



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Kompleksinis fizikinių ir biologinių priemonių parinkimas tvariam aviečių išspaudų perdirbimui į bioproduktus

Baigiamasis magistro projektas

Gabija Steigvilaitė

Projekto autorė

Dr. Lina Vaičiulytė

Vadovė

Kaunas, 2024



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Kompleksinis fizikinių ir biologinių priemonių parinkimas tvariam aviečių išspaudų perdirbimui į bioproduktus

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Gabija Steigvilaitė

Projekto autorė

Dr. Lina Vaičiulytė

Vadovė

Dr. Alvija Šalaševičienė

Recenzentė

Kaunas, 2024



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Gabija Steigvilaitė

Kompleksinis fizikinių ir biologinių priemonių parinkimas tvariam aviečių išspaudų perdirbimui į bioproduktus

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

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

Gabija Steigvilaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Steigvilaitė, Gabija. Kompleksinis fizikinių ir biologinių priemonių parinkimas tvariam aviečių išspaudų perdirbimui į bioproduktus. Magistro baigiamasis projektas / vadovė dr. Lina Vaičiulytė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: simbiotinė mikroorganizmų kultūra, pieno rūgšties bakterijos, metagenomika, ultragarsas, fitochemikalai, fermentacija

Kaunas, 2024. 70 p.

Santrauka

Atsižvelgiant į tvarumo principus, tyrimo metu buvo panaudotos aviečių išspaudos, kaip šalutinis uogų perdirbimo gamybos produktas. Šiame tyrime buvo tirtos ultragarso bei bakteriocinus gaminančių pieno rūgšties bakterijų (*Lactobacillus reuteri* 182 ir *Lactobacillus plantarum* F1) priemonės, siekiant sukurti nepasterizuotą fermentuotą gėrimą. Technologija leidžia išsaugoti žmogaus sveikatai naudingus mikroorganizmus, tokius kaip pieno rūgšties bakterijos, bei išvengti cheminių priedų panaudojimo. Antrinis uogų perdirbimo produktas – aviečių išspaudos, kurios pasižymi dideliu drėgmės kiekiu, gali būti panaudotas pridėtinės vertės produkto kūrimo. Taip pat, antriniai augaliniai produktai gali būti panaudoti kaip alternatyvus maisto šaltinis, tokiu būdu atsižvelgiant į tvaraus vystymosi principus. Aviečių išspaudose esantys fitochemikalai gali būti panaudoti funkcionalaus nepasterizuoto gėrimo gamyboje bei kaip priemonė mikrobiologinio stabilumo užtikrinimui. Tyrimo metu, fermentacijos procese buvo panaudota simbiotinė mikroorganizmų kultūra *Medusomyces gisevii*, sudaryta iš bakterijų bei mielių, kurių metabolizmo produktai lemia kompleksinį ir vartotojams priimtina produktą skonį. Tyrimo metu atlikta *Medusomyces gisevii* metagenominė analizė, kuria buvo identifikuotos 370 mikroorganizmų rūšys ir funkcinės jų savybės. Siekiant padidinti aviečių išspaudose esančių fenolinių junginių ir antocianinų koncentracijas, bei antioksidacinį aktyvumą, buvo atliktas 37 kHz ultragarsinis aviečių išspaudų apdorojimas. Pritaikius skirtingus ultragarso intensyvumus (40, 70, 100 ir 120 %) bei poveikio trukmes (15, 30, 45 min), buvo parinkti optimalūs aviečių išspaudų apdorojimo režimai – 70 % intensyvumo ir 45 min bei 120 % intensyvumo ir 30 min ultragarsinis apdorojimas. Ultragarsu apdorotos aviečių išspaudos buvo panaudotos fermentacijos procese su *Medusomyces gisevii* kultūra. Papildomai, efektyviomis koncentracijomis buvo panaudotos pieno rūgšties bakterijos (*Lactobacillus reuteri* 182 ir *Lactobacillus plantarum* F1), kurių metabolizmo produktai užtikrina gėrimo mikrobiologinį stabilumą ir saugumą vartojimui. Nustatyta, kad ultragarsinis aviečių išspaudų apdorojimas lėmė didesnes fenolinių junginių ir antocianinų koncentracijas fermentuotų gėrimų mėginiuose, bei padidino jų antioksidacinį aktyvumą. Mėginiuose su 70 % intensyvumo ir 45 min apdorotomis aviečių išspaudomis fenolinių junginių koncentracija vidutiniškai padidėjo 32,34 %, antocianinų – 17,96 %, antioksidacinis aktyvumas – 4,02 %. Mėginiuose su 120 % intensyvumo ir 30 min ultragarsu apdorotomis aviečių išspaudomis fenolinių junginių koncentracija vidutiniškai padidėjo 14,62 %, antocianinų – 13,29 %, antioksidacinis aktyvumas – 1,10 %. Aviečių išspaudų priedas lėmė mikrobiologiškai stabilesnius fermentuotų gėrimų mėginius. Tyrimo rezultatai rodo, kad uogų perdirbimo pramonės šalutinis produktas gali būti efektyviai panaudotas probiotinių fermentuotų gėrimų gamybai.

Steigvilaitė, Gabija. Integrated selection of physical and biological measures for sustainable processing of raspberry pomace into bioproducts. Master's Final Degree Project / supervisor dr. Lina Vaičiulytė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: symbiotic culture of microorganisms, lactic acid bacteria, metagenomics, ultrasound, phytochemicals, fermentation

Kaunas, 2024. 70 p.

Summary

Considering the principles of sustainability, raspberry pomace was used during the research as a by-product of berry processing industry. In this study, ultrasound and bacteriocin-producing lactic acid bacteria (*Lactobacillus reuteri* 182 and *Lactobacillus plantarum* F1) were used to develop an unpasteurized fermented beverage. The technology allows preserving microorganisms beneficial to human health, such as lactic acid bacteria, and avoiding the use of chemical additives. A secondary product of berry processing, raspberry pomace, which has a high moisture content, can be used in the creation of a value-added product. Also, secondary plant products can be used as an alternative food source, thus considering the principles of sustainable development. Phytochemicals found in raspberry pomace can be used in the production of a functional unpasteurized beverage and as a means to ensure microbiological stability. During the research, a symbiotic culture of microorganisms *Medusomyces gisevii* was used in the fermentation process, consisting of bacteria and yeast, whose metabolic products determine the complex and consumer acceptable taste of the product. During the research, a metagenomic analysis of *Medusomyces gisevii* was performed, which identified 370 species of microorganisms and their functional properties. In order to increase the concentrations of phenolic compounds and anthocyanins in raspberry pomace, as well as the antioxidant activity, 37 kHz ultrasonic treatment of raspberry pomace was performed. After the use of different ultrasound intensities (40, 70, 100 and 120 %) and exposure durations (15, 30, 45 min), the optimal treatment parameters of raspberry pomace were selected – 70 % intensity and 45 min, and 120 % intensity and 30 min ultrasonic treatment. Ultrasonically treated raspberry pomace was used in the fermentation process with a culture of *Medusomyces gisevii*. In addition, lactic acid bacteria (*Lactobacillus reuteri* 182 and *Lactobacillus plantarum* F1) were used in effective concentrations, whose metabolic products ensure the microbiological stability and safety of the beverages for consumption. It was found that the ultrasonic pretreatment of raspberry pomace resulted in higher concentrations of phenolic compounds and anthocyanins in the samples of fermented beverages, and increased their antioxidant activity. In the samples with 70% intensity and raspberry pomace pretreated for 45 min, the concentration of phenolic compounds increased by 32,34 %, anthocyanins by 17,96 %, and antioxidant activity by 4,02 %. The concentration of phenolic compounds increased by 14,62 %, anthocyanins by 13,29 %, and antioxidant activity by 1,10 % in the samples with 120 % intensity and 30 min ultrasound pretreated raspberry pomace. Addition of raspberry pomace resulted in more microbiologically stable fermented beverage samples. The results of the study show that the by-product of the berry processing industry can be effectively used for the production of probiotic fermented beverages.

Turinys

Lentelių sąrašas	8
Paveikslų sąrašas	9
Santrumpų ir terminų sąrašas	10
Įvadas.....	11
1. Literatūros apžvalga	13
1.1. Augalų perdirbimo pramonės antriniai produktai ir jų panaudojimo strategijos	13
1.2. Aviečių išspaudos – apibūdinimas, cheminė sudėtis ir pritaikymo galimybės	14
1.3. Biologiškai aktyvūs junginiai aviečių išspaudose	15
1.4. Fitocheminių medžiagų pritaikymas mikrobiologinio stabilumo užtikrinimui/maisto produktuose	16
1.5. Biologiškai aktyvių junginių ekstrakcija ultragarsu	17
1.6. Simbiotinė mikroorganizmų kultūra <i>Medusomyces gisevii</i> – charakterizavimas, bendrijų sudėtis ir fermentacijos procesai.....	18
1.7. Pieno rūgšties bakterijos – apibūdinimas, klasifikacija, antimikrobinės savybės	19
1.7.1. <i>Lactobacillus reuteri</i> kultūra	20
1.7.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> kultūra	21
1.8. Mikroorganizmų bendrijų ištyrimas metagenominės analizės būdu	21
1.9. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	22
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	24
2.1. Tyrimo objektai	24
2.2. Tyrimo medžiagos ir reagentai	24
2.3. Tyrimo įranga	26
2.4. Tyrimo metodai	27
2.4.1. Aviečių išspaudų cheminė analizė.....	27
2.4.2. Angliavandenių kiekio nustatymas.....	27
2.4.3. Aviečių išspaudų ultragarsinio apdorojimo efektyvumo vertinimas.....	27
2.4.4. Aviečių išspaudų ekstrakto paruošimas.....	28
2.4.5. pH vertės matavimas	28
2.4.6. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu	28
2.4.7. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu	29
2.4.8. Bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas	31
2.4.9. Pieno rūgšties bakterijų suspensijų paruošimas darbui	31
2.4.10. Fermentacijos mėginių modulinė sistemų paruošimo eiga	32
2.4.11. <i>Medusomyces gisevii</i> kultūros metagenominė analizė	32
2.4.12. Mikrobiologinė analizė.....	34
2.4.13. Juslinė analizė.....	35
2.4.14. Statistinė analizė.....	35
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	36
3.1. Aviečių išspaudų cheminė sudėtis.....	36
3.2. Aviečių išspaudų ultragarsinio apdorojimo efektyvumas	36
3.2.1. pH vertės pokytis.....	36
3.2.2. Bendroji fenolinių junginių koncentracija.....	37
3.2.3. Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu	39
3.2.4. Bendroji antocianinų koncentracija	40

3.3. Simbiotinės mikroorganizmų kultūros metagenominis ištyrimas	41
3.3.1. Mikroorganizmų bendrijos	42
3.3.2. Angliavandenių aktyvumo fermentai	44
3.3.3. Atsparumo antibiotikams genai	45
3.4. Gėrimų mėginių pirminės ir antrinės fermentacijos tyrimai	46
3.4.1. <i>Medusomyces gisevii</i> mikrobiologiniai rodikliai	46
3.4.2. Pirminės fermentacijos tyrimai.....	47
3.4.3. Antrinės fermentacijos tyrimai	49
3.5. Fermentuotų gėrimų mėginių mikrobiologinio stabilumo tyrimai	51
3.6. Fermentuoto gėrimo biologiškai aktyvių junginių sudėtis	53
3.6.1. Biogėrimų bendroji fenolinių junginių koncentracija	53
3.6.2. Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu	54
3.6.3. Biogėrimų bendroji antocianinų koncentracija	55
3.7. Fermentuotų gėrimų mėginių juslinė analizė	56
4. Rekomendacijų dalis	60
Išvados	62
Literatūros sąrašas	64
Publikacijų sąrašas	70
Priedai.....	71
1 priedas. Standartiniai skiedimai skirti tanino rūgšties kalibracinei kreivei paruošti	71
2 priedas. Standartiniai skiedimai skirti trolokso kalibracinei kreivei paruošti	72
3 priedas. Fermentuotų gėrimų juslinės analizės anketa	73

Lentelių sąrašas

1.1 lentelė. <i>Medusomyces gisevii</i> grybelio biomasės sudėtis.....	19
2.1 lentelė. Tyrimo metu naudotų reagentų ir medžiagų sąrašas	24
2.2 lentelė. Aviečių išspaudų ultragarsinio apdorojimo parametrai ir mėginių žymėjimas.....	28
2.3 lentelė. Fermentuotų gėrimų mėginių komponentai	32
3.1 lentelė. Aviečių išspaudų cheminė sudėtis, išreikšta % sausoje medžiagoje (s.m.).....	36
3.2 lentelė. Aviečių išspaudų pH vertė po ultragarsinio apdorojimo.....	37
3.3 lentelė. Aviečių išspaudų mėginių antioksidacinis aktyvumas, išreikštas mg trolokso ekvivalento (TE)/100 g	39
3.4 lentelė. <i>Medusomyces gisevii</i> kultūros DNR fragmentų informacija.....	41
3.5 lentelė. <i>Medusomyces gisevii</i> kultūroje nustatytų bakterijų atsparumas antibiotikams	46
3.6 lentelė. <i>Medusomyces gisevii</i> mikrobiologiniai rodikliai.....	46
3.7 lentelė. Fermentuotų gėrimų mėginių mikrobiologiniai rodikliai antrinės fermentacijos metu .	50
3.8 lentelė. Fermentuotų gėrimų mėginių antioksidacinis aktyvumas, išreikštas trolokso ekvivalentu (TE) mg/L.....	54
4.1 lentelė. Gamybos technologinė įranga	60

Paveikslų sąrašas

1.1 pav. Biomasės panaudojimo vertės piramidė.....	13
1.2 pav. A – raudonosios avietės (<i>Rubus idaeus</i>); B – raudonųjų aviečių (<i>Rubus idaeus</i>) išspaudos	14
1.3 pav. Ultragarstinės ekstrakcijos mechanizmas augalinėje žaliavoje	18
2.1 pav. Tyrimo schema – pirma dalis	25
2.2 pav. Tyrimo schema – antra dalis	26
2.3 pav. Ultragarstinė įranga – Ulsonix Proclean 3.0DSP vonelė.....	27
2.4 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė	29
2.5 pav. Trolokso kalibracinė kreivė.....	30
2.6 pav. <i>M. gisevii</i> metagenomo automatinės sekoskaitos pagrindiniai etapai.....	33
3.1 pav. Fenolinių junginių koncentracija, išreikšta mg tanino rūgšties ekvivalentu (TRE)/100 g aviečių išspaudose	38
3.2 pav. Antocianinų koncentracija aviečių išspaudų mėginiuose, išreikšta mg cianidin-3-gliukozido ekvivalentu (CGE)/100 g.....	40
3.3 pav. <i>M. gisevii</i> kultūrą sudarančios mikroorganizmų bendrijos	42
3.4 pav. Esminės bakterijų ir grybų (mielių) rūšys, sudarančios <i>Medusomyces gisevii</i> kultūrą	42
3.5 pav. Genų, atsakingų už angliavandenių aktyvumo fermentų sintezę, pasiskirstymas.....	44
3.6 pav. Pirminės fermentacijos tyrimas Nr. 1	47
3.7 pav. Pirminės fermentacijos tyrimas Nr. 2.....	48
3.8 pav. Pirminės fermentacijos tyrimas Nr. 3.....	48
3.9 pav. Antrinės fermentacijos pH vertės pokytis nuo 0 iki 72 val.	49
3.10 pav. Mielių skaičiaus (A dalis) ir mezofilinių pieno rūgšties bakterijų (PRB) skaičiaus (B dalis) kitimas laike nuo 0 iki 20 parų	51
3.11 pav. Aerobinių mikroorganizmų skaičiaus (A dalis) ir pH vertės (B dalis) kitimas laike nuo 0 iki 20 parų	52
3.12 pav. Fenolinių junginių koncentracijos fermentuotų gėrimų mėginiuose, išreikšta mg tanino rūgšties ekvivalentu (TRE)/L	53
3.13 pav. Antocianinų koncentracija fermentuotų gėrimų mėginiuose, išreikšta mg cianidin-3-gliukozido ekvivalentu (CGE)/L	55
3.14 pav. Fermentuotų gėrimų mėginių juslinės analizės rezultatai: C – mėginys be aviečių išspaudų; AC – mėginys su aviečių išspaudomis; UA1C – mėginys su ultragarsu (70%, 45 min) apdorotomis aviečių išspaudomis; UA2C – mėginys su ultragarsu (120%, 30 min) apdorotomis aviečių išspaudomis.	57
3.15 pav. Fermentuotų gėrimų mėginių juslinės analizės rezultatai: CR – mėginys su <i>L. reuteri</i> kultūra be aviečių išspaudų; AC – mėginys su aviečių išspaudomis; UA1CR – mėginys su <i>L. reuteri</i> kultūra ir ultragarsu (70%, 45 min) apdorotomis aviečių išspaudomis; UA2CR – mėginys su <i>L. reuteri</i> kultūra ir ultragarsu (120%, 30 min) apdorotomis aviečių išspaudomis.	57
3.16 pav. Fermentuotų gėrimų mėginių juslinės analizės rezultatai: CP – mėginys su <i>L. plantarum</i> kultūra be aviečių išspaudų; ACP – mėginys <i>L. plantarum</i> kultūra ir aviečių išspaudomis; UA1CP – mėginys su <i>L. plantarum</i> kultūra ir ultragarsu (70%, 45 min) apdorotomis aviečių išspaudomis; UA2CP – mėginys su <i>L. plantarum</i> kultūra ir ultragarsu (120%, 30 min) apdorotomis aviečių išspaudomis.	58
4.1 pav. Fermentuoto gėrimo su aviečių išspaudomis aparatūrinė schema	60

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

BAK – bendroji antocianinų koncentracija;

BP – bazių poros;

CGE – cianidin-3-gliukozido ekvivalentas;

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

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

NKS – naujos kartos sekoskaita;

PGR – polimerazės grandininė reakcija;

PRB – pieno rūgšties bakterijos;

SMK – simbiotinė mikroorganizmų kultūra;

TE – trolokso ekvivalentas;

TRE – tanino rūgšties ekvivalentas.

Įvadas

Didėjantis maisto produktų suvartojimas lemia augantį šalutinių maisto perdirbimo produktų bei organinių atliekų susidarymą. Uogų išspaudos, pavyzdžiui aviečių, yra uogų perdirbimo pramonės šalutinis produktas, kuris neturi plataus pritaikymo dėl didelio vandens kiekio bei mikrobinio nesaugumo rizikos. Dėl šios priežasties, uogų išspaudos yra išmetamos kaip atliekos, rečiau naudojamos pašarams ar kompostuojamos. Aviečių išspaudose gausu fitocheminių medžiagų, kurios pasižymi antimikrobinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis, kurios gali būti pritaikytos kaip alternatyva pasterizacijai ar cheminiams konservantams, slopinantiems mikroorganizmų augimą. Šie biologiškai aktyvūs junginiai gali ne tik padėti sumažinti technologiškai ir mitybiškai žalingų mikroorganizmų dauginimąsi fermentacijos metu, bet ir būti pritaikyti funkcionalaus maisto gamyboje. Siekiant sumažinti cheminių konservantų naudojimą, pieno rūgšties bakterijos, kaip biologinė priemonė, yra taip pat veiksminga alternatyva, siekiant išlaikyti produkto kokybę ir saugumą. Fitocheminių medžiagų ir pieno rūgšties bakterijų derinys ne tik užtikrina produkto kokybę, bet ir sumažina sintetinių priedų poreikį, o tai atitinka sveikesnės mitybos ir natūresnių maisto produktų poreikio tendencijas.

Fitocheminėms medžiagoms išskirti iš augalinių žaliavų dažniausiai taikomos įvairios tradicinės cheminės ir fizinės priemonės, kurios yra imlios cheminiams reagentams ir energijai. Vis didesnis dėmesys yra skiriamas ekologiškoms augalinių atliekų perdirbimo priemonėms, tokiu būdu siekiant sumažinti minėtųjų išteklių naudojimą. Kaip vienas iš tvarių augalinės žaliavos apdorojimo ir joje esančių junginių ekstrakcijos metodų yra ultragarsas. Priešingai nuo tradicinių ekstrakcijos metodų, ultragarsinė ekstrakcija yra aplinkai draugiškesnė, atliekama žemose temperatūrose, reikalauja mažesnių energijos bei cheminių tirpiklių sąnaudų.

Ultragarsu paveiktoje žaliavoje yra pagerinama ne tik biologiškai aktyvių junginių ekstrakcija, bet ir biologinis maistinių žaliavų prieinamumas mikroorganizmams, nepakeičiant pradinės žaliavos kokybės. Visgi, skirtingoms žaliavoms ar perdirbimo produktams, tokie ultragarsinės ekstrakcijos parametrai kaip intensyvumas ir poveikio trukmė, turi būti optimizuojami. Atsižvelgus į tvarumo principus bei Europos Komisijos žiedinės ekonomikos veiksmų planą, tyrimo metu buvo pritaikytas šalutinis maisto pramonės perdirbimo produktas pridėtinės vertės produkto kūrimo.

Darbo tikslas – taikant 37 kHz dažnio, įvairių intensyvumų (40, 70, 100, 120) ultragarsą ir skirtingas poveikio trukmes (15, 30, 45 min), padidinti biologiškai aktyvių junginių koncentracijas aviečių išspaudose ir ištirti panaudojimo galimybes fermentuotų gėrimų gamyboje su simbiotinė mikroorganizmų kultūra ir pieno rūgšties bakterijomis.

