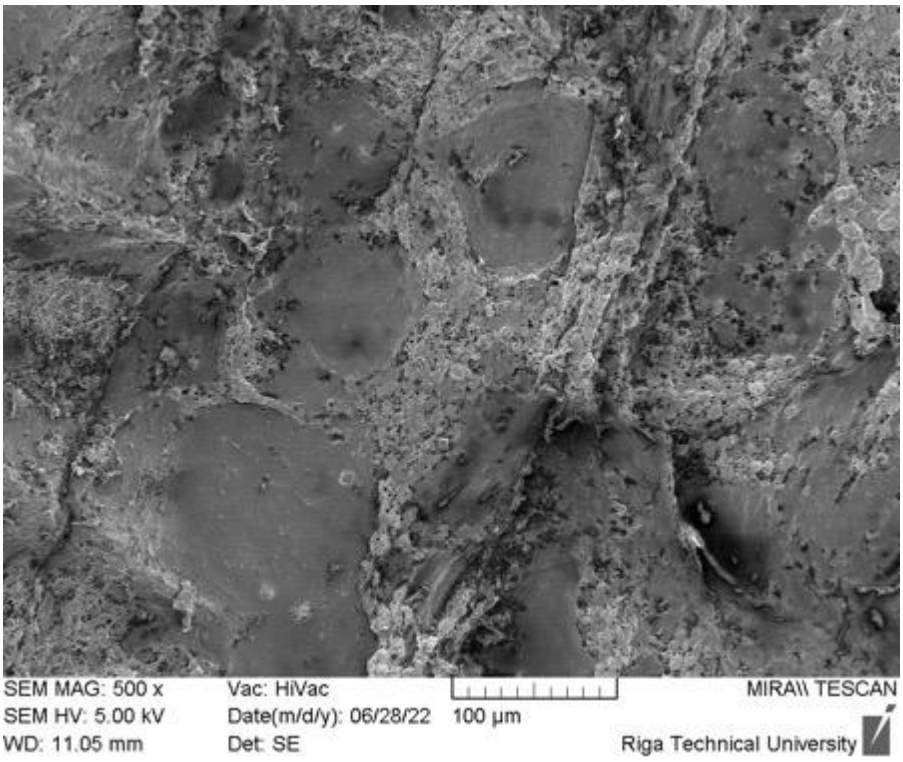



SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.92 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University


SEM MAG: 5.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 11.05 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
10 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

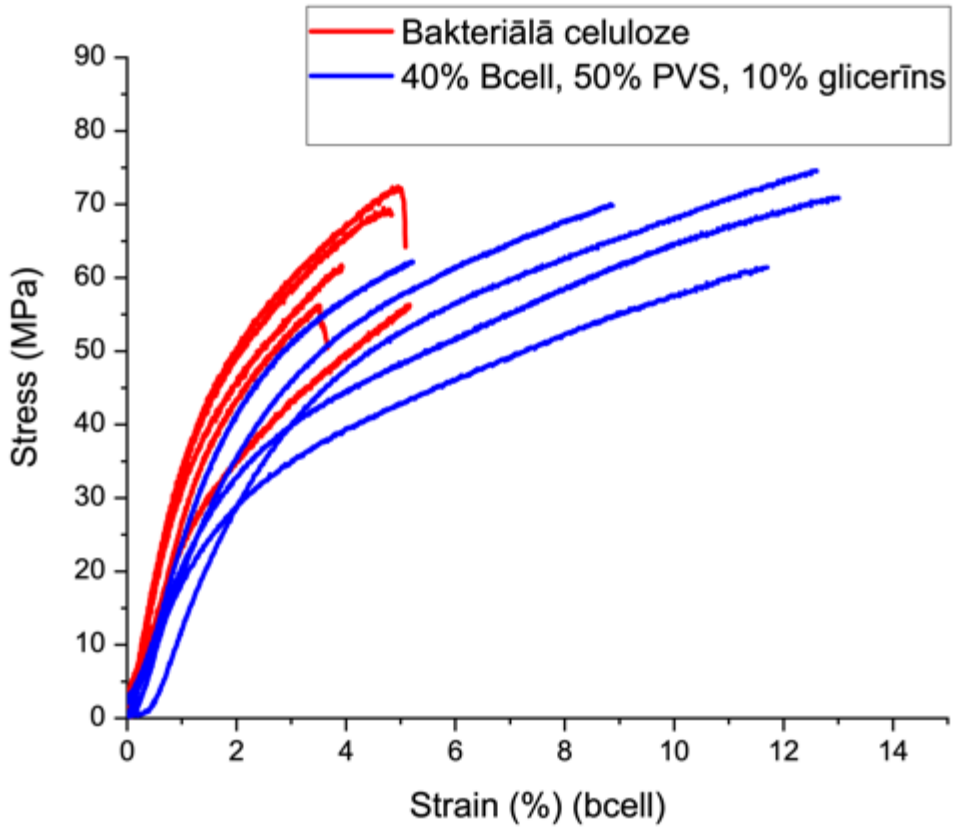

SEM MAG: 10.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 10.92 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
5 μm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University


SEM MAG: 10.00 kx
SEM HV: 5.00 kV
WD: 11.01 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
5 μm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University


SEM MAG: 500 x
SEM HV: 5.00 kV
WD: 11.05 mm
Vac: HiVac
Date(m/d/y): 06/28/22
Det: SE
100 µm
MIRA\\ TESCAN
Riga Technical University

Polimērs - BC kompozīcijas

Stiepes dati



		Bcell				Bcell-pvs	
	modulis Mpa	trūkšanas spēks Mpa	Pagarinājums %		modulis Mpa	trūkšanas spēks Mpa	Pagarinājums %
	2600	56,2	3,09		1820	70	8,87
	3430	69,5	4,53		1910	61,4	11,7
	3390	61,7	3,93			74,6	12,6
	2500	56,3	5,16		2240	62,2	5,22
	3790	72,4	5,07		2150	70,9	13
avg	3142	63,22	4,356		2030	67,82	10,278
stdev	563,53	7,47	0,86		197,48	5,77	3,26