Darbo uždaviniai:

1. nustatyti ultragarso įtaką fenolinių junginių koncentracijos, antocianinų koncentracijos bei antioksidacinio aktyvumo vertėms aviečių išspaudose, taikant 37 kHz įvairių intensyvumų (40, 70, 100 ir 120 %) ultragarsą bei skirtingas poveikio trukmes (15, 30, 45 min);
2. atlikti simbiotinės mikroorganizmų kultūros *Medusomyces gisevii* metagenominę analizę ir ištirti mikroorganizmų bendrijas, atsparumo antibiotikams genus bei genus, atsakingus už angliavandenių aktyvumo fermentų sintezę;
3. įvertinti savaiminės fermentacijos gėrimo veikliųjų mikroorganizmų ir technologiškai žalingų mikroorganizmų kiekybinius pokyčius, taip pat pH vertės kitimą pirminės ir antrinės fermentacijos metu;

4. nustatyti ultragarsu apdorotų aviečių išspaudų įtaką fenolinių junginių koncentracijos, antocianinų koncentracijos bei antioksidacinio aktyvumo vertėms fermentuotų gėrimų mėginiuose.
5. įvertinti veikliųjų mikroorganizmų ir technologiškai žalingų mikroorganizmų kiekybinius pokyčius fermentuotų gėrimų mėginiuose 20 parų laikymo laikotarpyje.

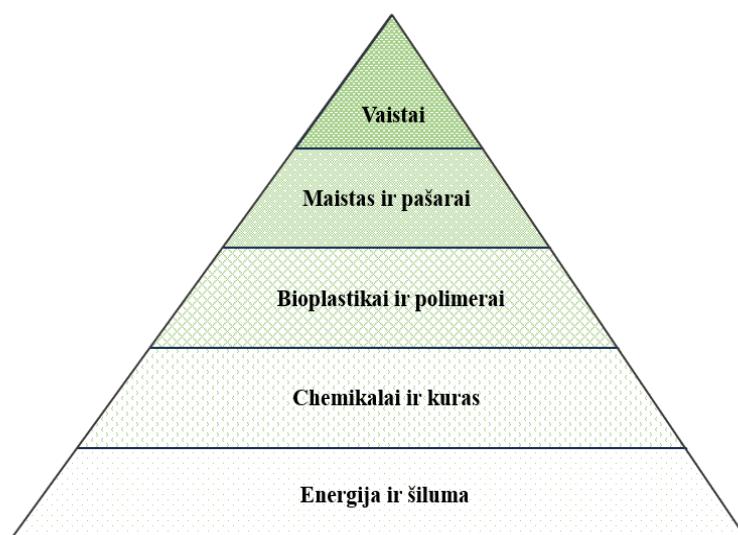
1. Literatūros apžvalga

1.1. Augalų perdirbimo pramonės antriniai produktai ir jų panaudojimo strategijos

Biotechnologijos ir maisto pramonėse augalinės kilmės atliekų susidarymas yra aktuali ir paplitusi problema. Globaliu mastu didžiausi organinių atliekų kiekiai susidaro maisto pramonėje, ypač vaisių ir daržovių perdirbimo srityje. Šias augalinės kilmės atliekas sudaro žievelės, sėklos, odelės, minkštimas bei kiti šalutiniai vaisių ir daržovių perdirbimo srautai. Vaisių ir daržovių perdirbimas lemia didelį kiekį atliekų, o šių atliekų šalinimas didina bendras gamybos išlaidas. Dėl to dažnai šios atliekos yra išmetamos į aplinką, siekiant sumažinti gamybos išlaidas. Maisto perdirbimo atliekos patekusios į aplinką greitai pradeda skleisti nemalonius kvapus, o jei jos nėra tinkamai tvarkomos, gali kelti aplinkosaugos bei sveikatos problemų. Yrant organinėms atliekoms, dauginasi ir plinta bakterijos bei didėja paviršinių ir požeminių vandenių taršos rizika [1].

Vaisių ir daržovių perdirbimo šalutinių produktų antrinis panaudojimas yra efektyvi priemonė ne tik mažinant aplinkos atliekas, bet ir panaudojant vertingus komponentus iš šių produktų. Šis požiūris turi įtaką sprendžiant tiek ekonomines, tiek aplinkosaugines problemas. Pavyzdžiui, naudojant šalutinius produktus ne tik taupomi gamtos išteklių, bet ir mažinamos sąvartynų eksploatacijos išlaidos. Be to, tai skatina inovacijas funkcinio maisto plėtros srityje.

Pastaruosiu metu daugėja įvairių organinės kilmės atliekų antrinio panaudojimo strategijų, kurios padėtų spręsti minėtas problemas. Šia tema buvo sukurta biomasės panaudojimo vertės piramidė. Ši piramidė yra suskirstyta į sritis pagal galutinį produktą, o šios sritys išdėliotos pagal vertę. Remiantis šia piramide, biomasė yra vertingiausia tuomet, kai ji naudojama vaistų gamyboje. Šios piramidės viduryje – maistas ir pašarai, bioplastikai ir polimerai, chemikalai ir kuras. Biomasės panaudojimas energijos ir šilumos tikslams suteikia mažiausiai vertės, taigi atsiduria piramidės apačioje [1]. Piramidė vaizduojama 1.1 paveiksle:



1.1 pav. Biomasės panaudojimo vertės piramidė

Daugumoje biomasės perdirbimo strategijų, aukštos pridėtinės vertės produktų kūrimas yra vienas pagrindinių tikslų. Tačiau reikia paminėti, kad dauguma šių biomasės perdirbimo strategijų yra nukreiptos į chemikalų bei bioenergijos gamybą. Dėl to yra svarbu kurti organinių atliekų perdirbimo

strategijas, nukreiptas į aukštesnės pridėtinės vertės produktų kūrimą – pavyzdžiui, funkcionalaus maisto gamyba.

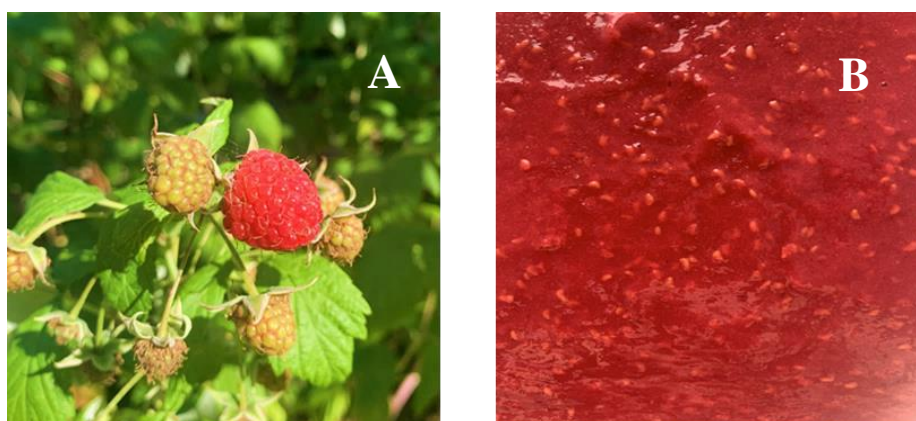
Maisto perdirbimo pramonės šalutiniuose produktuose gausu įvairių maistinių medžiagų ir bioaktyvių junginių – angliavandenių, celiuliozės, baltymų, antioksidantų, riebalų. Netinkamai tvarkant šiuos antrinius produktus prarandamos vertingos medžiagos, kurios gali būti panaudojamos naujiems produktams kurti. Vaisių ir daržovių atliekose gausu antrinių metabolitų, kurie gali būti pritaikyti funkcionalaus maisto gamyboje kaip sveikatai palankūs junginiai bei alternatyva konservantams. Šiuo atžvilgiu ypač įdomios uogų perdirbimo pramonės atliekos – pavyzdžiui, sulčių gamybos metu susidaranti išspaudos. Uogų išspaudose gausu biologiškai aktyvių junginių, tokių kaip polifenoliai, flavonoidai, antocianinai bei įvairūs kiti junginiai [2]. Šios uogos – tai mėlynės, gervuogės, spanguolės bei avietės. Aviečių šalutinių perdirbimo produktų pritaikymas ypač aktualus dėl to, jog tai vienos dažniausiai perdirbamų uogų pasauliniu mastu.

Paminėtina, kad ieškant efektyvių maisto atliekų perdirbimo strategijų, susiduriama su kliūtimis, kurios susijusios su perdirbimo metodų tvarumu, ekologiškumu bei saugumu aplinkai. Taip pat atsiranda ir technologinių iššūkių perdirbant šias atliekas pramoniniu mastu. Taigi, svarbu ieškoti naujų biomasės perdirbimo būdų, kurie būtų ir draugiški aplinkai, ir įgyvendinami pramoniniu mastu.

1.2. Aviečių išspaudos – apibūdinimas, cheminė sudėtis ir pritaikymo galimybės

Avietės yra vienos plačiausiai naudojamų uogų pasaulyje, vartojamos ir šviežios, ir perdirbtos į įvairius produktus. Komerciškai viena labiausiai paplitusių aviečių rūšių yra Europinė raudonoji avietė – *Rubus idaeus* L. subsp. *Idaeus* (1 pav. A). Raudonosiose avietėse gausu maistinių skaidulų, vitamino C, vitamino K, B grupės vitaminų, kalcio, geležies, magnio, kalio. Be to, jose yra įvairių biologiškai aktyvių junginių, tokių kaip fenoliniai junginiai, kurie pasižymi antioksidacinėmis ir priešuždegiminėmis savybėmis. Dėl maistinių medžiagų ir biologiškai aktyvių komponentų, raudonosios avietės atlieka svarbų apsauginį vaidmenį žmonių sveikatai [3].

Didelė dalis užauginamų aviečių yra perdirbamos į įvairius maisto produktus, pavyzdžiui, sultis, kurių gamybos metu susidaro reikšmingi kiekiai išspaudų (1.2 pav. B dalis). Perdirbant uogas į sultis, gaunama apie 70–80 % sulčių ir 20–30 % išspaudų, sudarytų iš odelių, sėklų ir minkštimo. Pramoninis vaisių ir uogų perdirbimas, ypač sulčių gamyba, generuoja didžiulius kiekius atliekų. Įvairios uogų ir vaisių išspaudos, įskaitant aviečių išspaudas, iki šiol neturi plataus pritaikymo dėl technologinių sprendimų stokos bei mikrobiologinio užterštumo rizikos [4].



1.2 pav. A – raudonosios avietės (*Rubus idaeus*); B – raudonųjų aviečių (*Rubus idaeus*) išspaudos

Išspaudos, kaip šalutinis uogų sulčių gamybos produktas, dažniausiai išmetamos, nors jose gausu maistinių medžiagų, pavyzdžiui, skaidulų, cukrų, baltymų, vertingų nesočiųjų riebalų rūgščių, antocianinų, polifenolių ir kitų antrinių metabolitų [5]. Aviečių išspaudose yra apie 59,5 % maistinių skaidulų, 10 % baltymų ir 11,1 % riebalų, išreikštų sausoje medžiagoje [3]. J. Vuilić ir kt. tyrime (2011) nurodoma, kad aviečių išspaudose gausu antrinių metabolitų – 100 g šviežių aviečių išspaudų yra 637,77 mg polifenolinių junginių, 591,65 mg flavonoidų ir 65,21 mg antocianinų [6].

Dažniausiai išspaudos yra panaudojamos kaip gyvulių pašaras, kompostuojamos, naudojamos biodujų gamyboje ar išmetamos [3]. Tačiau išspaudų panaudojimas maisto pramonėje gali sumažinti gamybos išlaidas, nes jos būtų panaudotos kaip alternatyvus maisto šaltinis. Paminėtina, kad trūksta sprendimų, susijusių su išspaudų pritaikymu aukštesnės pridėtinės vertės produktų kūrime.

Nors uogų ir vaisių išspaudos yra vertingas šalutinis produktas, tačiau jos turi didelį vandens kiekį, kuris lemia jų mikrobiologinį nestabilumą. Metodai, naudojami šalutiniams produktams išsaugoti, gali reikšmingai pailginti išsilaikymo trukmę. Dažniausiai uogų išspaudų stabilumo užtikrinimo metodas yra džiovinimas, o išdžiovintos aviečių išspaudos naudojamos funkcinio maisto gamyboje, pavyzdžiui, kepinuose. Visgi, išspaudų džiovinimas yra energijai imlus procesas [3].

Aviečių išspaudose esantys fenoliniai junginiai pasižymi inhibiciniu poveikiu prieš daugelį patogeninių bakterijų, dėl to gali būti pritaikyti kaip potencialūs antimikrobiniai reagentai [3].

Aviečių išspaudų, kaip šalutinio maisto perdirbimo pramonės produkto, panaudojimas gali būti potenciali priemonė tiek efektyvesniam išteklių naudojimui, tiek gamybos išlaidų mažinimui. Kadangi uogų sultis yra populiariau naudoti gėrimuose, jų išspaudas taip pat būtų galima pritaikyti inovatyvių gėrimų gamyboje. Kaip viena iš šių gėrimų rūšių yra fermentuoti gėrimai. Fermentacijos metu pagerinamas produkto skonis, tekstūra, maistinės medžiagos ir pailginamas galiojimo laikas. Taip pat fermentuoti produktai tradiciškai siejami su nauda sveikatai [5]. Nealkoholiniai gėrimai, kuriuos fermentuoja bakterijos ir mielės, susilaukia vis didesnio populiarumo. Taigi, aviečių išspaudos yra potenciali žaliava fermentuotiems nealkoholiniams gėrimams gaminti.

1.3. Biologiškai aktyvūs junginiai aviečių išspaudose

Raudonosios avietės yra biologiškai aktyviais junginiais turtingos uogos, kurie pasižymi antioksidaciniu aktyvumu. Biologiškai aktyvūs junginiai, arba antioksidantai, yra apibūdinami kaip cheminiai junginiai, kurie gali sumažinti arba užkirsti kelią lengvai oksiduojamų molekulių oksidacijai. Biologiniu aktyvumu avietėse pasižymi tokie junginiai kaip maistinės skaidulos, nesočiosios riebalų rūgštys, karotenoidai, vitaminas C bei fenoliniai junginiai – antocianinai, fenolinės rūgštys, flavonoliai ir kt. [4, 7].

Fitocheminės medžiagos yra antriniai augalų metabolitai, pasižymintys biologiniu aktyvumu. Fenoliniai junginiai yra viena didžiausių fitocheminių medžiagų grupių, kuri atlieka daug svarbių funkcijų augaluose. Augaluose esantys fenoliniai junginiai paprastai yra susiję su apsauga nuo ultravioletinės spinduliuotės, patogenų, parazitų, o taip pat prisideda ir prie augalų spalvos. Fenoliniams junginiams priklauso tokie junginiai, kaip fenolinės rūgštys bei polifenoliai (flavonoidai, antocianinai, flavonoliai, flavonai ir kt.) [3].

Fenoliniai junginiai yra skirstomi į kelias skirtingas grupes, atsižvelgiant į jų struktūrą - nuo paprastų fenolio rūgščių iki sudėtingų polifenolių. Visi šie junginiai turi vieną arba daugiau aromatinių žiedų bei hidroksilo grupių [8].

Vaisių ir daržovių spalva ir skonis iš dalies priklauso nuo jų fitocheminių bei fenolinių komponentų – pavyzdžiui, aviečių raudoną spalvą suteikia jose esantys antocianinai [9]. Antocianinai yra vandenyje tirpūs pigmentiniai junginiai, esantys uogų audiniuose, kurie sudaro vieną iš pagrindinių fenolinių junginių grupių aviečių išspaudose. Antocianinai yra sintetinami augalo ląstelės citoplazmoje bei saugomi vakuolėse. Manoma, kad antocianinai apsaugo augalus nuo biotinio ir abiotinio streso [3]. Antocianinai yra junginiai, kurie lengvai oksiduojasi, dėl to jie yra geri antioksidantai. Pagrindiniai aviečių išspaudose randami antocianinai yra cianidin-3-O-gliukozidas, cianidin-3-O-rutinozidas ir cianidin-3-O-soforozidas. U. Szymanowska ir kt. tyrime (2021) ištirta, kad po aviečių sulčių ekstrakcijos, apie 2/3 antocianinų lieka aviečių išspaudose [4].

Fenoliniai junginiai, turi daugybę sveikatai naudingų antioksidacinių ir priešuždegiminių savybių. Dėl didelio antioksidacinio aktyvumo fenoliniai junginiai yra pradėti tyrinėti kaip prevencinė priemonė nuo širdies ir kraujagyslių ligų, vėžio, antro tipo diabeto, neurodegeneracinių ligų. Biologiškų aktyvių junginių veikimas apima reaktyvių deguonies junginių inaktyvavimą, kurios sukelia ląstelės DNR, lipidų ir baltymų pažeidimus [10].

Taip pat, dėl aviečių išspaudose esančių fenolinių junginių, kurie slopina tam tikrų patogeninių bakterijų augimą, jos gali būti panaudotos kaip naujas antimikrobinių junginių šaltinis [11]. Natūralių antimikrobinių medžiagų taikymas maisto pramonėje tampa vis aktualesnis dėl didėjančio bakterijų atsparumo antibiotikams.

1.4. Fitocheminių medžiagų pritaikymas mikrobiologinio stabilumo užtikrinimui/maisto produktuose

Antimikrobinės medžiagos yra junginiai, slopinantys mikroorganizmų (bakterijų, virusų ir grybelių) augimą. Jų panaudojimas yra platus – farmacijos, maisto, kosmetikos pramonėje ir daugelyje kitų. Visgi, sintetinių medžiagų naudojimas, tokių kaip antimikrobinės medžiagos (konservantai), kelia vis didesnę žmonių susirūpinimą dėl jų saugumo. Dėl to pastebimai auga natūralių produktų paklausa. Kaip alternatyva cheminams konservantams, fitocheminės medžiagos susilaukia vis didesnio populiarumo. U. Szymanowska ir kt. tyrime (2021) nurodoma, kad šie junginiai pasižymi ne tik antimikrobiniu poveikiu, bet ir nauda sveikatai – priešuždegiminiu ir antioksidaciniu poveikiu žmogaus organizme [4].

Mokslinėje literatūroje nurodoma, jog fenoliniai junginiai, randami avietėse ir jų išspaudose, sulėtina patogeninių bakterijų augimą. Šie junginiai pasižymi inhibiciniu poveikiu prieš *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Salmonella* ir *Staphylococcus* bakterijų rūšis [3]. R. Bobinaitė ir kt. tyrime (2013) nustatyta, kad avietėse esantys fenoliniai junginiai pasižymėjo antimikrobiniu poveikiu prieš *S. aureus*, *B. subtilis* ir *E. faecalis* [11].

Fenolinių junginių grupei priklausantys antocianinai pasižymi inhibiciniu poveikiu prieš su maistu plintančius patogenus. Įrodyta, kad antocianinai pasižymi inhibiciniu poveikiu prieš *E.coli* ir *Salmonella* bakterijas. Manoma, kad antocianinų antibakterinis poveikis gali būti susijęs su maisto patogenų ląstelės sienelės degradacija [12].

Manoma, kad fitocheminių medžiagų antimikrobinį poveikį lemia įvairūs veikimo mechanizmai. Kai kurios fitocheminės medžiagos ardo mikroorganizmų ląstelių membraną, todėl jie praranda struktūrinį vientisumą ir miršta (1). Kiti fitochemikalai slopina nukleino rūgščių, būtinų mikroorganizmams augti ir daugintis, sintezę (2). Kai kurios fitocheminės medžiagos taip pat sutrikdo mikroorganizmų metabolizmą, slopindamos jų gebėjimą gaminti energiją ir vykdyti esminius ląstelių procesus (3) [13].

Antimikrobinis fitocheminių medžiagų poveikis gali būti pritaikytas daugelyje sričių. Pavyzdžiui, jie gali būti naudojami kaip natūralūs maisto gaminių konservantai, siekiant slopinti mikroorganizmų augimą ir pailginti jų galiojimo laiką. Taigi, fitocheminės medžiagos taip pat gali būti naudojamos kaip natūralios alternatyvos įprastinėms antimikrobinėms medžiagoms, o tai tampa aktualu dėl augančio bakterijų atsparumo antibiotikams.

Natūralių bioaktyvių junginių išgavimas, charakterizavimas ir valymas susilaukia vis didesnio mokslininkų susidomėjimo. Ypač siekiama išgauti bioaktyvias medžiagas iš maisto perdirbimo šalutinių srautų, jas pritaikant funkcinio maisto gamyboje. Taip pat, padidėjo vartotojų susidomėjimas natūraliais maisto ingredientais, dėl padidėjusios informacinės sklaidos apie sintetinių produktų sukeltas sveikatos problemas. Todėl pastaruoju metu yra aktualu pritaikyti natūralius ir alternatyvius junginius, galinčius pakeisti sintetinius ir tokiu būdu sumažinti jų gamybą bei poveikį sveikatai ir aplinkai.

1.5. Biologiškai aktyvių junginių ekstrakcija ultragarsu

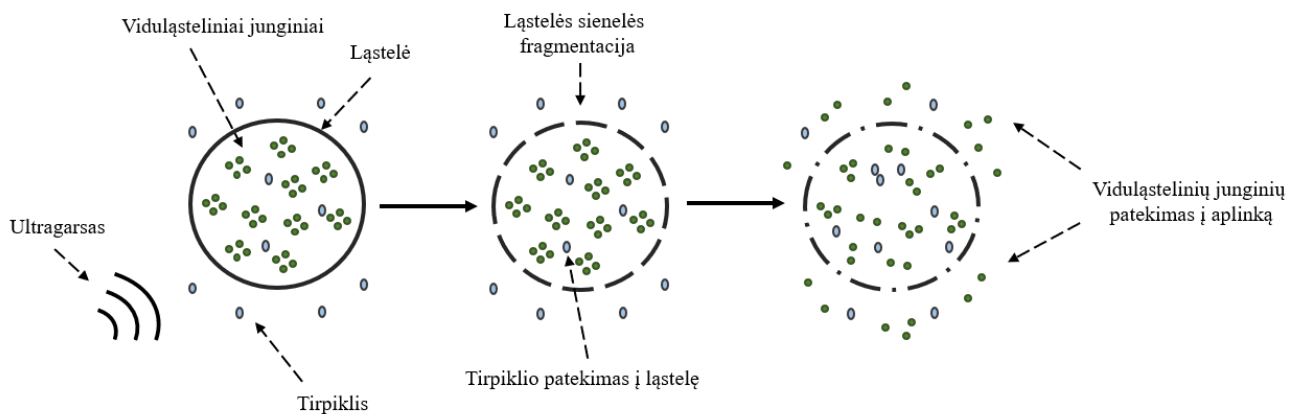
Išspaudose esantys bioaktyvūs junginiai, tokie kaip fitochemikalai, yra randami augalo audiniuose. Dažnu atveju, vaisių ir daržovių perdirbimo antriniai produktai turi aukštesnes biologiškai aktyvių junginių koncentracijas nei panaudojama jų dalis (pvz., sultys). Vertingi bioaktyvūs junginiai, kurie galėtų būti pritaikyti maisto gamyboje, prarandami dėl ekonomiškai nenaudingų ekstrahavimo būdų. Visgi, didėjant natūralių bioaktyvių junginių paklausai, turinčių maistines ir terapines vertes, ieškoma būdų, kaip šiuos junginius efektyviai išskirti ir panaudoti [14].

Ultragarso apdorojimas sulaukia vis didesnio populiarumo kaip tvarus įvairių junginių ekstrakcijos metodas. Ultragarso apdorojimas yra aplinkai draugiškas, tvarus ir efektyvus žaliavos apdorojimo ir ekstrakcijos metodas, kuris jau sėkmingai pritaikytas pramoniniu mastu. Ultragarso taikymo pranašumai maisto pramonėje yra saugumas, netoksiškumas bei ekonomiškumas [14].

Ultragarso ekstrakcija yra neterminis ekstrakcijos metodas, dėl to yra tinkamas biologiškai aktyvių junginių ekstrakcijai. Pavyzdžiui, ultragarso apdorojimas gali būti naudojamas vertingų junginių ekstrakcijai iš uogų išspaudų, kurios lieka kaip šalutinis produktas maisto pramonėje. Šios uogų perdirbimo atliekos yra laikomos nevertingomis, lyginant su pačiais perdirbimo produktais (pvz. sultimis), nes trūksta tvarių bei efektyvių ekstrahavimo technikų. Tradiciniai ekstrahavimo metodai yra imlūs laiko, energijos bei tirpiklių sąnaudoms [15].

Vienas iš ultragarso apdorojimo privalumų yra tai, kad tai gana greitas procesas, lyginant su įprastais ekstrakcijos metodais. Ultragarso apdorojimas gali išekstrahuoti biologiškai aktyvius junginius per trumpesnę laiką, žemesnėje temperatūroje ir su mažesnėmis energijos bei tirpiklių sąnaudomis, todėl tai yra tvaresnis ir ekonomiškesnis metodas, lyginant su tradiciniais ekstrahavimo metodais. Be to, įrodyta, kad ultragarso daro minimalų poveikį ekstrahuotų junginių struktūrinėms ir funkcinėms savybėms, išsaugo jų biologinį aktyvumą ir naudą sveikatai [15].

Kaip vienas iš ultragarsinės ekstrakcijos mechanizmų yra kavitacijos burbulų sprogo sukeliama augalinės ląstelės fragmentacija. Staigi ląstelės sienelės fragmentacija lemia biologiškai aktyvių junginių tirpumą dėl sumažėjusio dalelių dydžio, padidėjusio sąlyčio paviršiaus ploto ir padidėjusio masės perdavimo. Šis mechanizmas vaizduojamas 1.3 paveiksle:



1.3 pav. Ultragarsinės ekstrakcijos mechanizmas augalinėje žaliavoje

Akustinė kavitacija sukelia ne tik ląstelės sienelės fragmentaciją, bet ir tokius procesus ląstelės sienelėje kaip lokalizuota erozija, porų formavimasis, padidėjusi absorbcija ir brinkimo indeksas. Ultragarso sukeliama biologiškai aktyvių junginių ekstrakcija negali būti siejama su vienu mechanizmu, bet kaip įvairių mechanizmų kombinacija [15].

Ultragarsinio apdorojimo efektyvumą gali lemti keli veiksniai, įskaitant ultragarsinio apdorojimo dažnį, galią, intensyvumą ir trukmę, taip pat naudojamą tirpiklį ir jo koncentraciją. Optimalios ultragarsinės ekstrakcijos sąlygos gali skirtis priklausomai nuo uogų išspaudų rūšies ir ekstrahuojamų tikslinių junginių [16].

1.6. Simbiotinė mikroorganizmų kultūra *Medusomyces gisevii* – charakterizavimas, bendrijų sudėtis ir fermentacijos procesai

Medusomyces gisevii yra natūrali simbiotinė mikroorganizmų kultūra, sudaryta iš mielių bei bakterijų, kurios formuoja storą, amorfinę, sluoksniuotą plėvelę ant fermentuojamų maistinių tirpalų paviršiaus (arbatos ekstrakto, sulčių ar pan.). Ši plėvelė sudaryta iš bakterinės celiuliozės, kurioje yra imobilizuoti įvairūs mikroorganizmai [17].

Pagrindiniai mikroorganizmai, randami simbiotinėje kultūroje, yra bakterijos *Gluconacetobacterim*, *Acetobacter*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* ir *Clostridium*, taip pat mielės *Saccharomyces*, *Bretanomyces*, *Torulopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida* ir kt. Visgi, mokslinėje literatūroje nurodoma, kad *Medusomyces gisevii* kompozicija priklauso nuo daugelio veiksnių, dėl to ji gali skirtis tarp tyrimo objektų [17].

Bakterinė celiuliozė yra sintetinama acto rūgšties bakterijų *Gluconacetobacter xylinus* iš gliukozės arba fosforilintų jos formų. Pagaminta bakterinė celiuliozė yra formuojama Gram neigiamų bakterijų *Komagataeibacter (Gluconacetobacter)*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Azotobacter* ir *Alcaligenes*, taip pat Gram teigiamų bakterijų *Sarcina*

ventriculi ir *Rhodococcus*. Bakterinės celiuliozės vidinė dalis yra daugiasluoksnė mikrofibrilių struktūra, kurioje dėl difuzijos vyksta maistinių medžiagų, fermentų, mikroorganizmų ir jų medžiagų apykaitos produktų judėjimas. Kuomet plėvelė yra pažeidžiama, ji suformuoja naują sluoksnį ant senojo paviršiaus, taip pradėdama sluoksniuotis [17].

Grybelio biomasės cheminė kompozicija pateikiama 1.1 lentelėje:

1.1 lentelė. *Medusomyces gisevii* grybelio biomasės sudėtis

Komponentas	Kiekis, % (s.m.)
Baltymai	45–53
Angliavandeniai	37–43
Lipidai	8–10
Nukleino rūgštys	7–9
Mineralai	8–10
Vitaminai	0,11–0,54
Mikroelementai	2,1–3,7

Simbiotinė mikroorganizmų kultūra vykdo trijų rūšių fermentaciją: pieno rūgšties, alkoholio ir acto. Pieno rūgšties fermentacijos metu, pieno rūgšties bakterijos konvertuoja gliukozę į pieno rūgštį. Alkoholinės fermentacijos metu mielės konvertuoja gliukozę į etilo alkoholį, o proceso metu išsiskiria anglies dioksidas. Acto fermentacijos metu acto bakterijos etilo alkoholį konvertuoja į acto rūgštį, išsiskiriant vandeniui. Fermentacijos metu taip pat pagaminama keletas tarpinių produktų, įskaitant fosforo rūgštį [18].

Fermentacijai įtakos turi daugelis veiksnių, tokių kaip temperatūra, pH, deguonies kiekis, ištirpęs CO₂, taip pat terpės pobūdis ir sudėtis. Bet koks šių veiksnių svyravimas gali turėti įtakos fermentacijos greičiui, veikimui, organoleptinėms savybėms, maistinei kokybei ir kitoms fizikinėms ir cheminėms produkto savybėms. Skirtingos augalų veislės, cukraus koncentracija, fermentacijos laikas ir arbatos grybo sudėtis gali lemti galutinio produkto sudėties skirtumus [18].

1.7. Pieno rūgšties bakterijos – apibūdinimas, klasifikacija, antimikrobinės savybės

Pieno rūgšties bakterijos (PRB) yra Gram teigiamos, sporų nesudaranti, kokų ar lazdelių pavidalo bakterijos, išskiriančios pieno rūgštį, kaip galutinį ir pagrindinį produktą angliavandenių fermentacijoje [19]. *Lactobacillus* bakterijos yra vienos iš plačiausiai naudojamų probiotikų ir jų galima rasti daugelyje maisto produktų visame pasaulyje. Tai pačios svarbiausios bakterijos maisto fermentacijos procesuose, tokiuose kaip duonos, fermentuotų pieno produktų, gėrimų bei daržovių perdirbimo gamyboje.

PRB vykdo angliavandenių konversiją į pieno rūgštį bei kitas organines rūgštis, išsiskiriant anglies dioksidui. Visi pieno rūgšties „gamintojai“ yra mikroaerofiliniai, tai reiškia, kad jiems reikia nedidelio deguonies kiekio jų metabolizmui. Dėl to, jų vykdomos reakcijos nesukelia didelių maisto sudėties pokyčių [19].

Lactobacillus bakterijos gali būti klasifikuojamos į tris grupes: griežtas homofermentines rūšis, fakultatyvines heterofermentines rūšis ir griežtas heterofermentines rūšis. Pirmajai grupei priklauso tokios bakterijų rūšys kaip *Lactobacillus delbrueckii* ir *Lactobacillus acidophilus*, kurios gamina

pieno rūgštį kaip galutinį metabolizmo produktą. Antroji grupė - fakultatyvinės heterofermentinės rūšys, be pieno rūgšties gamina acto rūgštį, etanolį ir skruzdžių rūgštį. Tipiški šios grupės pavyzdžiai yra *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* ir *Lactobacillus sakei*. Griežtos heterofermentinės rūšys gamina pieno ir acto rūgštis kaip galutinius metabolitus. Šiai grupei priklauso *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* ir *Lactobacillus reuteri* [19].

Mokslinėje literatūroje nurodoma, jog tam tikros PRB kultūros pasižymi antimikrobinu poveikiu prieš su maistu plintančius patogeninius mikroorganizmus, įskaitant bakterijas, mieles ir siūlinius grybelius. Be to, PRB gali neutralizuoti siūlinių grybelių išskiriamus mikotoksinus. PRB įprastai yra laikomus saugiais žmogui ir plačiai naudojamus maisto pramonėje. Taip pat, PRB sudaro natūralią žmogaus žarnyno mikroflorą [20].

PRB antimikrobinis poveikis yra pagrįstas jų gebėjimo gaminti pieno rūgštį ir kitas organines rūgštis, taip pat hidroperoksidą ir bakteriocinus, kurie slopina nepageidaujamų mikroorganizmų augimą [21]. Šios PRB savybės yra labai svarbios, kadangi tokiu būdu ateityje būtų galima pakeisti cheminius ir fizinius konservavimo būdus į biologinį konservavimo būdą, paremtą PRB ir jų metabolitais. Biologinį konservavimą galima apibrėžti kaip būdą galiojimo laiko pailginimui ir maisto saugos padidimui, kuriam pasitelkiami mikroorganizmai ar jų metabolitai [22].

Fermentacijos technologijos, pagrįstos PRB, turi didelę reikšmę maisto pramonei, kadangi tai leidžia išsaugoti maisto produktų kokybę ir pailginti jų galiojimo laiką, tuo pačiu suteikiant jiems norimas juslines savybes. Be to, fermentacijos metu dalyvaujančių mikroorganizmų metabolitai stabdo nepageidaujamos mikrofloros vystymąsi ir nepalankių junginių susidarymą. Būtent šios savybės leidžia sumažinti cheminių konservantų naudojimą maisto gamyboje [23].

1.7.1. *Lactobacillus reuteri* kultūra

Lactobacillus reuteri yra heterofermentinė PRB, randama daugelyje žinduolių. Žmonėse, *L. reuteri* yra randama skirtingose kūno vietose – virškinimo trakte, šlapimo takuose, odoje ir motinos piene. Literatūroje nurodoma, kad *L. reuteri* pasižymi keletu teigiamų poveikių žmogaus organizmui. Pirma, *L. reuteri* išskiria antimikrobinius junginius, tokius kaip organinės rūgštys, etanolis ir reuterinas. Gebėjimas gaminti reuteriną gamtoje yra gana neįprastas, o *L. reuteri* yra vienintelė PRB, galinti gaminti ir išskirti didelius kiekius reuterino. Reuterinas yra įdomus pramoniniu mastu, nes jis pasižymi stipriu antimikrobinu poveikiu daugeliui mikroorganizmų, įskaitant Gram teigiamas ir Gram neigiamas bakterijas, mieles, pelėsius ir pirmuonis. Maistinių PRB gaminamas reuterinas yra potencialus plataus spektro konservantas maisto pramonėje [24]. Taigi, dėl antimikrobinio aktyvumo, ši bakterija gali slopinti patogeniškų bakterijų dauginimąsi bei daryti įtaką žmogaus mikrobiotos kompozicijai.

Taip pat, *L. reuteri* gali pasižymėti teigiamu poveikiu žmogaus imuninei sistemai. Pavyzdžiui, kai kurios *L. reuteri* padernės gali sumažinti priešuždegiminių citokinų gamybą, kartu skatindamos reguliavimo T ląstelių vystymąsi ir funkciją. Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad uždegiminės ligos, įskaitant tas, kurios yra žarnyne ir atokiuose audiniuose, gali būti palengvintos padidinus *L. reuteri* kolonizaciją šeimininke [24].

L. reuteri gali fermentuoti daugybę angliavandenių, įskaitant prebiotines maistines skaidulas, tokias kaip dekstrinas ir inulinas. Įdomi *L. reuteri* savybė yra jos gebėjimas gaminti vitaminą B12 [24].

1.7.2. *Lactobacillus plantarum* kultūra

Lactobacillus plantarum yra homofermentinė PRB. Tai yra universali ir plačiai paplitusi bakterija, randama daugelyje maisto produktų ir pašarų, įskaitant pieno produktus, mėsą, žuvį, fermentuotas daržoves. Taip pat, *L. plantarum* natūraliai randama žmogaus ir gyvūnų gleivinėje (burnos ertmėje, virškinimo trakte ir kt.).

L. plantarum yra mezofilinė PRB, galinti augti nuo 15 °C iki 45 °C temperatūroje. Geras augimas užfiksuotas esant 4 – 6 % NaCl ir pH vertėms tarp 4 ir 9. Dauguma organinių rūgščių (pvz., obuolių, vyno ir acto rūgštys) gali būti metabolizuojamos *L. plantarum*, susidarant anglies dioksidui, pieno rūgščiai ir acto rūgščiai.

L. plantarum yra plačiai pritaikyta maisto pramonėje fermentacijos procesuose. *L. plantarum*, gaunama iš aplinkos arba naudojama kontroliuojamoje fermentacijoje, paprastai siejama su pageidaujamosiomis daugelio fermentuotų maisto produktų savybėmis. Šios kultūros yra dedamos į įvairius maisto produktus, siekiant pagerinti jų išsilaikymo kokybę arba padidinti naudą sveikatai [25]. Taip pat, *L. plantarum* gamina įvairius ir stiprius bakteriocinus – antimikrobinius peptidus, kurie gali būti naudojami kaip maisto konservantai [26]. Yra žinoma, kad *L. plantarum* gamina tokias antimikrobines medžiagas kaip plantaciną, kuris yra aktyvus prieš tam tikrus patogenus [27].

Tyrimų, įrodančių probiotikų, tokių kaip *L. plantarum*, naudą sveikatai, vis daugėja. Pastaruoju metu *L. plantarum* buvo tiriama įvairiose medicinos srityse gydant lėtines širdies ir kraujagyslių ligas, Alzheimerio ir Parkinsono ligas, diabetą, nutukimą, vėžį, hipertenziją, šlapimo ir lyties organų ligų komplikacijas, kepenų sutrikimus ir kt. [28].

1.8. Mikroorganizmų bendrijų ištyrimas metagenominės analizės būdu

Metagenomika yra mokslo šaka, tyrinėjanti nukleotidų sekų, išskirtų iš mikroorganizmų bendrijų, struktūras ir funkcijas. Naujos kartos sekoskaitos (NKS) (angl. *Next-Generation Sequencing*) metodas ir metagenominiai tyrimai apima mikrobiomos įvairovės nustatymą, bendruomenės sudėtį, genetines ir evoliucines sąsajas, funkcinę veiklą bei sąveiką su aplinka. Įprastai, mikroorganizmų charakterizavimas buvo atliekamas kultivuojant monokultūras *in vitro*, siekiant sukaupti didelę biomasės kiekį, reikalingą tyrimams. Tačiau, yra žinoma, kad net 99 % mikrobiomų organizmų, randamų ekosistemose, negali būti kultivuojami laboratorinėmis sąlygomis [29]. Šiai problemai spręsti buvo sukurti bioinformatiniai metagenominės analizės įrankiai, leidžiantys ištirti visą mikroorganizmų kultūrų bendriją, esančią mėginyje iš įvairių aplinkų (pvz. dirvožemio, vandens ir kt.), jų nekultivuojant [30]. Prieš atliekant metagenomo sekoskaitą, iš tiriamo mėginio yra išskiriama bendrinė DNR.

Šiuo metu metagenomams analizuoti yra taikomi du NKS metodai: amplikonų sekoskaita bei automatinė (angl. *Shotgun*). sekoskaita. Amplikono metagenomika yra paremta specifinių genų sekų sekvenavimu, tokių kaip 16S rRNR (prokariotuose) bei 18S rRNR ir ITS rRNR (eukariotuose). Šiame metode taikoma polimerazės grandininė reakcija (PGR), siekiant pagausinti specifinius genų fragmentus. Amplikonų metodu gautos žinios apie eukariotų ar prokariotų įvairovę, dažniausiai būna gentes lygmenyje, skirtingai nuo automatinės sekoskaitos. Automatinė sekoskaita leidžia išsamiai analizuoti visus mėginyje esančius genomus, identifikuojant atskiras prokariotų, eukariotų, archėjų ir virusų rūšis bei jų funkcinius genus. Amplikonų sekoskaita naudojama mikroorganizmų įvairovės ir sudėties analizei. Visgi, šiuo metodu negalima nustatyti mikroorganizmų funkcinių savybių [31]. Ši

metodą dabar keičia didesnio jautrumo automatinė sekoskaita, kurios metu atliekamas atsitiktinis mėginio bendrosios DNR skaidymas fragmentais su tolesniu bioinformaciniu genomo fragmentų sujungimu ir analize pagal informacines duomenų bazes [32].

Automatinės sekoskaitos metagenomika taikoma siekiant ištirti ne tik mikroorganizmų rūšių sudėtį, bet ir genų funkcijas, bei medžiagų apykaitos kelius. Priešingai nuo amplikono metagenomikos, čia nėra taikomasi į specifinius genų fragmentus, o yra vykdomas visų DNR fragmentų, esančių mėginyje, sekvenavimas. Šis metodas ypač naudingas tiriant sudėtingas mikroorganizmų ekosistemas ir nustatant jos narių tarpusavio sąveikas [31].

Metagenominė analizė susideda iš keturių pagrindinių tyrimo etapų: mėginio paėmimo ir DNR išskyrimo (1); DNR bibliotekos sudarymo ir nukleotidų sekoskaitos (2); bioinformatinės analizės taksonominėms, funkcinėms ir genominiėms mikroorganizmo ypatybėms apibūdinti (3); rezultatų interpretavimo (4) [32].

Pirmajame analizės etape, atliekamas DNR išskyrimas iš analizuojamo mėginio. Mėginio paėmimas ir saugojimas gali turėti įtakos tiek metagenomo tyrimo kokybei, tiek jo tikslumui. Rinkimo ir saugojimo metodai, kurie yra nustatyti ir patvirtinti vienos rūšies mėginiui paruošti, negali būti laikomas optimaliais visų tipų mėginių paruošimui. Pagrindiniai mėginio paruošimo tikslai yra surinkti pakankamai mikrobinės biomasės, reikalingos sekos nustatymui, bei maksimaliai sumažinti mėginio užteršimo riziką [32].

Antrajame analizės etape, atliekamas genetinės medžiagos fragmentavimas bei DNR bibliotekos sudarymas. Po DNR fragmentacijos, atliekamas DNR fragmentų galų koregavimas, adenino nukleotido prijungimas prie 3' DNR fragmentų galų, adapterių (trumpų DNR grandžių) prijungimas prie tiriamųjų DNR fragmentų galų. Toliau, iš gautųjų DNR fragmentų, yra atrenkami tie, kurie yra didesni arba lygūs 500 bazių porų (bp). Atliekamas DNR fragmentų išgryninimas, pašalinami likę reagentai bei priemaišos [32].

Toliau, atliekama fragmentų sekoskaita NKS platformomis, pavyzdžiui, „Illumina“. Atlikus sekoskaitą, gaunami neapdorotų duomenų masyvai.

Trečiame analizės etape, gautieji duomenys yra apdorojami t.y. atliekama kokybės kontrolė, kurios metu dalis duomenų yra pašalinama. Apdoroti duomenys yra naudojami bioinformatinės analizės etape – atliekama taksonominė klasifikacija, funkcijų nustatymas, statistinė ir palyginamoji analizė, specifinių genų (atsparumo antibiotikams, virulentiškumo ir kt.) nustatymas ir kt. Po bioinformatinės analizės (ketvirtajame tyrimo etape) gautieji rezultatai yra analizuojami bei lyginami su moksline literatūra.

1.9. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Augalinių žaliavų, o ypač antrinių jų produktų, racionalus naudojimas yra viena aktualiausių tvarių augalinių perdirbimo technologijų siekiamybių. Kinta visuomenės vartojimo įpročiai, vis daugiau mitybos racionuose siekiama subalansuoti augalinio ir gyvūninio maisto santykį, teikiant prioritetą augaliniam maistui. Tokiu būdu, aktualu yra kurti augalinių žaliavų ir ypač antrinių jų produktų perdirbimo technologijas ir taip racionaliai panaudoti įvairias bioaktyvias ir fitochemines medžiagas funkcionaliems maisto produktams gaminti.

Apžvelgus mokslinę literatūrą, galima teigti, kad uogų perdirbimo pramonės šalutiniame produkte – aviečių išspaudose – yra daug antioksidaciniu aktyvumu bei antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių junginių. Šie biologiškai aktyvūs junginiai gali būti pritaikyti fermentuotų produktų kūrime, kaip papildoma priemonė mikrobiologinio stabilumo užtikrinimui fermentacijos procesuose. Taip pat, panaudojant biologiškai aktyvius junginius, padidinamas ir pats maisto produkto funkcionalumas.

Ultragarsas, kaip tvari aplinkai ekstrahavimo technologija, yra tinkama priemonė biologiškai aktyvių junginių ekstrakcijai iš augalinės žaliavos, išsaugant jų funkcionalumą bei galimybę pritaikyti maisto produktuose. Siekiant sėkmingai panaudoti antrinius produktus, svarbu optimizuoti ultragarsinio apdorojimo parametrus, tokius kaip poveikio trukmė bei ultragarso intensyvumas.

Aviečių išspaudos gali būti panaudotos fermentacijos procesuose su *Medusomyces gisevii* mikroorganizmų kultūra. Ši kultūra apima sudėtingą bakterijų ir mielių bendruomenę, kuri dalyvauja fermentacijos procesuose, pavyzdžiui, žaliosios arbatos fermentacijoje. Šios kultūros sudėtis būna įvairi ir priklauso nuo daugelio faktorių, todėl ypač aktualu iširti tyrime naudojamą kultūrą ir nustatyti mikroorganizmų bendrijas, siekiant detaliau suprasti fermentacijoje vykstančius procesus. Taip pat, moksliniuose šaltiniuose trūksta duomenų apie *M. gisevii* metagenominę analizę, ypač naudojant tokius metodus, kaip automatinė metagenominė sekoskaita, kuri suteikia išsamią informaciją apie analizuojamą mikroorganizmų bendriją ir jos funkcines savybes.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimo objektai

Tyrimo objektai – aviečių išspaudos bei *Medusomyces gisevii* simbiotinė mikroorganizmų kultūra. Tyrimams buvo naudotos avietės, gautos iš Kėdainių raj. Rimkų ūkio 2023 m. liepos mėn. Šviežios avietės buvo panaudotos sulčių ekstrakcijai (sulčiaspaudė „Braun“, „4 290“, Čekijos Respublika), po kurios susidariusios aviečių išspaudos (sudarytos iš odelių, sėklų ir stiebelių) buvo iškart užšaldytos ir laikytos šaldiklyje -18 °C temperatūroje. Simbiotinė mikroorganizmų kultūra *Medusomyces gisevii* buvo išskirta iš arbatos grybo, kuris įsigytas iš MB „Arbatologija“. Simbiotinė mikroorganizmų kultūra laikyta 4 °C temperatūroje.

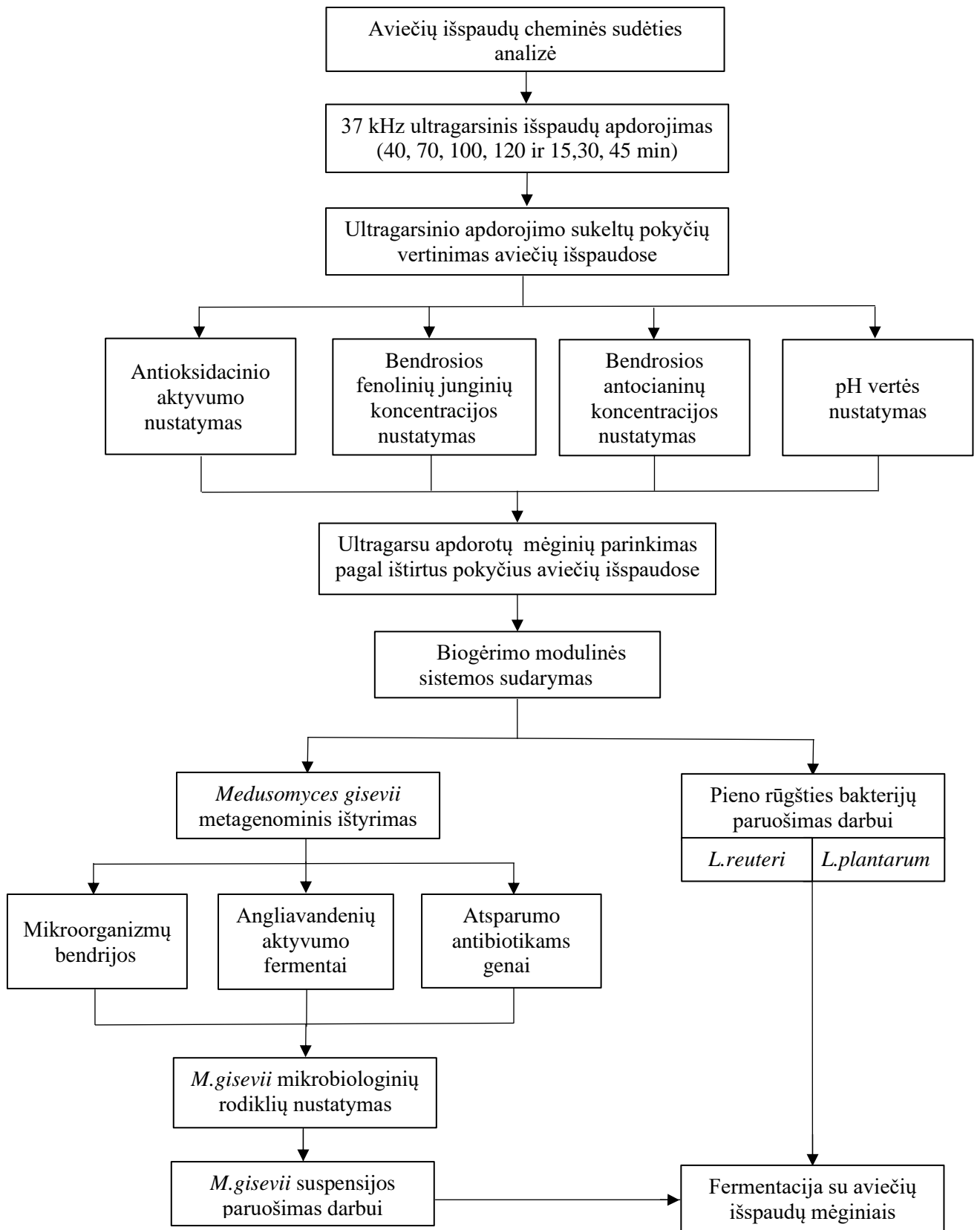
2.2. Tyrimo medžiagos ir reagentai

Tyrimo metu naudotų reagentų ir medžiagų sąrašas pateiktas 2.1 lentelėje:

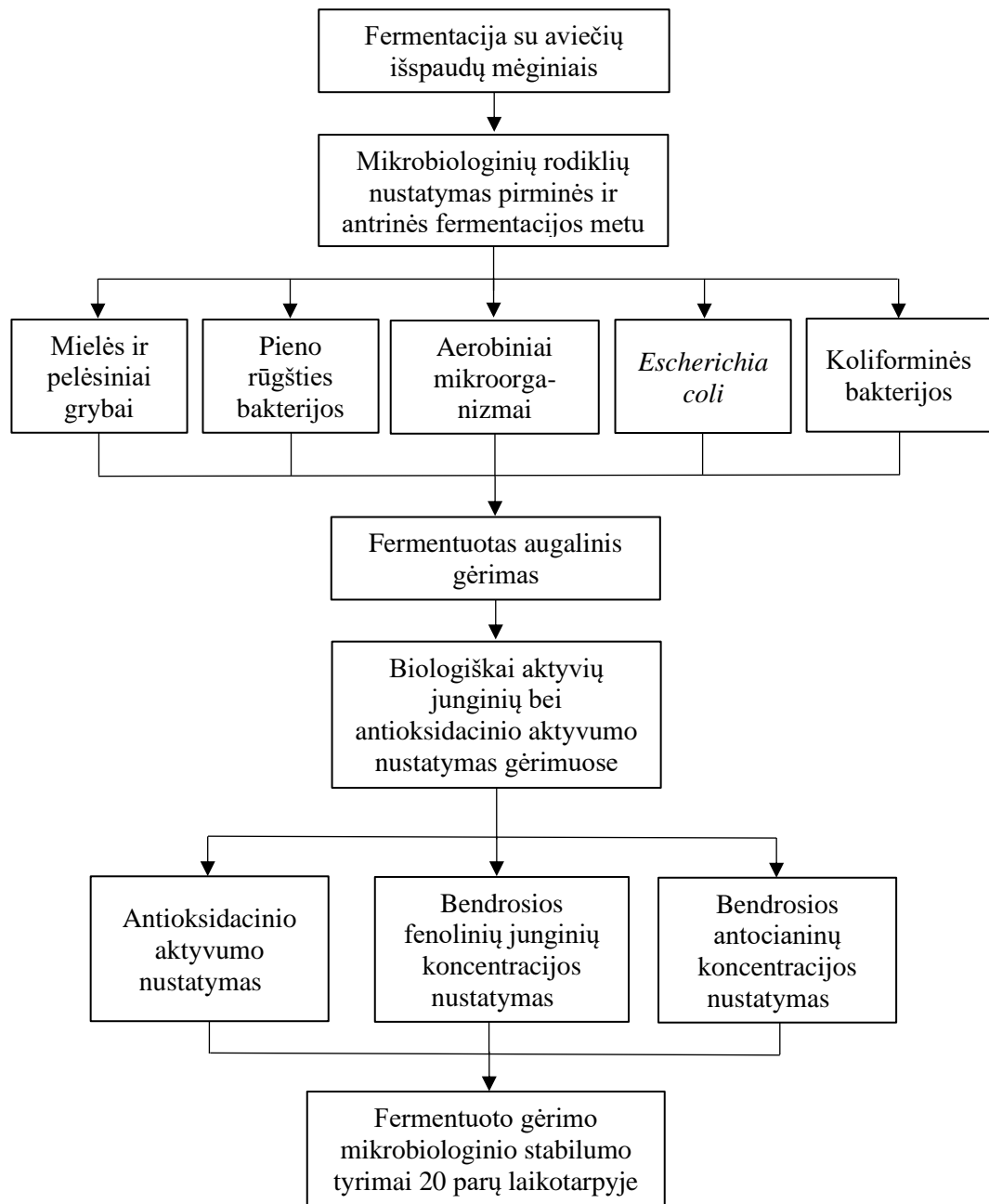
2.1 lentelė. Tyrimo metu naudotų reagentų ir medžiagų sąrašas

Medžiagos pavadinimas	Gamintojas
2 N Folino-Kiokalto reagentas	„Sigma-Aldrich“, Vokietija
Natrio acetatas	„Reachem“, Slovakija
Natrio karbonatas (Na ₂ CO ₃)	„Sigma-Aldrich“, Vokietija
Tanino rūgštis	„Sigma-Aldrich“, Vokietija
2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH)	„Sigma-Aldrich“, Vokietija
Kalio chloridas	„Sigma-Aldrich“, Vokietija
Metanolis	„Sigma-Aldrich“, Vokietija
Troloksas	„Sigma-Aldrich“, Vokietija
Druskos rūgštis (HCl)	„Sigma-Aldrich“, Vokietija
Pieno rūgšties bakterijos <i>Lactobacillus plantarum</i> F1	KTU Maisto instituto mikroorganizmų kolekcija
Pieno rūgšties bakterijos <i>Lactobacillus reuteri</i> 182	KTU Maisto instituto mikroorganizmų kolekcija
Nerafinuotas cukranendrių cukrus	„Klingai“, Lietuva
Žalioji arbata	„Japan Bancha“, Japonija
DNR išskyrimo rinkinys (foodproof Sample Preparation Kit III GMO's, Allergens, Animal ID)	„Biotecon Diagnostics“, Vokietija
Agaro terpė bendrajam mikroorganizmų skaičiaus nustatymui (angl. <i>plate count agar</i>)	„Merck KGaA“, Vokietija
MRS agaras	„Merck KGaA“, Vokietija
DRBC agaras	„Merck KGaA“, Vokietija
VRTL agaras	„Merck KGaA“, Vokietija
TBX agaras	„Merck KGaA“, Vokietija

Apibendrinta tyrimų schema pateikta 2.1 bei 2.2 paveiksluose.



2.1 pav. Tyrimo schema – pirma dalis



2.2 pav. Tyrimo schema – antra dalis

2.3. Tyrimo įranga

Tyrimo metu naudota aparatūra:

- Autoklavas „CV – EL“ („Certoclav“, Austrija);
- Centrifuga „Universal 320R“ („Hettich“, Vokietija);
- Termostatas „BD 115“ („Binder“, Vokietija);
- pH matuoklis „Orion 230A“ („Thermo Scientific“, JAV);
- Spektrofotometras „UV-1280“ („Shimadzu“, Japonija);
- Svarstyklės „Vibra AJ-220CE“ („Shinko Denshi“, Japonija);
- Mėgintuvėlių purtyklė „Bio Vortex V1“ („Biosan“, Latvija);
- Vandens vonelė „WNB 14“ („Mettler“, Vokietija);
- Ultragarsinė vonelė „Proclean 3.0DSP“ („Ulsonix“, Vokietija);

- Laminaras „Msc-Advantage“ („Themo Electron LED“, Vokietija);
- Magnetinė maišyklė „Mr Hei – Tec“ („Heidolph“, Vokietija);
- Sulčiaspaudė „4 290“ („Braun“, Čekijos Respublika).

2.4. Tyrimo metodai

2.4.1. Aviečių išspaudų cheminė analizė

Aviečių išspaudų cheminė analizė buvo atlikta pagal Komisijos reglamentą (EB) Nr. 152/2009, nustatantį oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos ėminių ėmimo ir analizės metodus [33]. Analizės metu nustatytas bendras baltymų, riebalų, mineralinių medžiagų ir drėgmės kiekis aviečių išspaudose. Aviečių išspaudų tyrimai atlikti Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centre, žemdirbystės institute, Agrocheminių tyrimų laboratorijoje pagal užsakymą.

2.4.2. Angliavandenių kiekio nustatymas

Angliavandenių kiekis (A) tiriamojoje žaliavoje (s.m.) apskaičiuotas pagal formulę:

$$A = 100 - (B + R + M) \quad (1)$$

čia: B, R, M – atitinkamai baltymų, riebalų ir mineralinių medžiagų kiekis aviečių išspaudose, išreikštas % sausoje medžiagoje (s.m.) [34].

2.4.3. Aviečių išspaudų ultragarsinio apdorojimo efektyvumo vertinimas

Ultragarsinis aviečių išspaudų apdorojimas atliktas naudojant 37 kHz (70 W) ultragarsą. Tyrimui naudotos šviežios aviečių išspaudos, kurios buvo supiltos į plastikinius polietileno maišelius (8 x 14 cm) su fiksatoriais po 25 gramus. Ultragarsinis apdorojimas vykdytas 35 °C temperatūroje taikant įvairius ultragarso intensyvumus (40, 70, 100 ir 120 %) bei apdorojimo trukmes (15, 30 ir 45 min).

Aviečių išspaudų apdorojimas 37 kHz ultragarsu vykdytas *Ultrasonic Cleaner Proclean 3.0DSP* vonelėje (2.3 pav.):



2.3 pav. Ultragarsinė įranga – Ulsonix Proclean 3.0DSP vonelė

Aviečių išspaudų ultragarsinio apdorojimo parametrai bei žaliavos žymėjimas (kodas) pateikiami 2.2 lentelėje:

2.2 lentelė. Aviečių išspaudų ultragarsinio apdorojimo parametrai ir mėginių žymėjimas

Aviečių išspaudų (žaliavos) kodas	Ultragarsinio apdorojimo intensyvumas, %	Ultragarsinio apdorojimo trukmė, min
AI-K	-	-
AI-40-15	40	15
AI-40-30		30
AI-40-45		45
AI-70-15	70	15
AI-70-30		30
AI-70-45		45
AI-100-15	100	15
AI-100-30		30
AI-100-45		45
AI-120-15	120	15
AI-120-30		30
AI-120-45		45

2.4.4. Aviečių išspaudų ekstrakto paruošimas

Aviečių išspaudų fenolinių junginių koncentracijos, antocianinų koncentracijos bei antioksidacinio aktyvumo nustatymui, buvo paruošti aviečių išspaudų vandeniniai ekstraktai. Į 15 ml centrifugavimo mėgintuvėlių patalpinta pasvertas 1 g aviečių išspaudų (apdorotų ir neapdorotų ultragarsu) bei užpilta 9 ml distiliuoto vandens. Mėgintuvėlių turinys maišytas magnetine maišykle 15 min ir centrifuguotas 9000 aps./min greičiu 10 min. Po centrifugavimo, supernatantas surinktas ir naudotas tyrimams.

2.4.5. pH vertės matavimas

Mėginių pH vertėms nustatyti buvo naudotas pH matuoklis „Orion 230A“. Prieš matavimus, buvo atliktas pH matuoklio kalibravimas su gamintojo paruoštais 4 ir 7 pH verčių buferiniais tirpalais.

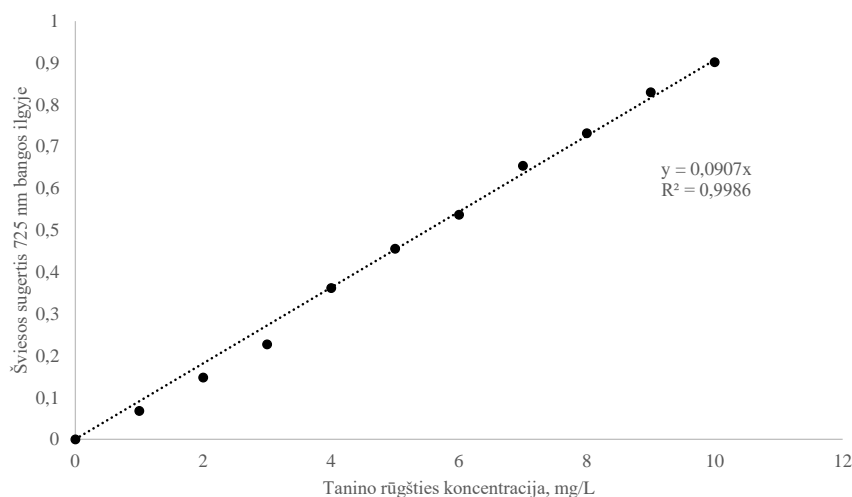
Matavimai atlikti aviečių išspaudų mėginiuose, pirminės ir antrinės gėrimo mėginių fermentacijos metu, šių mėginių laikymo tyrimuose 20 parų laikotarpyje ir tiriant *M. gisevii* kultūrą. Matavimai atlikti tris kartus pakartojant. Matavimo metu mėginiai buvo kambario temperatūros (20 °C).

2.4.6. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu

Fenoliniai junginiai yra augaluose randami antriniai metabolitai, pasižymintys antioksidaciniu aktyvumu. Bendroji fenolinių junginių koncentracija augalinėje žaliavoje yra nustatoma Folino-Kiokalto metodu. Šis metodas paremtas fenolinių junginių gebėjimo redukuoti Folino-Kiokalto reagentą, susidarant mėlynos spalvos kompleksui.

Kalibracinės kreivės paruošimui naudotas standartinis tanino rūgšties tirpalas (0,1 mg/ml). Standartiniai skiedimai atlikti sumaišius tanino rūgšties tirpalą su distiliuotu vandeniu (žr. 1 priedas) iki 500 µl ribos. Gauti 1 mg/L; 2 mg/L; 3 mg/L; 4 mg/L; 5 mg/L; 6 mg/L; 7 mg/L; 8 mg/L; 9 mg/L; 10 mg/L koncentracijų tanino rūgšties tirpalai. Į 500 µl gautųjų koncentracijų tirpalus pridėta 250 µl 1N Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo, sumaišyta ir inkubuota 40 min tamsoje, kambario temperatūroje. Po 40 min matuota šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje.

Pagal gautus rezultatus nubrėžta tanino rūgšties kalibracinė kreivė, kuri pavaizduota 2.4 paveiksle:



2.4 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė

Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymui, 30 µl tiriamojo mėginio (vandeninio aviečių išspaudų ekstrakto arba fermentuoto gėrimo mėginio) praskiesta distiliuotu vandeniu iki 500 µl ribos, įpilta 250 µl Folino-Kiokalto reagento bei 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišytas ir inkubuotas 40 min tamsoje. Tirpalo absorbcija išmatuota, esant 725 nm bangos ilgiui [35]. Bendroji fenolinių junginių koncentracija, išreikšta tanino rūgšties ekvivalentu (TRE) mg/100 g aviečių išspaudų, apskaičiuojama pagal formulę:

$$C(mg/100g) = \frac{c \cdot V \cdot PF \cdot 10^2}{m} \quad (2)$$

Bendroji fenolinių junginių koncentracija C (TRE mg/L) fermentuotuose gėrimuose apskaičiuojama pagal formulę:

$$C(mg/L) = c \cdot PF \quad (3)$$

čia: c – tanino rūgšties koncentracija iš kalibracinės kreivės, mg/L; V – pradinis ekstrakto tūris, L; m – augalinės žaliavos masė, g; PF – praskiedimo faktorius.

2.4.7. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu

Augalų antioksidacinis aktyvumas įvertinamas matuojant, kiek procentų stabilaus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizuoja antioksidantai, esantys tiriamajame mėginyje. Reakcijos metu, violetinės spalvos DPPH radikalai, reaguodami su antioksidantais, praranda spalvą, o šis spalvos pokytis išmatuojamas spektrofotometru.

Etaloninis DPPH tirpalas paruoštas ištirpinant 0,0024 g DPPH radikalo 100 ml metanolio.

Palyginamasis tirpalas paruoštas į mėgintuvėlį įpylus 0,077 ml distiliuoto vandens bei 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišytas mėgintuvėliu maišykle ir laikytas 15 minučių tamsoje. Praėjus 15 min, išmatuota tirpalo šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje.

Tiriamasis tirpalas paruoštas į mėgintuvėlį įpylus 0,077 ml tiriamojo mėginio bei 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišytas mėgintuvėliu maišykle ir laikytas 15 minučių tamsoje. Praėjus 15 min, išmatuota tirpalo šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje.

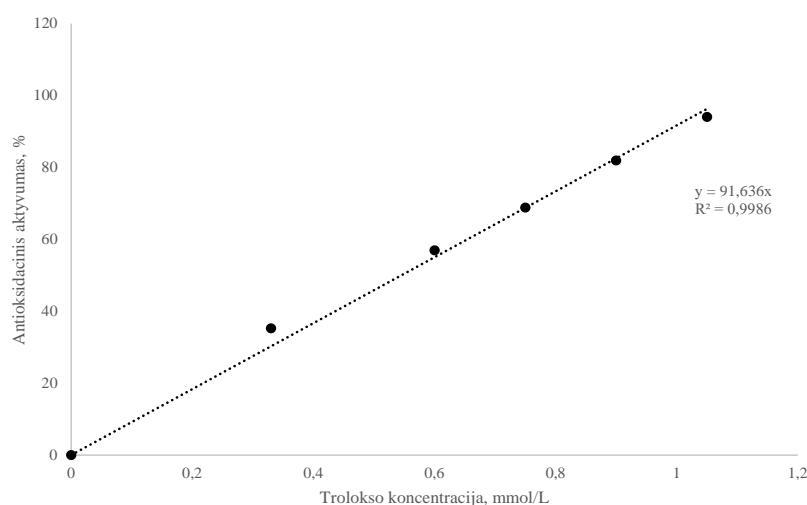
Antioksidacinis aktyvumas AA(%) apskaičiuotas pagal formulę:

$$AA(\%) = [(A_B - A_A)]/A_B \cdot 100 \quad (4)$$

čia: A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis; A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

Trolokso kalibracinės kreivės parengimui naudotas 1,2 mM trolokso tirpalas, kuris praskiestas su metanolium (žr. 2 priedas) iki 4 ml ribos. Gauti 0,30 mmol/L; 0,60 mmol/L; 0,75 mmol/L; 0,90 mmol/L; 1,05 mmol/L ir 1,20 mmol/L trolokso tirpalai. Į mėgintuvėlius įpilta 0,077 ml paruoštų koncentracijų trolokso tirpalų bei 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlių turinys buvo sumaišytas ir po 15 minučių laikymo tamsoje išmatuota tirpalų šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje. Apskaičiuotas antioksidacinis aktyvumas AA (%).

Pagal gautuosius duomenis nubraižyta kalibracinė kreivė. Ant y ašies atidėtas antioksidacinis aktyvumas AA(%), o ant x ašies – trolokso koncentracija tirpale, išreikšta mmol/L. Trolokso kalibracinė kreivė pateikta 2.5 paveiksle.



2.5 pav. Trolokso kalibracinė kreivė

Antioksidacinis aktyvumas aviečių išspaudose, išreikštas mg trolokso ekvivalentu (TE)/100 g augalinės žaliavos, apskaičiuotas pagal formulę:

$$C(mg/100g) = \frac{c \cdot V \cdot M \cdot 10^5}{m} \quad (5)$$

Antioksidacinis aktyvumas fermentuotuose gėrimų mėginiuose, išreikštas trolokso ekvivalentu mg/L, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$C(mg/L) = c \cdot M \cdot 10^3 \quad (6)$$

čia: c – trolokso koncentracija iš kalibracinės kreivės, mol/L; V – pradinis ekstrakto tūris, L; m – augalinės žaliavos masė, g; M – trolokso molekulinė masė, 250,3 g/mol.

2.4.8. Bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas

Antocianinai yra vandenyje tirpūs pigmentai, randami uogose, pavyzdžiui avietėse. Šių junginių nustatymui yra naudojamas pH diferencialinis metodas, kuris paremtas antocianinų spalvos pokyčiu, esant skirtingoms pH vertėms. Esant rūgštinėms sąlygoms (pvz. pH = 1), šie pigmentai būna raudonos spalvos, o esant aukštesnei pH vertei (pvz. pH = 4,5), antocianinai išblunka.

Bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymui buvo paruošti 0,025 M KCl (pH = 1) bei 0,4 M NaOAc (pH = 4,5) buferiniai tirpalai. Į 1 ml tiriamojo mėginio atskirai įpilta 980 μl KCl buferinio tirpalo bei 980 μl NaOAc buferinio tirpalo. Šviesos sugertis matuota esant 510 nm ir 700 nm bangos ilgiams.

Bendroji antocianinų koncentracija (BAK), išreikšta miligramais cianidin-3-gliukozido ekvivalentu (CGE) /100 g aviečių išspaudų, apskaičiuota pagal formulę:

$$BAK(mg/100 g) = \frac{A \cdot M \cdot PF \cdot 10^3}{\epsilon \cdot l} \cdot \frac{V \cdot 100}{m} \quad (7)$$

Fermentuotuos gėrimuose esanti BAK, išreikšta CGE mg/L, apskaičiuota pagal formulę:

$$BAK(mg/L) = \frac{A \cdot M \cdot PF \cdot 10^3}{\epsilon \cdot l} \quad (8)$$

čia: A – absorbcija; M – molekulinė masė (449,2 g/mol); PF – praskiedimo faktorius; ϵ – cianidin-3-gliukozido molinis adsorbcijos koeficientas (26900 l/mol cm); l – kiuvetės storis, cm; V – pradinis ekstrakto tūris, L; m – augalinės žaliavos masė, g.

Absorbcija A apskaičiuota pagal formulę:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH_1} - (A_{510} - A_{700})_{pH_{4,5}} \quad (9)$$

čia: $(A_{510} - A_{700})_{pH_1}$ – tiriamojo tirpalo absorbcijų skirtumas, esant 510 nm bei 700 nm bangos ilgiams, kuomet naudojamas KCl buferinis tirpalas (pH = 1); $(A_{510} - A_{700})_{pH_{4,5}}$ – tiriamojo tirpalo absorbcijų skirtumas, esant 510 nm bei 700 nm bangos ilgiams, kuomet naudojamas NaOAc buferinis tirpalas (pH = 4,5).

2.4.9. Pieno rūgšties bakterijų suspensijų paruošimas darbui

Pieno rūgšties bakterijos (PRB) parinktos pagal jų išsvystomą rūgštingumą ir antimikrobines savybes prieš technologiškai žalingas ir patogenines bakterijas. Tyrimui naudotos *L. plantarum* F1 ir *L. reuteri* 182 kultūros.

PRB suspensijos paruošimui, PRB bakterijų atšildytos iš KTU Maisto instituto mikroorganizmų kolekcijos (-80°C) ir paruoštos tokia seka: persėtos ant “karoliukų”; persėtos ant skystos MRS terpės; persėtos į sterilų pieną; persėtos ant nuožulnaus MRS agarą bei įvertintos kiekybiškai. Mėginiai fermentuoti 24 val., optimalioje PRB kultyvavimo temperatūroje. Nuplauta su 20 ml sterilaus vandens, homogenizuota, atliktas kiekybinis mikroorganizmų įvertinimas. Gauta PRB suspensija, kuri naudota antrinės fermentacijos tyrimams. Gautųjų suspensijų PRB koncentracijos - 10⁸ KSV/g.

2.4.10. Fermentacijos mėginių modulinį sistemų paruošimo eiga

Pirminė fermentacija. Mikrobiologijos laboratorijoje aseptinėmis sąlygomis buvo paruoštas A tirpalas: Į cilindro formos stiklinį 2,5 L talpos indą verdančiu vandeniu užpilta 7,5 g (3 g/1 L) žaliosios arbatos. Atvėsinus iki 25–27 °C temperatūros, arbata nukošta, įdėta 175 g (70 g/1 L) nerafinuoto cukranendrių cukraus. Gautasis mišinys homogenizuotas bei atvėsintas iki 20 ± 1 °C temperatūros.

Medusomyces gisevii biologinė struktūra talpinta į 2,5 L indą su atvėsintu žaliosios arbatos ir cukraus mišiniu. Šis nefermentuotas ruošinys vadinamas B tirpalu.

Fermentuojamas mišinys (B tirpalas) fermentuotas 4 paras 20 ± 1 °C temperatūroje. Mišinio terpės pH vertė matuota nuo pirmos fermentavimo valandos 24 h intervalu. Po pirminės fermentacijos gautasis tirpalas vadinamas C tirpalu.

Antrinė fermentacija. Pirminės fermentacijos metu gautasis tirpalas C įpiltas į sterilų 200 ml talpos buteliuką. Į šią talpą įdėti atitinkami komponentai, nurodyti 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. Fermentuotų gėrimų mėginių komponentai

Mėginio pavadinimas	Aviečių išspaudų (žaliavos) kodas	Medžiagos kiekis, g				
		D tirpalas, g	<i>L. reuteri</i> suspensija, g	<i>L. plantarum</i> suspensija, g	Aviečių išspaudos, g	Rudasis cukrus, g
C	-	163	-	-	-	7
CR	-	161,5	1,5	-	-	7
CP	-	161,5	-	1,5	-	7
AC	AI-K	148	-	-	15	7
ACR	AI-K	146,5	1,5	-	15	7
ACP	AI-K	146,5	-	1,5	15	7
UA1C	AI-70-45	148	-	-	15	7
UA1CR	AI-70-45	146,5	1,5	-	15	7
UA1CP	AI-70-45	146,5	-	1,5	15	7
UA2C	AI-120-30	148	-	-	15	7
UA2CR	AI-120-30	146,5	1,5	-	15	7
UA2CP	AI-120-30	146,5	-	1,5	15	7

Fermentuotų mėginių gamyboje buvo panaudotos ultragarsu apdorotos bei neapdorotos aviečių išspaudos, pažymėtos žaliavos kodu (žr. 2.4.3 skyrių). Taip pat, įpilta 1,5 g PRB suspensijų (*L. plantarum* ir *L. reuteri*). Antrinė fermentacija vykdyta 3 paras, esant 20 °C ± 1 °C temperatūrai. Gautasis tirpalas vadinamas D tirpalu.

Po antrinės fermentacijos D tirpalas nufiltruotas ir supilstytas į 200 ml stiklinius buteliukus. Buteliukai laikyti 3 ± 1 °C temperatūroje iki tolimesnės analizės.

2.4.11. *Medusomyces gisevii* kultūros metagenominė analizė

DNR išskyrimas vykdytas pasitelkus *Biotecon Diagnostics foodproof Sample Preparation Kit III GMO's, Allergens, Animal ID* rinkinį. Rinkinys yra skirtas DNR išskyrimui iš įvairių augalinės ir

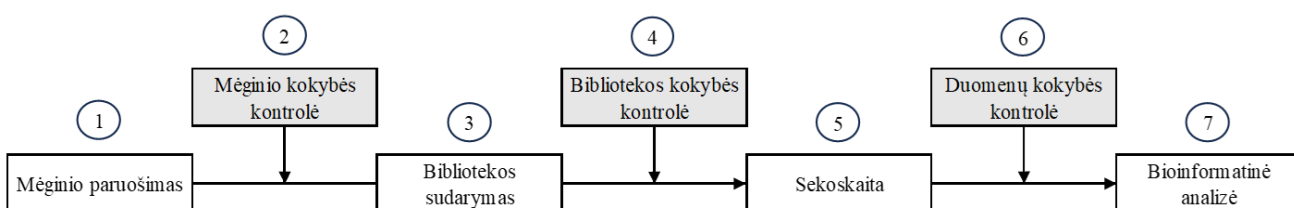
gyvūninės kilmės maisto mėginių. Išskirtų nukleorūgščių išeiga, gauta iš 200 mg mėginio, gali svyruoti nuo 0,1 iki 10 µg.

Mėginio paruošimas metagenominei analizei atliktas tokia seka:

- Atsverta 200 mg homogenizuoto mėginio ir patalpinta į 2 ml reakcijos mėgintuvėlį (mėgintuvėlis A);
- Į mėgintuvėlį įpilta 1000 µl ekstrakcijos buferio;
- Mėgintuvėlis su turiniu maišytas „Vortex“ mėgintuvėlių maišykle 30 s.;
- Į mėgintuvėlį pridėta 80 µl proteinazės K (100 mg / 5 ml ddH₂O) ir sumaišyta;
- Mėgintuvėlis inkubuotas 30 min 72 °C. Inkubacijos metu mėgintuvėlis 2–3 kartus sumaišytas paverčiant mėgintuvėlį žemyn ir aukštyn. Jeigu mėginio matrica absorbuoja ekstrakcijos buferinį tirpalą, papildomai jo pridedama;
- Mėgintuvėlis su turiniu centrifuguotas 10 min 12 000 x g greičiu;
- Į naują mėgintuvėlį įpilta 400 µl surišimo buferinio tirpalo;
- Į mėgintuvėlį įpilta 200 µl izopropanolio ir sumaišyta;
- Iš mėgintuvėlio A į mėgintuvėlį B perkelta 600 µl supernatanto ir sumaišyta;
- Su pipete paimta 650 µl mišinio ir įpilta į mėgintuvėlį su filtru. Mėgintuvėlis ccentrifuguotas 1 min 5,000 x g greičiu;
- Mėgintuvėlis su supernatantu išmestas, o mėgintuvėlis su filtru įdėtas į naują surinkimo mėgintuvėlį. Likęs mišinys supiltas į tą patį filtravimo mėgintuvėlį ir centrifuguotas 1 min 5,000 x g greičiu;
- Supernatantas išpiltas, o filtravimo mėgintuvėlis įdėtas į naują surinkimo mėgintuvėlį. Įpilta 450 ul plovimo buferinio tirpalo ir centrifuguota 1 min 5,000 x g greičiu;
- Supernatantas išpiltas ir pakartotinai naudotas surinkimo mėgintuvėlis. Įpilta 450 ul plovimo buferinio tirpalo ir centrifuguota 1 min 5,000 x g greičiu;
- Supernatantas išpiltas ir pakartotinai naudotas surinkimo mėgintuvėlis. Likusiam buferiniam tirpalui pašalinti, dar kartą centrifuguota 10 s 13 000 x g greičiu;
- Filtravimo mėgintuvėlis įdėtas į naują 1,5 ml reakcijos mėgintuvėlį. Įpilta 200 µl 70 °C temperatūros eliacijos buferinio tirpalo;
- Mėgintuvėlis su turiniu inkubuotas kambario temperatūroje 5 min ir centrifuguotas 1 min 5000 x g greičiu.

Paruoštas mėginys yra buvo saugomas nuo -15 iki -25 °C temperatūroje iki metagenominės analizės atlikimo etapo.

M. gisevii automatinė sekoskaita ir duomenų analizė buvo atlikta pagal 2.6 paveiksle pateiktą schemą:



2.6 pav. *M. gisevii* metagenomo automatinės sekoskaitos pagrindiniai etapai

Metagenomo sekoskaitos etapai (3–6) buvo atlikti įmonės „Novogene“ pagal užsakytą projektą.

Išvalytų sekų bioinformacinė analizė atlikta naudojant programines įrangas:

- „Fastp“ – naudojama duomenų iš *Illumina* platformos apdorojimui. Gautieji apdoroti duomenys naudojami tolimesnei analizei;
- „MEGAHIT“ – naudojama apdorotų duomenų surinkimo analizei;
- „MetaGeneMark“ – naudojama DNR fragmentuose (≥ 500 bp) esančių baltymus koduojančių genų nustatymui;
- „DIAMOND“ – naudojama DNR sekų sulyginimui su *MicroNR* duomenų bazėje esančiomis DNR sekomis.

Gautieji nukleino ir amino rūgčių sekų rezultatai buvo įvertinti pagal genetinių informacinių bazių duomenis:

- Taksonominė analizė – gautosios metagenominės sekos buvo lyginamos su „MicroNR“ (versija: 2023.03) duomenų baze, kurioje talpinamos bakterijų, grybų, archėjų bei virusų DNR sekos, gautos iš „NCBI“ esančios „NR“ duomenų bazės;
- Funkcijų analizė - baltymus koduojančių sekų funkcijos buvo nustatytos lyginant jas su duomenų baze „CAZy“ (versija: 2023.03);
- Atsparumo antibiotikams analizė – gautieji genai buvo sulyginti su „CARD“ duomenų baze, naudojant joje esančią atsparumo antibiotikams genų identifikavimo programinę įrangą (angl. *Resistance Gene Identifier*) [36, 37].

2.4.12. Mikrobiologinė analizė

Kiekybinių mikroorganizmų pokyčių vertinimui pirminės ir antrinės fermentacijos metu, fermentuotų gėrimų mėginių laikymo tyrimuose bei analizuojant *M. gisevii*, buvo pasirinkti šie mikroorganizmai: aerobiniai mikroorganizmai, mielės, pelėsiai, mezofilinės PRB ir maisto saugą charakterizuojantys mikrobiologiniai rodikliai – koliforminės bakterijos ir *E. coli* bakterijos.

- Aerobinių mikroorganizmų skaičiaus nustatymas atliktas pagal LST EN ISO 4833-1:2013 [38].
- Mielių ir pelėsių grybų skaičiaus nustatymas atliktas pagal LST ISO 21527-1:2008 standartą [39].
- Mezofilinių PRB skaičiaus nustatymas atliktas pagal LST ISO 15214:2009 standartą [40].
- Koliforminių bakterijų skaičiaus nustatymas atliktas pagal LST ISO 4832:2006 standartą [41].
- *E. coli* skaičiaus nustatymas atliktas pagal LST ISO 16649-2:2009 standartą [42].

***M. gisevii* mikrobiologinės analizės** atlikimui, į mėgintuvėlį buvo pasvertas 1 g kultūros ir praskiesta 9 ml distiliuoto vandens. Mėgintuvėlio turinys homogenizuotas, o kiekybinis mikroorganizmų skaičius nustatytas atlikus dešimtkarčius skiedimus.

Mikrobiologinė analizė atlikta dviejose gėrimų fermentacijos stadijose. Pirminės fermentacijos metu mėginiai buvo tiriami nuo pradinio taško (1 h nuo fermentacijos pradžios) kas 24 valandas per 4 dienų laikotarpį. Antrinės fermentacijos metu mėginiai buvo tiriami nuo pradinio taško (1 h nuo fermentacijos pradžios) kas 24 valandas per 3 dienų laikotarpį. Gėrimų mėginiams buvo atliekami dešimtkarčiai skiedimai.

Mikrobiologinio stabilumo analizė buvo atlikta siekiant įvertinti fermentuotų gėrimų mėginių mikrobiologinį stabilumą per 20 dienų laikotarpį. Mėginiai buvo imami keturiais skirtingais taškais: pradiniam (0 d.), po šešių dienų (6 d.), po trylikos dienų (13 d.) ir po dvidešimties dienų (20 d.). Kiekviename taške nustatytas mėginyje esantis mielių, pelėsinų grybų, mezofilinių PRB, anaerobinių mikroorganizmų, koliforminių ir *E. coli* bakterijų skaičius. Gėrimų mėginiams buvo atlikti dešimtkarčiai skiedimai.

2.4.13. Juslinė analizė

Juslinių savybių įvertinimui taikytas juslinių savybių profilio testas pagal ISO 13299 [43]. Apmokyta vertintojų grupė išanalizavo iš anksto atrinktus mėginius bei parinko sąvokas jų juslinėms savybėms apibūdinti. Naudojant atrinktas savybes buvo parinktos skalės tų savybių intensyvumui įvertinti. Fermentuotų gėrimų mėginių kiekvienos savybės intensyvumas pažymėtas atskiroje skalėje. Iš šių duomenų, taikant matematinės statistikos metodus, kiekvienam mėginiui sudarytas juslinių savybių profilis, parodantis kiekvienos savybės intensyvumą. Juo remiantis, galima palyginti mėginius pagal atskiras savybes bei jų intensyvumą, nustatyti ryšį tarp mėginių juslinės kokybės bei atskirų savybių.

Jusliniam įvertinimui atlikti buvo pasitelkta 6 apmokytų vertintojų grupė. Vertintojai atrinkti ir apmokyti dirbti pagal tarptautinės metodikos ISO 8586 reikalavimus [44]. Juslinė analizė buvo atlikta praėjus savaitei nuo fermentuotų gėrimų mėginių paruošimo. Fermentuoti gėrimai buvo pateikti +10 °C temperatūros ir supilstyti į 50 ml tūrio taureles. Juslinėms savybėms vertinti buvo pasitelkta 5 balų sistema. Iš viso įvertinta 12 mėginių pagal tokius parametrus, kaip spalva, skonis, kvapas ir bendras priimtumas skalėje nuo 1 iki 5. Juslinio vertinimo anketa pateikta 3 priede.

2.4.14. Statistinė analizė

Tyrimo skaičiavimai atlikti „MS Excel“ (2016 m.) kompiuterine programa. Tyrimų rezultatai pateikti apskaičiuotus vidutines vertes bei vidutinius standartinius nuokrypius (taikant funkciją „STDEV“).

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Šiame skyriuje pateikiami baigiamojo magistro darbo tyrimų rezultatai, jų analizė bei palyginimas su mokslinėje literatūroje pateikta informacija.

3.1. Aviečių išspaudų cheminė sudėtis

Siekiant ištirti tyrimuose naudotos žaliavos cheminę kompoziciją, buvo atliktas riebalų, baltymų, mineralinių medžiagų, angliavandenių bei drėgmės nustatymas aviečių išspaudose.

Aviečių cheminės sudėties analizės rezultatai pateikti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Aviečių išspaudų cheminė sudėtis, išreikšta % sausoje medžiagoje (s.m.)

Komponentas	Kiekis, %
Drėgmė	81,51 ± 0,20
Riebalai	7,03 ± 0, 0,20
Baltymai	12,17 ± 0,20
Angliavandeniai	78,10 ± 0,00
Mineralinės medžiagos	2,70 ± 0,00

Tiriamosiose aviečių išspaudose nustatytas 81,51 ± 0,20 % drėgmės kiekis. Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad uogų išspaudose drėgmės kiekis vidutiniškai būna 60–70 % [45]. V.P.Gouw ir kt. (2017) tyrime nurodoma, kad drėgmės kiekis uogų ir vaisių išspaudose būna 36,12–81,50 % [46]. O. Radočaj ir kt. (2014) tyrime nustatyta, kad drėgmės kiekis šviežiose aviečių išspaudose yra 50,05 ± 0,08 % [47]. Panašius rezultatus nurodė ir S. Santos ir kt. (2021) atliktame tyrime, kuriame pateikiama, kad aviečių išspaudose esantis drėgmės kiekis yra 53,91 % [48]. Taigi, drėgmės kiekis aviečių išspaudose gali būti įvairus ir priklausyti nuo aviečių perdirbimo technologijos.

Nustatyta, kad aviečių išspaudose riebalų kiekis siekė 7,03 ± 0,20 %, baltymų – 12,17 ± 0,20 %, mineralinių medžiagų – 2,70 ± 0,00 %, o angliavandenių – 78,10 ± 0,00 % (išreikštų s.m.). Tyrimo metu angliavandenių įvertinimui aviečių išspaudose, buvo pasitelkta skaičiavimų formulė, o ne tiesioginis angliavandenių nustatymo metodas. Į bendrą apskaičiuotą angliavandenių kiekį taip pat įeina ir maistinės skaidulos, kurios sudaro didžiausią kiekį visų komponentų aviečių išspaudose [49].

Gautieji rezultatai yra panašūs į kitų autorių moksliniuose šaltiniuose nurodytus rezultatus. B. Fotschki ir kt. (2019) tyrime nurodoma, kad aviečių išspaudose yra 11,44 ± 0,10 % riebalų, 11,20 ± 0,31 % baltymų, 1,68 ± 0,00 % mineralinių medžiagų bei 65,90 % angliavandenių, į kuriuos įeina ir maistinės skaidulos [49]. J. Bauza-Kaszewska ir kt. (2021) tyrime nustatyta, kad aviečių išspaudose yra 11,4 ± 0 % baltymų, o mineralinių medžiagų – 2,68 ± 0,25 % [50]. Taigi, tyrimo metu analizuota aviečių išspaudų cheminė sudėtis yra panaši į kitų autorių nurodytus duomenis.

3.2. Aviečių išspaudų ultragarsinio apdorojimo efektyvumas

3.2.1. pH vertės pokytis

Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad ultragarsas gali turėti įtakos augalinės žaliavos fizikocheminėms savybėms [51]. Vienas iš fizikocheminių žaliavos rodiklių yra pH vertė, dėl to tyrimo metu buvo ištirta ultragarso įtaka aviečių išspaudų pH vertei. Rezultatai pateikti 3.2 lentelėje:

3.2 lentelė. Aviečių išspaudų pH vertė po ultragarsinio apdorojimo

Aviečių išspaudų (žaliavos) kodas	Aviečių išspaudų pH vertė
AI-K	3,17 ± 0,03
AI-40-15	3,18 ± 0,02
AI-40-30	3,17 ± 0,02
AI-40-45	3,17 ± 0,02
AI-70-15	3,17 ± 0,02
AI-70-30	3,16 ± 0,01
AI-70-45	3,15 ± 0,02
AI-100-15	3,14 ± 0,03
AI-100-30	3,14 ± 0,02
AI-100-45	3,15 ± 0,01
AI-120-15	3,14 ± 0,03
AI-120-30	3,13 ± 0,02
AI-120-45	3,15 ± 0,02

Tyrimo metu nustatyta, kad ultragarsas neturėjo reikšmingos įtakos aviečių išspaudų pH vertei, lyginant su kontroliniu mėginiu AI-K (ultragarsu neapdorotomis aviečių išspaudomis). Taigi, tyrimo metu nebuvo nustatytas sąryšis tarp ultragarsinio apdorojimo poveikio trukmės, ultragarso intensyvumo bei pH vertės pokyčių.

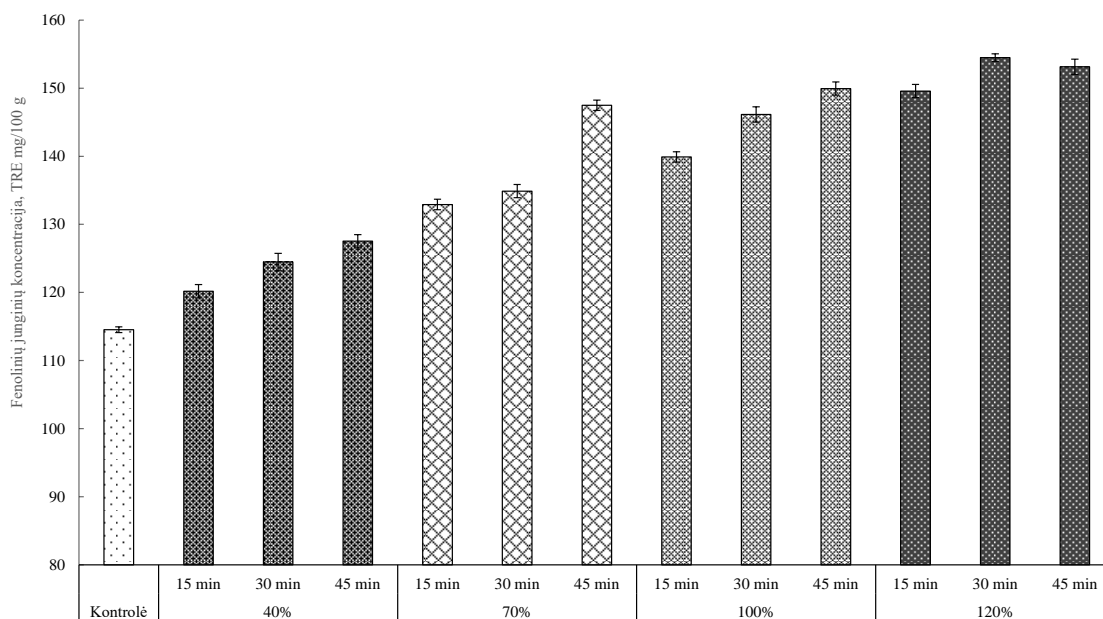
Tyrimo rezultatai atitinka mokslinėje literatūroje pateikiamą informaciją, kurioje nurodoma, kad ultragarsinis apdorojimas neturi įtakos augalinių produktų pH vertei. K. Aguilar (2022) tyrime nurodoma, jog veikiant ananasų perdirbimo pramonės šalutinius produktus 25 kHz ultragarsu (400 W, 20 ir 100 % amplitudžių, 5 ir 10 min), pH vertės pokyčiai nebuvo statistiškai reikšmingi, lyginant su kontroliniu mėginiu [52].

Taip pat, ne vienas tyrimas nustatė daržovių bei vaisių sulčių fizikocheminių rodiklių pokyčius po apdorojimo ultragarsu. S. Guanwen ir kt. (2021) tyrime nurodoma, kad moliūgų sultis apdorojus 5 min 25 kHz (100, 200 ir 300 W) ultragarsu, pH vertė reikšmingai nepakito [53].

Y. Zou ir kt. (2017) tyrime, kuriame atliktas mėlynių sulčių apdorojimas 40 kHz ultragarsu (0,5 W/cm²) 20, 40 ir 60 min, pH vertė taip pat reikšmingai nepakito, nepriklausomai nuo apdorojimo trukmės [54].

3.2.2. Bendroji fenolinių junginių koncentracija

Tyrimo metu buvo nustatyta ultragarsinio apdorojimo parametrų įtaka fenolinių junginių ekstrakcijos efektyvumui. Aviečių išspaudų mėginių fenolinių junginių koncentracijos, išreikštos mg tanino rūgšties ekvivalentu (TRE)/100 g, pateiktos 3.1 paveiksle.



3.1 pav. Fenolinių junginių koncentracija, išreikšta mg tanino rūgšties ekvivalentu (TRE)/100 g aviečių išspaudose

Nustatyta, kad šviežiose aviečių išspaudose (kontroliniame mėginyje) fenolinių junginių koncentracija buvo $114,54 \pm 0,42$ mg TRE/100 g. Didžiausias skirtumas pastebėtas mėginiuose, apdorotuose 120 % intensyvumo ultragarsu 15, 30 ir 45 min. Šiuose mėginiuose nustatytos fenolinių junginių koncentracijos atitinkamai buvo $149,58 \pm 0,97$, $154,48 \pm 0,56$ ir $153,13 \pm 1,12$ mg TRE/100 g. Lyginant su kontroliniu mėginiu, fenolinių junginių koncentracija šiuose mėginiuose vidutiniškai padidėjo 23,42 %, 25,85 % ir 25,20 %, atitinkamai.

Taip pat, žymus skirtumas pastebėtas ir mėginiuose, apdorotuose 100 % intensyvumo ultragarsu 45 min bei 70 % intensyvumo ultragarsu 45 min. Fenolinių junginių koncentracija šiuose mėginiuose nustatyta $154,85 \pm 0,42$ bei $147,49 \pm 0,77$ mg TRE/100 g, atitinkamai. Lyginant su kontroliniu mėginiu, fenolinių junginių koncentracija šiuose mėginiuose padidėjo 26,03 % bei 22,34 %, atitinkamai. Mėginiai, apdoroti 70 % intensyvumo (15, 30 min) ir 100 % intensyvumo (15, 30 min) ultragarsu, vidutiniškai pasižymėjo 14,46 % ir 19,91 % didesne fenolinių junginių koncentracija, atitinkamai, lyginant su kontrole.

Mažiausias skirtumas pastebėtas mėginiuose, paveiktuose 40 % intensyvumo ultragarsu (15, 30 ir 45 min). Nustatyta, kad šie mėginiai pasižymėjo vidutiniškai 7,67 % didesne fenolinių junginių koncentracija, lyginant su kontrole.

Tyrimo rezultatai rodo, kad didėjant ultragarsinio apdorojimo trukmei, didėja ir fenolinių junginių koncentracija mėginiuose. Ši tendencija pastebėta visuose mėginiuose, išskyrus 120 % ir 45 min apdorotame mėginyje, kuriame nustatyta mažesnė fenolinių junginių koncentracija nei 120 % ir 30 min paveiktame mėginyje. Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad ultragarsas gali ne tik pagerinti fenolinių junginių ekstrakciją, bet ir sukelti jų degradaciją [55]. Taigi, svarbu parinkti tokius ultragarsinio apdorojimo parametrus, kurie lemtų didžiausias fenolinių junginių koncentracijas mėginiuose.

S. Santos ir kt. (2021) tyrime nurodoma, jog aviečių išspaudų suspensiją veikiant 40 kHz ultragarsu 15 min (60 °C), fenolinių junginių koncentracija padidėjo 20,6 %, lyginant su kontrole. Tuo tarpu mėginį veikiant 45 min, fenolinių junginių koncentracija padidėjo 15,02 %, lyginant su kontroliniu mėginiu [48]. Tyrime pastebėta, kad mažesnė ultragarso poveikio trukmė lemia didesnes fenolinių junginių koncentracijas, priešingai nuo šiame tyrime gautųjų rezultatų. Svarbu pabrėžti, kad tokie parametrai kaip temperatūra bei ultragarso intensyvumas taip pat turi reikšmingos įtakos biologiškai aktyvių junginių ekstrakcijai ir netgi jų degradacijai.

S. Golmohamadi ir kt. (2013) atliktame tyrime nustatyta, kad apdorojant aviečių tyrę aukšto intensyvumo 20 kHz dažnio ultragarsu, po 10 min fenolinių junginių koncentracija padidėjo 5,16 %, po 20 min – 9,63 %, po 30 min – 11,97 %, lyginant su kontrole. Taigi, šiame tyrime nustatyta, kad ultragarsinio apdorojimo trukmė turėjo teigiamos įtakos fenolinių junginių ekstrakcijos efektyvumui [56].

3.2.3. Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

Tyrimo metu buvo ištirta ultragarsinio apdorojimo įtaka aviečių išspaudų antioksidaciniam aktyvumui, esant skirtingiems ultragarso intensyvumams bei poveikio trukmėms. Ultragarsu veikiant augalinę žaliavą, iš augalinės matricos išsilaisvina antioksidaciniu aktyvumu pasižymintys junginiai.

Aviečių išspaudų mėginių antioksidacinis aktyvumas, išreikštas mg trolokso ekvivalento (TE)/100 g, pateiktas 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. Aviečių išspaudų mėginių antioksidacinis aktyvumas, išreikštas mg trolokso ekvivalento (TE)/100 g

Aviečių išspaudų (žaliavos) kodas	Ultragarso intensyvumas, %	Ultragarsinio apdorojimo trukmė, min	Antioksidacinis aktyvumas, mg TE/100 g
AI-K	-	-	195,95 ± 0,94
AI-40-15	40	15	197,01 ± 0,26
AI-40-30		30	201,69 ± 0,45
AI-40-45		45	202,15 ± 1,20
AI-70-15	70	15	201,25 ± 0,45
AI-70-30		30	206,05 ± 1,31
AI-70-45		45	211,32 ± 1,59
AI-100-15	100	15	202,28 ± 1,59
AI-100-30		30	206,35 ± 1,38
AI-100-45		45	212,23 ± 0,69
AI-120-15	120	15	210,89 ± 1,38
AI-120-30		30	219,03 ± 2,04
AI-120-45		45	221,59 ± 1,20

Nustatyta, kad kontrolinis mėginys pasižymėjo mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su kitais mėginiais ir jo vertė siekė 195,95 ± 0,94 mg TE/100 g. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo mėginiai, paveikti 120 % intensyvumo ultragarsu 30 min ir 45 min. Atitinkamai, šių mėginių vertės buvo 219,03 ± 2,04 mg TE/100 g ir 221,59 ± 1,20 mg TE/100 g. Vidutiniškai, šie mėginiai pasižymėjo 9,77 % didesniu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su kontrole.

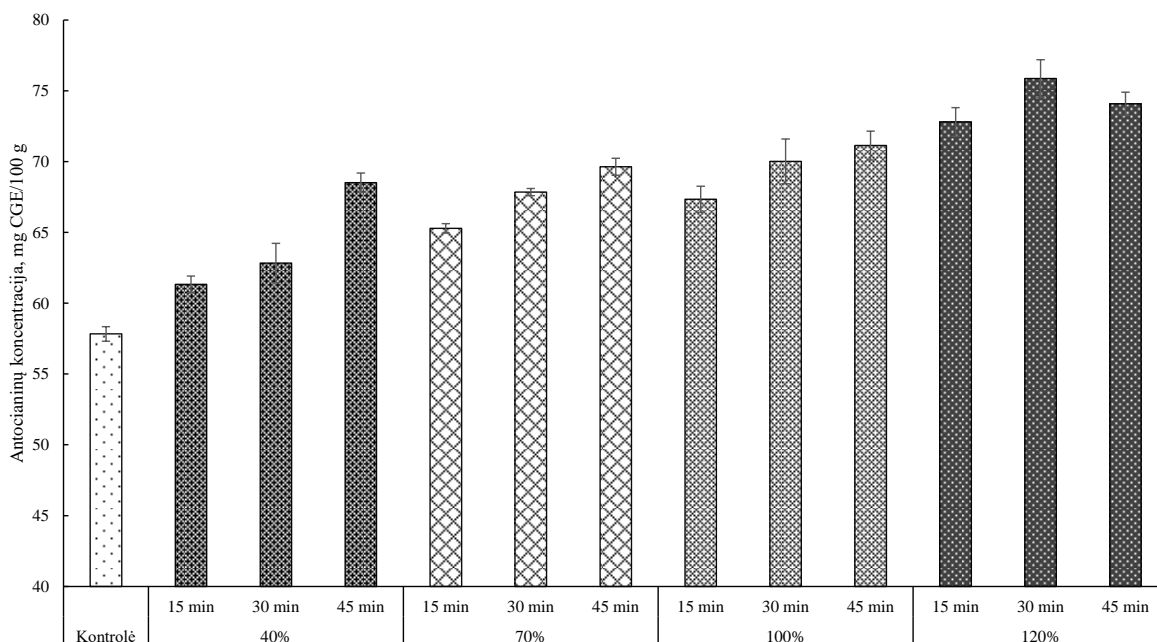
Didesniu antioksidaciniu aktyvumu taip pat pasižymėjo ir mėginiai, apdoroti 70 % intensyvumo ultragarsu 45 min bei 100 % intensyvumo ir 45 min. Šiuose mėginiuose nustatytas antioksidacinis aktyvumas siekė $211,32 \pm 1,59$ mg TE/100 g ir $212,23 \pm 0,69$ mg TE/100 g, atitinkamai.

Mažiausias antioksidacinio aktyvumo skirtumas pastebėtas mėginiuose, paveiktuose 40 % intensyvumo ultragarsu (15, 30 ir 45 min). Nustatyta, kad šie mėginiai pasižymėjo vidutiniškai 2,16 % didesniu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su kontroliniu mėginiu. Mėginiai, apdoroti 70 % intensyvumo (15, 30 min) ir 100 % intensyvumo (15, 30 min) ultragarsu, vidutiniškai pasižymėjo 3,78 % ir 4,10 % didesniu antioksidaciniu aktyvumu, atitinkamai, lyginant su kontrole. Nustatyta, kad didėjant ultragarsinio apdorojimo trukmei, didėjo ir antioksidacinis aktyvumas aviečių išspaudų mėginiuose.

Mokslinėje literatūroje taip pat nurodoma, jog ultragarsu paveikus uogų išspaudas, padidėja jų antioksidacinis aktyvumas. Pavyzdžiui, S. Santos ir kt. (2021) tyrime nurodoma, kad aviečių išspaudų apdorojimas 40 kHz dažnio ultragarsu 15 min padidina antioksidacinį aktyvumą 22,64 %, o veikiant 45 min – 10,11 % [48]. Autoriai pastebėjo neigiamą koreliaciją tarp ultragarso poveikio trukmės ir antioksidacinio aktyvumo vertės, priešingai nuo šiame tyrime pateiktų rezultatų.

3.2.4. Bendroji antocianinų koncentracija

Aviečių išspaudų ultragarsinio apdorojimo įtakai biologiškai aktyvių junginių ekstrakcijai nustatyti, buvo iširta antocianinų koncentracija aviečių išspaudų mėginiuose. Antocianinų koncentracija nustatyta pH diferenciacijos būdu ir išreikšta mg cianidin-3-gliukozido ekvivalentu (CGE)/100 g aviečių išspaudų. Tyrimo rezultatai pateikti 3.2 paveiksle.



3.2 pav. Antocianinų koncentracija aviečių išspaudų mėginiuose, išreikšta mg cianidin-3-gliukozido ekvivalentu (CGE)/100 g

Nustatyta, kad šviežiose aviečių išspaudose (kontroliniame mėginyje) antocianinų koncentracija buvo $57,83 \pm 1,02$ mg CGE/100 g. Didžiausias skirtumas pastebėtas mėginiuose, apdorotuose 120 %

intensyvumo ultragarsu 15, 30 ir 45 min. Šiuose mėginiuose atitinkamai nustatytos antocianinų koncentracijos yra $72,81 \pm 1,02$, $75,87 \pm 1,34$ ir $74,09 \pm 0,82$ mg CGE/100 g, atitinkamai. Lyginant su kontroliniu mėginiu, antocianinų koncentracija šiuose mėginiuose vidutiniškai padidėjo 20,57 %, 23,77 % ir 21,94 %, atitinkamai.

Taip pat, reikšmingas antocianinų koncentracijos padidėjimas pastebėtas ir mėginiuose, apdorotuose 100 % intensyvumo ir 45 min bei 70 % intensyvumo ir 45 min ultragarsu. Antocianinų koncentracija šiuose mėginiuose nustatyta $71,14 \pm 1,02$ ir $69,63 \pm 0,60$ mg CGE/100 g, atitinkamai. Lyginant su kontroliniu mėginiu, antocianinų koncentracija šiuose mėginiuose padidėjo 18,70 % bei 16,95 %, atitinkamai.

Mėginiai, paveikti 70 % intensyvumo (15, 30 min) ir 100 % intensyvumo (15,30 min) ultragarsu, vidutiniškai pasižymėjo 12,71 % ir 15,77 % didesniu antioksidaciniu aktyvumu, atitinkamai (lyginant su kontrole).

Mėginiuose, paveiktuose 40 % intensyvumo ultragarsu (15, 30 ir 45 min), nustatyta vidutiniškai 9,76 % didesnė antocianinų koncentracija. Lyginant su kitais apdorojimo režimais, 40 % intensyvumo ultragarsas turėjo mažiausios įtakos antocianinų ekstrakcijai.

S. Santos ir kt. (2021) tyrime nurodoma, jog veikiant aviečių išspaudas 40 kHz ultragarsu 15 min, antocianinų koncentracija padidėjo 16,67 %, lyginant su kontroliniu mėginiu. Ultragarsu mėginį veikiant 45 min, antocianinų koncentracija padidėjo 25,00 %, lyginant su kontrole. Taigi, tyrimo rezultatai sutampa su kitų autorių tyrimais ir nurodo, kad ilgesnis ultragarso poveikio laikas lemia didesnes antocianinų koncentracijas [48].

Pagal gautuosius tyrimo rezultatus, lėmusius reikšmingas fenolinių junginių ir antocianinų koncentracijų pokyčius, taip pat ir antioksidacinį aktyvumą aviečių išspaudose, buvo parinkti optimalūs aviečių išspaudų ultragarsinio apdorojimo parametrai. Parinkti parametrai - 70 % intensyvumo ir 45 min trukmės ultragarsas, 120 % ir 30 min trukmės ultragarsas. Tolimesni tyrimai tęsti su parinktų parametru ultragarsu apdorotomis aviečių išspaudomis.

3.3. Simbiotinės mikroorganizmų kultūros metagenominis ištyrimas

Simbiotinė mikroorganizmų kultūra *Medusomyces gisevii* buvo iširta atliekant automatinę metagenominę analizę. Po DNR fragmentų sekoskaitos, buvo atliktas šių fragmentų surinkimas MEGAHIT programine įranga. Gautieji fragmentai, kurie buvo mažesni nei 500 bazių porų (bp), buvo pašalinti. Likusieji DNR fragmentai buvo naudojami tolimesnei analizei.

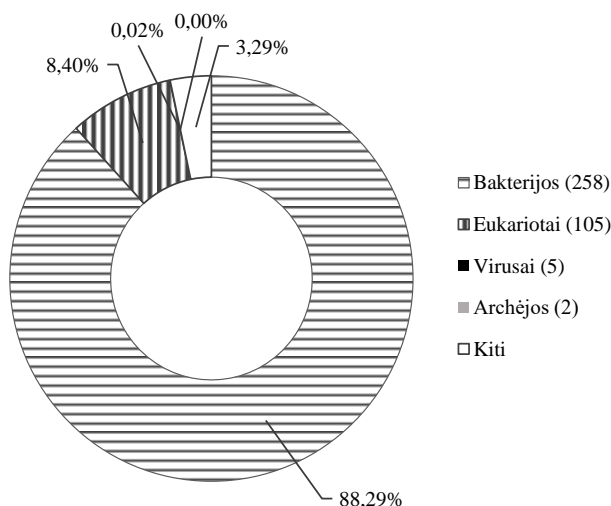
Tiriamųjų DNR fragmentų rezultatai pateikiami 3.4 lentelėje.

3.4 lentelė. *Medusomyces gisevii* kultūros DNR fragmentų informacija

Tiriamoji kultūra	Bendras bp ilgis	DNR fragmentų skaičius	Vidutinis ilgis (bp)	N50 ilgis (bp)	N90 ilgis (bp)	Maksimalus ilgis (bp)
<i>Medusomyces gisevii</i>	68 171 402	27 478	2 480,94	11 443	727	366 646

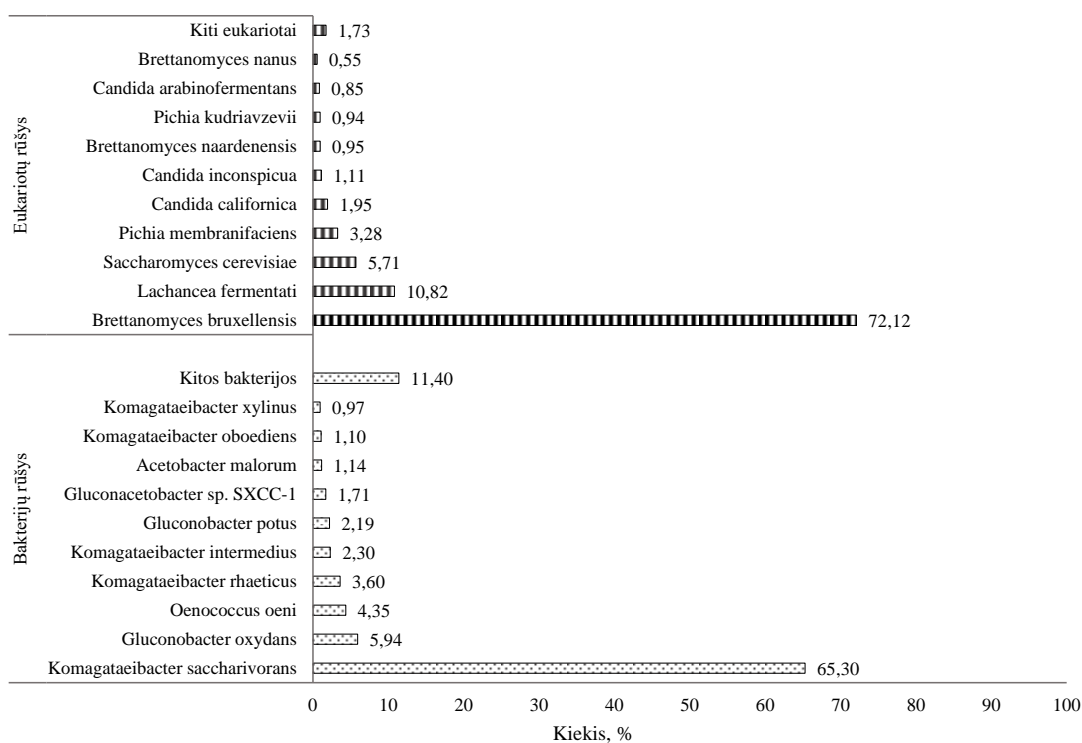
3.3.1. Mikroorganizmų bendrijos

Tyrimo metu buvo identifikuota 370 skirtingų mikroorganizmų, sudarančių *M. gisevii* simbiotinę mikroorganizmų kultūrą. Nustatyta, jog *M. gisevii* kultūrą sudaro 88,30 % bakterijų, 8,40 % eukariotų, 0,02 % virusų, 0,003 % archėjų. Likusius 3,29 % – neidentifikuotos genetinės sekos. Tyrimo rezultatai pateikiami 3.3 paveiksle.



3.3 pav. *M. gisevii* kultūrą sudarančios mikroorganizmų bendrijos

Tyrimo metu nustatyta, kad pagrindinės bakterijų gentys, sudarančios *M. gisevii* kultūrą, yra *Komagataeibacter*, *Gluconobacter*, *Oenococcus* ir *Acetobacter*. Taip pat nustatytos ir pagrindinės eukariotų gentys, kurios yra *Brettanomyces*, *Lachancea*, *Saccharomyces*, *Pichia* ir *Ogataea*. Esminės bakterijų bei mielių rūšys, nustatytos *M. gisevii* kultūroje, pavaizduotos 3.4 paveiksle.



3.4 pav. Esminės bakterijų ir grybų (mielių) rūšys, sudarančios *Medusomyces gisevii* kultūrą

Tyrimo metu nustatyta, kad didžioji dalis bakterijų, randamų simbiotinėje *M. gisevii* kultūroje, yra *Komagataeibacter saccharivorans*, kurios sudaro 65,30 % visų bakterijų. Šios bakterijos yra atsakingos už bakterinės celiuliozės sintezę, kuri sudaro *M. gisevii* biologinio darinio matricą [57]. Taip pat, *Komagataeibacter saccharivorans* konvertuoja įvairius cukrus į organines rūgštis. Ši bakterijų rūšis yra įprasta *M. gisevii* sudedamoji dalis [58].

Nustatyta, kad didžiausia dalis eukariotų, sudarančių simbiotinę kultūrą, yra *Brettanomyces bruxellensis*. Šios mielės sudaro 72,16 % visų eukariotų, randamų *M. gisevii* kultūroje. *Brettanomyces bruxellensis* mielės yra siejamos su fermentacijos procesais t.y. fermentuotų gėrimų gamyba [59]. Mokslinėje literatūroje nurodoma, jog anaerobinėmis sąlygomis šios mielės gamina etanolį, acto rūgštį bei acto rūgšties esterius [60].

Moksliniuose šaltiniuose nurodoma, kad *M. gisevii* kultūra gali būti labai įvairi. Šią kultūrą sudaro bakterijų gentys *Gluconacetobacterim* ir *Acetobacter*, taip pat bakterijų rūšys *Lactococcus*, *Lactobacillus* ir *Clostridium*. Simbiotinę mikroorganizmų kultūrą sudaro mielių gentys *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Torulopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida* ir kt. [17]. Tyrimo objekte buvo nustatyti minėtieji mikroorganizmai, tačiau nebuvo aptikta *Torulopsis* genties eukariotų.

H. Amarasinghe ir kt. tyrime (2017) nurodoma, kad simbiotinę kultūrą sudaro bakterijų gentys *Acetobacter*, *Acanthodica*, *Gluconacetobacter* bei mielių gentys *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia* [61]. Tyrimo metu, atlikus *M. gisevii* analizę, iš minėtųjų mikroorganizmų nebuvo aptikta *Acanthodica* genties bakterijų bei *Hanseniaspora* genties eukariotų.

M. gisevii metagenome identifikuoti penki virusai, iš kurių nustatyti du bakterijoms būdingi fagai - *Komagataeibacter* fagas phiKX1 ir Sozzivirus S11. Bakteriofagai yra virusai, kurie užkrečia ir dauginasi tik bakterijų ląstelėse. Kaip ir visi virusai, bakteriofagai yra specifiniai tam tikrai rūšiai ir paprastai užkrečia tik vieną bakterijų rūšį ar šios rūšies padermes. Užkrėtę šeimininko ląstelę, bakteriofagai replikuojasi bakterinėje ląstelėje, sutrikdydami normalią jos veiklą bei/arba sukeldami ląstelės mirtį [62].

Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad *Komagataeibacter* fagas phiKX1 yra būdingas *Komagataeibacter xylinus* bakterijoms [63], tuo tarpu Sozzivirus S11 virusas užkrečia *Oenococcus oeni* bakterijas [64]. Abi šios bakterijų rūšys identifikuotos ištirtoje *M.gisevii* kultūroje (žr. 3.4 pav.). *Komagataeibacter xylinus* sudarė 0,97 % visų *M. gisevii* mikroorganizmų, o *Oenococcus oeni* – 4,35 %.

Taip pat, identifikuoti trys augalų virusai (fitovirusai) – Persimono žiedinės DNR virusas (angl. *Persimmon circular DNA virus*), citrusinių vaisių chlorozės virusas (angl. *Citrus chlorotic dwarf associated virus*) ir kamelijų chlorozės virusas (angl. *Camellia chlorotic dwarf-associated*), kurie galėjo būti įnešti į *M. gisevii* biologinę struktūrą fermentacijos metu iš augalinių žaliavų.

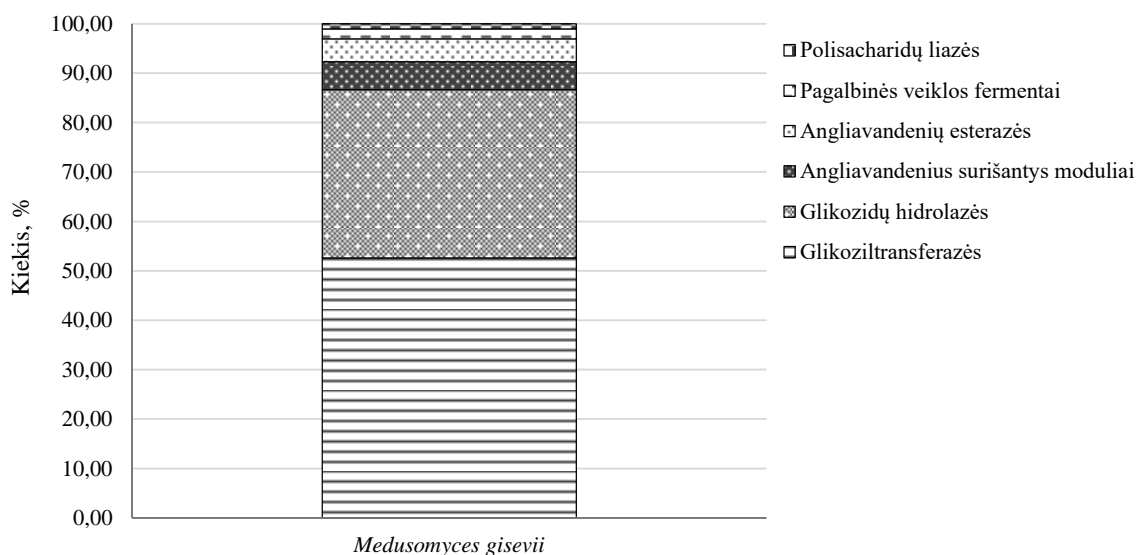
Taigi, *Medusomyces gisevii* simbiotinės mikroorganizmų kultūros kompozicija, naudota šiame tyrime, yra unikali ir skiriasi nuo kitų tyrimo objektų. Taip pat, moksliniuose šaltiniuose trūksta *M. gisevii* metagenominės analizės duomenų, ypač atliktą automatinės sekoskaitos metodu.

3.3.2. Angliavandenių aktyvumo fermentai

Angliavandenių aktyvumo fermentai (angl. *carbohydrate-active enzymes*) yra fermentai, dalyvaujantys sudėtingų angliavandenių, tokių kaip celiuliozės, hemiceliuliozės, chitino ir pektino, biosintezėje, degradacijoje ir modifikacijoje. Šie fermentai atlieka svarbias funkcijas įvairiuose biologiniuose procesuose, įskaitant mikroorganizmų metabolizmą, šeimininko–patogeno sąveikas, augalų ląstelių sienelių degradaciją [65].

Angliavandenių aktyvumo fermentų klasifikacijai, taip pat genominei, struktūrinei ir biocheminei informacijai talpinti, yra sukurta „CAZy“ duomenų bazė. Duomenų bazėje yra šešios pirmojo lygio funkcinės klasės: glikozido hidrolazės, glikoziltransferazės, polisacharidų liazės, angliavandenių esterazės, pagalbinės veiklos fermentai ir angliavandenių surišantys moduliai.

Tyrimo metu buvo identifikuoti genai, atsakingi už angliavandenių aktyvumo fermentų sintezę. Tyrimo rezultatai pavaizduoti 3.5 paveiksle.



3.5 pav. Genų, atsakingų už angliavandenių aktyvumo fermentų sintezę, pasiskirstymas

Nustatyta, kad genų, atsakingų už įvairių angliavandenių aktyvo fermentų sintezę, glikoziltransferazės sudaro 53,11 %, glikozidų hidrolazės – 33,67 %, angliavandenių surišantys moduliai – 5,59 %, angliavandenių esterazės – 4,59 %, pagalbinės veiklos fermentai – 2,03 %, polisacharidų liazės – 1,10 %. Mokslinėje literatūroje trūksta duomenų apie *M. gisevii* angliavandenių aktyvumo fermentų genus ir jų pasiskirstymą.

Glikoziltransferazės (EC 2.4.-) – tai fermentai, dalyvaujantys glikozidinių ryšių susidaryme t.y. disacharidų, oligosacharidų ir polisacharidų biosintezėje. Glikoziltransferazės itin svarbios ląstelės sienelės sintezėje, baltymų glikozilinimo reakcijose bei ekstraląstelių polisacharidų gamyboje [66]. Tyrimo metu nustatyta, kad šiuos fermentus koduojantys genai sudaro daugiau nei pusę (53,11 %) visų nustatytų angliavandenių aktyvumo fermentus koduojančių genų. Pagrindiniai glikoziltransferazių fermentai, nustatyti *M. gisevii* kultūroje, yra GT4 (15,84 %), GT2 (14,77 %), GT1 (3,56 %), GT51 (1,84 %) ir GT9 (1,30 %). Šios fermentų šeimos yra svarbios bakterinės celiuliozės, sudarančios *M. gisevii* struktūrą, sintezėje (GT2), bakterijų sienelės komponentų (pvz.

peptidoglikano) sintezėje (GT4), augalinių ląstelės sienelės komponentų modifikavime (GT1), glikoproteinų ir glikolipidų sintezėje (GT51, GT9) [67].

Glikosidų hidrolazės (EC 3.2.1.-) – tai fermentai, kurie katalizuoja glikozidinių jungčių skilimą angliavandeniuose bei jų glikokonjugatuose. Glikosidų hidrolazės genų yra beveik visuose gyvuose organizmuose. Mikroorganizmai naudoja glikosidų hidrolazės fermentus augalinių, eukariotinių (grybelių) ląstelės sienelių ardymui bei kitų anglies šaltinių skaidymui energijos tikslams. Pagrindiniai glikoziltransferazių fermentai, nustatyti *M. gisevii* kultūroje pagal juos koduojančius genus, yra GH23 (6,45 %), GH13 (2,96 %), GH28 (2,71 %), GH34 (1,82 %) ir GH5 (1,44 %). Fermentų šeima GH23 dalyvauja bakterinių ląstelių sienelių degradacijoje [68]. Šios šeimos pavyzdžiai yra fermentai lizocimas bei chitinazė. Fermentų šeima GH13 veikia alfa-glikozidines jungtis, dėl to yra itin svarbūs fermentacijos metu, katalizuojant sacharozės skilimo reakcijas į gliukozę bei fruktozę. Fermentų šeima GH28 dalyvauja glikozidinių jungčių pektinuose skaidymo reakcijose. Pektinas yra augalinės žaliavos ląstelių sienelių komponentas, dėl to fermentacijos procese naudojant tokias žaliavas kaip aviečių išspaudas, pektinazės padeda suskaldyti pektiną iki fermentuojamų cukrų. Fermentų šeima GH34 galaktozę turinčių sudėtingų angliavandenių skilimo reakcijas, o fermentų šeimai GH5 priklauso tokie fermentai kaip celiuliazės, kurie padeda ardyti celiuliozę bei hemiceliuliozę [67].

Angliavandenius surišantys moduliai – tai proteinai, randami angliavandenių aktyvumo fermentuose, tačiau patys nekatalizuoja cheminių reakcijų. Angliavandenius surišančių modulių paskirtis yra prisijungti substratą t.y. įvairius angliavandenius. Angliavandenius surišantys moduliai dažnai randami tokiuose fermentuose, kaip amilazės ir celiuliazės [69].

Polisacharidų liazės (EC 4.2.2.-) – fermentų šeima, dalyvaujanti polisacharidų, turinčių urono rūgštį, depolimerizacijos procesuose. Būdinga įvairiems mikroorganizmams – eukariotams, bakterijoms ir bakteriofagams. Dalyvauja sudėtingų polisacharidų skaidymo procesuose, pavyzdžiui, augalinių ląstelių ardymo procesuose, susidarant nesotiesiems junginiams [70].

Angliavandenių esterazės (EC 3.1.1.-) – fermentų šeima, kuri dalyvauja esterinių jungčių, esančių angliavandeniuose ir jų junginiuose, hidrolizės reakcijose. Ši fermentų šeima prisideda prie sudėtingų angliavandenių degradacijos reakcijų bei didina paprastųjų cukrų prieinamumą mikroorganizmams fermentacijos metu [71].

Pagalbinės veiklos fermentai (EC 1.14.99.-) – tai neseniai atrasti bei pastaruoju metu itin tyrinėjami fermentai, savo aktyvumo centre turintys vario jonų. Šie fermentai identifikuoti keletoje natūralių ir rekombinantinių grybų. Pagalbinės veiklos fermentai dalyvauja biopolimerų, tokių kaip krakmolas, celiuliozė, hemiceliuliozė ir chitinas, depolimerizacijos procesuose [72].

3.3.3. Atsparumo antibiotikams genai

Daugelis bakterijų turi gebėjimą toleruoti antibiotikus kaip atsaką į besikeičiančias aplinkos sąlygas. Šis atsparumas gali kilti dėl natūralių genetinių pokyčių bakterijų genomuose arba dėl svetimų DNR įterpimo [73]. Tiriant *M. gisevii* kultūrą buvo nustatyti du genai, lemiantys bakterijų atsparumą prieš tam tikrus antibiotikus – *qacG* genas bei *vanY* genas, esantis *vanB* klasteryje.

Bakterijos, turinčios *qacG* geną, yra atsparios ketvirtiniams amonio junginiams, kurie naudojami kaip dezinfekavimo priemonės bei antiseptikai įvairiose pramonės srityse. Atsparumas antiseptikams ir

dezinfekavimo priemonėms, kurios yra sudarytos iš ketvirtinių amonio junginių, yra plačiai paplitusi tarp stafilokokų, randamų klinikose bei tam tikrose maisto pramonės srityse, pavyzdžiui – *Staphylococcus aureus*. [74]. Bakterijos, esančios *M. gisevii* kultūroje, kuriose aptikti atsparumo antibiotikams genai, pateikiami 3.5 lentelėje.

3.5 lentelė. *Medusomyces gisevii* kultūroje nustatytų bakterijų atsparumas antibiotikams

Genas, atsakingas už atsparumą antibiotikams	Antibiotiko pavadinimas	Būdingos bakterijų rūšys	Paplitimas <i>M.gisevii</i> kultūroje, %
qacG	Ketvirtiniai amonio junginiai	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0046
vanY (vanB klasteryje)	Vankomicinas	<i>Bacillus subtilis</i>	0,0004
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,0010
		<i>Enterococcus faecalis</i>	0,0019
		<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0046

Vankomicinas yra glikopeptidinis antibiotikas, slopinantis peptidoglikanų sintezę bakterijose ir naudojamas sunkioms infekcijoms gydyti, kurias sukelia gram teigiamos bakterijos – *Enterococcus* rūšys, *Staphylococcus aureus* ir *Clostridium difficile*. Atsparumas vankomicinui pagrinde yra paplitęs tarp enetrokokų rūšių, tokių kaip *Enterococcus faecalis* ir *Enterococcus faecium* [75].

Tyrimo metu nustatytos šios bakterijų rūšys, pasižyminčios atsparumu vankomicinui – *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* ir *Staphylococcus aureus* [76, 77].

Nustatytų bakterijų, atsparių antibiotikams, kiekiai ištirtame metagenome nėra esminiai (žr. 3.5 lentelę) ir galimai atsiradę dėl taršos augalinėje žaliavoje, fermentacijos metu ar ruošiant DNR mėginių tyrimams. Tyrimo metu identifikuoti *M. gisevii* būdingieji (pagrindiniai) mikroorganizmai (žr. 3.3.1 skyrelį) neturėjo atsparumo antibiotikams genų.

3.4. Gėrimų mėginių pirminės ir antrinės fermentacijos tyrimai

Gėrimų mėginių pirminės ir antrinės fermentacijos tyrimai buvo atlikti naudojant simbiotinę mikroorganizmų kultūrą *M. gisevii* kartu su aviečių išspaudomis bei PRB – *L. plantarum* ir *L. reuteri*.

3.4.1. *Medusomyces gisevii* mikrobiologiniai rodikliai

Prieš fermentacijos tyrimus, buvo atlikta *M. gisevii* mikrobiologinė analizė, nustatant aerobinių mikroorganizmų, mielių, mezofilinių PRB, pelėsinų grybų, koliforminių bakterijų ir *E. coli* bakterijų skaičių. Mikroorganizmų skaičiai, išreikšti log KSV/g, pateikti 3.6 lentelėje.

3.6 lentelė. *Medusomyces gisevii* mikrobiologiniai rodikliai

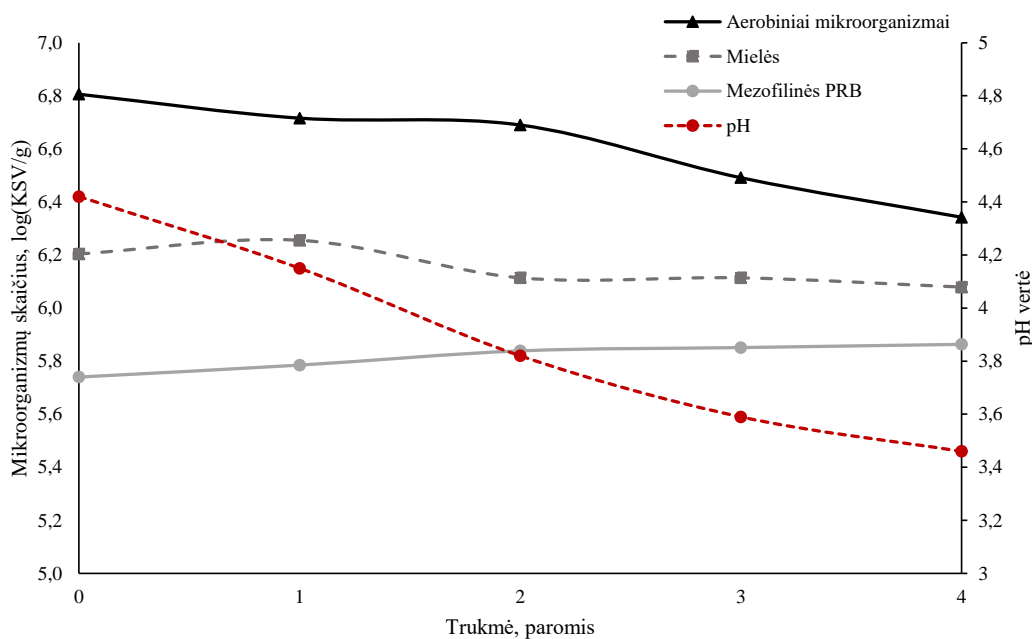
Mėginio pavadinimas	Mikrobiologiniai rodikliai, log KSV/g						pH vertė
	Aerobiniai mikroorganizmai	Mielės	Mezofilinės PRB	Pelėsiai grybai	Koliforminės bakterijos	<i>E. coli</i>	
<i>M. gisevii</i>	6,38 ± 0,11	6,77 ± 0,09	6,61 ± 0,13	< 1	< 1	< 1	2,53 ± 0,06

Nustatyta, kad *M. gisevii* kultūroje aerobinių mikroorganizmų skaičius siekė $6,38 \pm 0,11$ log KSV/g, mielių – $6,77 \pm 0,09$ log KSV/g, mezofilinių PRB – $6,61 \pm 0,13$ log KSV/g. Simbiotinės mikroorganizmų kultūros pH vertė buvo vidutinio rūgštingumo ir siekė $2,53 \pm 0,06$. Mikroorganizmų, nusakančių meginių mikrobiologinę saugą ir gamybos aplinkos sanitariją (pelėsiniai grybai, koliforminės bakterijos ir *E. coli* bakterijos) kiekiai nustatyti mažesni nei 1 KSV/g, dėl to *M. gisevii* kultūra buvo tinkama naudoti fermentacijos tyrimams.

3.4.2. Pirminės fermentacijos tyrimai

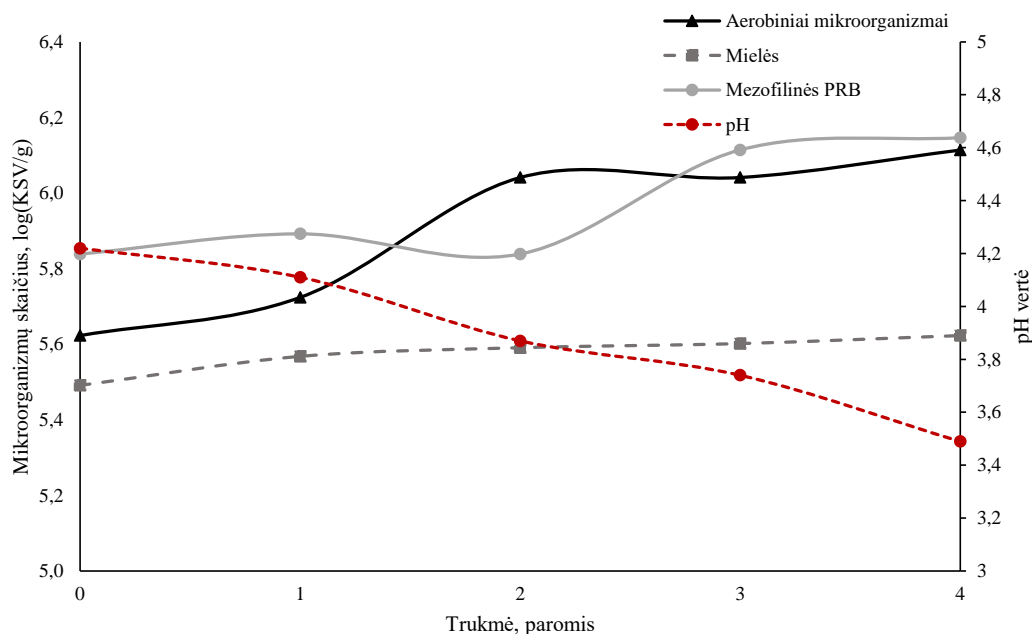
Pirminė fermentacija su *M. gisevii* vykdyta trimis pakartojimais, kol buvo pasiektas biologinės struktūros veikimo mechanizmo stabilumas.

Pirmojo tyrimo metu (3.6 pav.) nustatytas didelis aerobinių mikroorganizmų skaičius, kuris fermentacijos metu mažėjo – nuo $6,81 \pm 0,05$ iki $6,34 \pm 0,08$ log KSV/g. Taip pat, nustatyti dideli mielių skaičiai, kurie fermentacijos eigoje mažėjo – nuo $6,20 \pm 0,07$ iki $6,08 \pm 0,04$ log KSV/g. Mezofilinių PRB skaičius tolygiai didėjo keturių parų fermentacijos laikotarpyje, nuo $5,74 \pm 0,05$ iki $5,86 \pm 0,07$ log KSV/g. Terpės pH vertė kito rūgštėjimo kryptimi nuo 4,42 (0 parų) iki 3,46 (4 paros). Pelėsių, koliforminių bakterijų ir *E. coli* bakterijų skaičius nustatytas mažesnis nei 1 KSV/g.



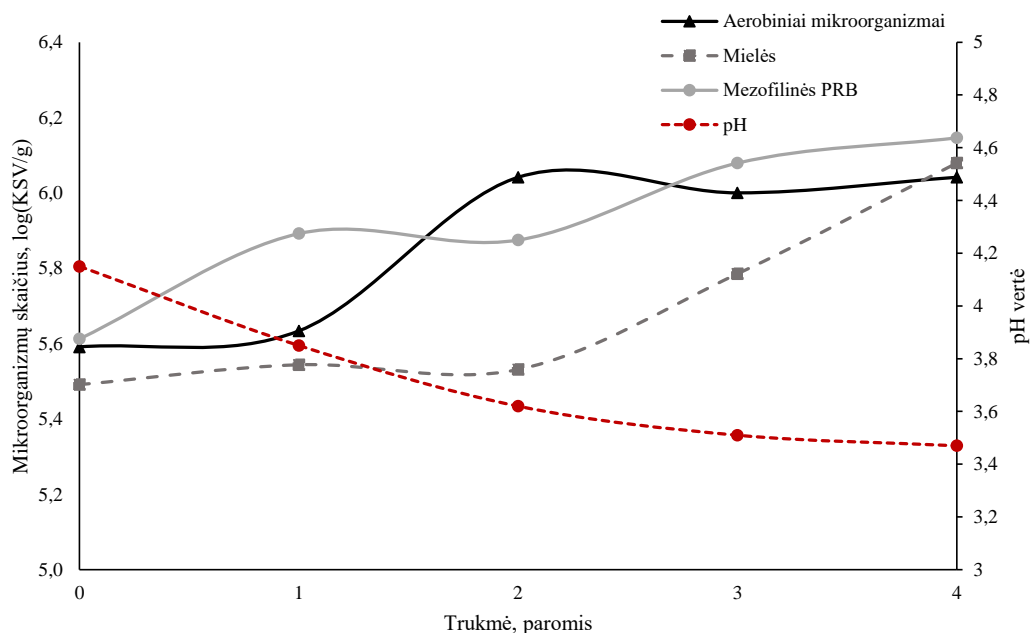
3.6 pav. Pirminės fermentacijos tyrimas Nr. 1

Antrojo tyrimo metu (3.7 pav.) nustatyta, kad aerobinių mikroorganizmų, mielių ir PRB skaičius tolygiai didėjo keturių fermentacijos parų laikotarpyje. Aerobinių mikroorganizmų skaičius kito ribose nuo $5,62 \pm 0,02$ iki $6,11 \pm 0,04$ log KSV/g, mielių – nuo $5,49 \pm 0,05$ iki $5,62 \pm 0,07$ log KSV/g, mezofilinių PRB – nuo $5,84 \pm 0,07$ iki $6,15 \pm 0,05$ log KSV/g. Terpės pH vertė kito nuo $4,22 \pm 0,03$ (0 parų) iki $3,49 \pm 0,04$ (4 paros). Pelėsių, koliforminių bakterijų ir *E. coli* bakterijų skaičius nustatytas mažesnis nei 1 KSV/g.



3.7 pav. Pirminės fermentacijos tyrimas Nr. 2

Trečiojo tyrimo metu (3.8 pav.) nustatyta, kad aerobinių mikroorganizmų, mielių ir mezofilinių PRB skaičius tolygiai didėjo visas keturias fermentavimo paras. Aerobinių mikroorganizmų skaičius fermentacijos metu kito nuo $5,59 \pm 0,05$ iki $6,04 \pm 0,04$ log KSV/g, mielių – nuo $5,49 \pm 0,03$ iki $6,08 \pm 0,02$ log KSV/g, o mezofilinių PRB – nuo $5,61 \pm 0,06$ iki $6,15 \pm 0,04$ log KSV/g. Terpės pH vertė kito nuo $4,15 \pm 0,04$ iki $3,47 \pm 0,03$ rūgštėjimo kryptimi. Nustatytas pelėsių, koliforminių bakterijų ir *E. coli* bakterijų skaičius buvo mažesnis nei 1 KSV/g.



3.8 pav. Pirminės fermentacijos tyrimas Nr. 3

Pagal tyrimo rezultatus daryta išvada, kad trečiojo fermentacijos tyrimo metu *M. gisevii* įgavo fermentacinės veiklos stabilumą t.y. tolygų veikliųjų mikroorganizmų skaičiaus didėjimą visą 4 parų fermentacijos laikotarpį. Kitame tyrimo etape, buvo atliekami antrinės fermentacijos tyrimai.

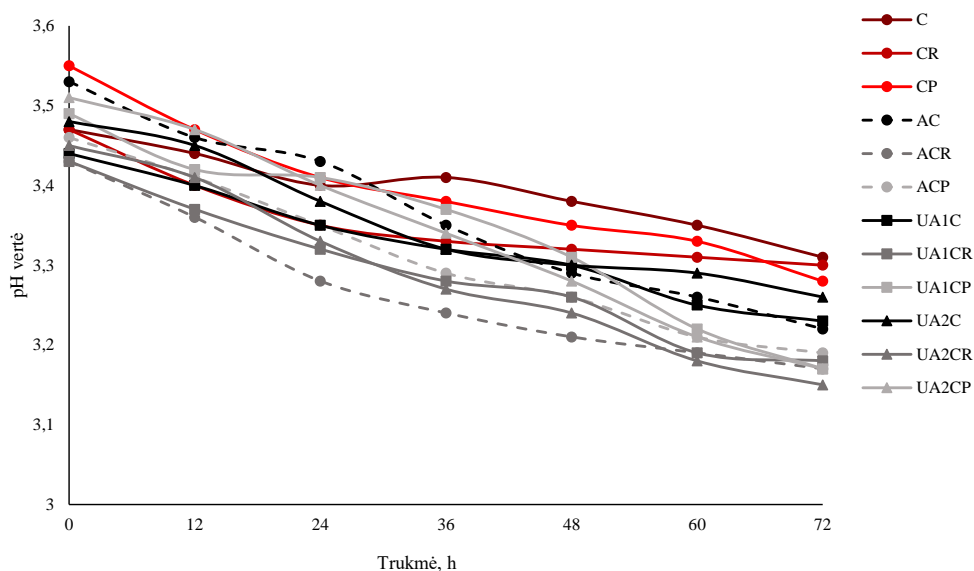
3.4.3. Antrinės fermentacijos tyrimai

Fermentuotų gėrimų mėginių paruošimui buvo panaudotos ultragarsu neapdorotos ir apdorotos aviečių išspaudos. Kontroliniai mėginiai (C, CR, CP) buvo ruošti be aviečių išspaudų priedo. AC, ACR ir ACP ruošti su ultragarsu neapdorotomis aviečių išspaudomis. Mėginiai UA1C, UA1CR ir UA1CP ruošti su ultragarsu apdorotomis aviečių išspaudomis (70%, 45 min). Mėginiai UA2C, UA2CR ir UA2CP ruošti su ultragrasu apdorotomis aviečių išspaudomis (120%, 30 min).

Mėginiai CR, ACR, UA1CR ir UA2CR ruošti su PRB priedu – *L. reuteri*, o mėginiai CP, ACP, UA1CP ir UA2CP ruošti su *L. plantarum* priedu (žr. 2.4.10 skyrių).

Po pirminės fermentacijos, gautasis C tirpalas (žr. 2.4.10 skyrių) naudotas antrinės fermentacijos tyrimams su aviečių išspaudomis ir biologiniu PRB priedu. Antrinė fermentacija vykdyta 3 paras, kas 12 val. nustatant terpės pH vertę. Tyrimo rezultatai pateikti 3.9 paveiksle.

Tyrimo rezultatai rodo, kad antrinės fermentacijos metu mėginių pH vertės mažėjo, laikotarpyje nuo 0 iki 72 val (žr. 3.9 pav.). Didžiausiu pH pasižymėjo kontroliniai mėginiai C, CR ir CP, o mažiausiu pH pasižymėjo mėginiai su aviečių išspaudomis, kurių gamyboje buvo panaudotos PRB (ACR, ACP, UA1CR, UA2CR ir UA2CP). Fermentacijos su PRB metu, šios bakterijos išskiria organines rūgštis, kurios lemia terpės pH vertės mažėjimą. Tai matyti pagal tyrimo rezultatus – mėginiai su pridėtinėmis PRB, pasižymėjo žemesne pH verte už mėginius, kurių gamyboje nebuvo panaudotos pridėtinės PRB (AC, UA1C, UA2C).



3.9 pav. Antrinės fermentacijos pH vertės pokytis nuo 0 iki 72 val.

Vykdydant antrinę mėginių fermentaciją, buvo įvertintas veikliųjų mikroorganizmų (aerobinių mikroorganizmų, mielių ir mezofilinių PRB) ir žalingų mikroorganizmų (koliforminių bakterijų, *E.coli* bakterijų) skaičius. Tyrimo rezultatai pateikti 3.7 lentelėje.

3.7 lentelė. Fermentuotų gėrimų mėginių mikrobiologiniai rodikliai antrinės fermentacijos metu

Mėginio Nr.	Trukmė, paromis	Mikrobiologiniai rodikliai, log(KSV/g)					
		Aerobiniai mikroorganizmai	Mielės	Mezofilinės PRB	Pelėsiai grybai	Koliforminės bakterijos	<i>E. coli</i>
C	0	6,08 ± 0,02	6,11 ± 0,05	6,16 ± 0,03	<1	<1	<1
CR		6,11 ± 0,05	6,08 ± 0,05	6,50 ± 0,04	<1	<1	<1
CP		6,10 ± 0,02	6,09 ± 0,03	6,52 ± 0,05	<1	<1	<1
AC		6,10 ± 0,05	6,10 ± 0,04	6,15 ± 0,03	<1	<1	<1
ACR		6,09 ± 0,05	6,08 ± 0,02	6,49 ± 0,05	<1	<1	<1
ACP		6,08 ± 0,06	6,08 ± 0,05	6,53 ± 0,03	<1	<1	<1
UA1C		6,10 ± 0,04	6,12 ± 0,06	6,16 ± 0,05	<1	<1	<1
UA1CR		6,11 ± 0,05	6,10 ± 0,05	6,50 ± 0,05	<1	<1	<1
UA1CP		6,11 ± 0,06	6,09 ± 0,02	6,51 ± 0,02	<1	<1	<1
UA2C		6,12 ± 0,05	6,11 ± 0,05	6,17 ± 0,02	<1	<1	<1
UA2CR		6,09 ± 0,04	6,12 ± 0,05	6,53 ± 0,06	<1	<1	<1
UA2CP		6,09 ± 0,05	6,10 ± 0,02	6,52 ± 0,03	<1	<1	<1
C	3	6,38 ± 0,03	6,16 ± 0,05	6,27 ± 0,05	<1	<1	<1
CR		6,61 ± 0,03	6,46 ± 0,03	7,63 ± 0,04	<1	<1	<1
CP		6,48 ± 0,05	6,44 ± 0,02	8,35 ± 0,05	<1	<1	<1
AC		5,91 ± 0,04	7,06 ± 0,05	8,03 ± 0,02	<1	<1	<1
ACR		6,11 ± 0,02	7,10 ± 0,05	8,21 ± 0,05	<1	<1	<1
ACP		6,30 ± 0,05	7,09 ± 0,05	8,29 ± 0,06	<1	<1	<1
UA1C		6,32 ± 0,05	7,23 ± 0,04	8,26 ± 0,07	<1	<1	<1
UA1CR		5,89 ± 0,05	7,27 ± 0,03	8,24 ± 0,05	<1	<1	<1
UA1CP		6,26 ± 0,06	7,38 ± 0,05	8,48 ± 0,02	<1	<1	<1
UA2C		6,15 ± 0,05	7,11 ± 0,04	8,20 ± 0,04	<1	<1	<1
UA2CR		6,28 ± 0,02	7,23 ± 0,02	8,26 ± 0,04	<1	<1	<1
UA2CP		6,34 ± 0,04	7,23 ± 0,05	8,41 ± 0,03	<1	<1	<1

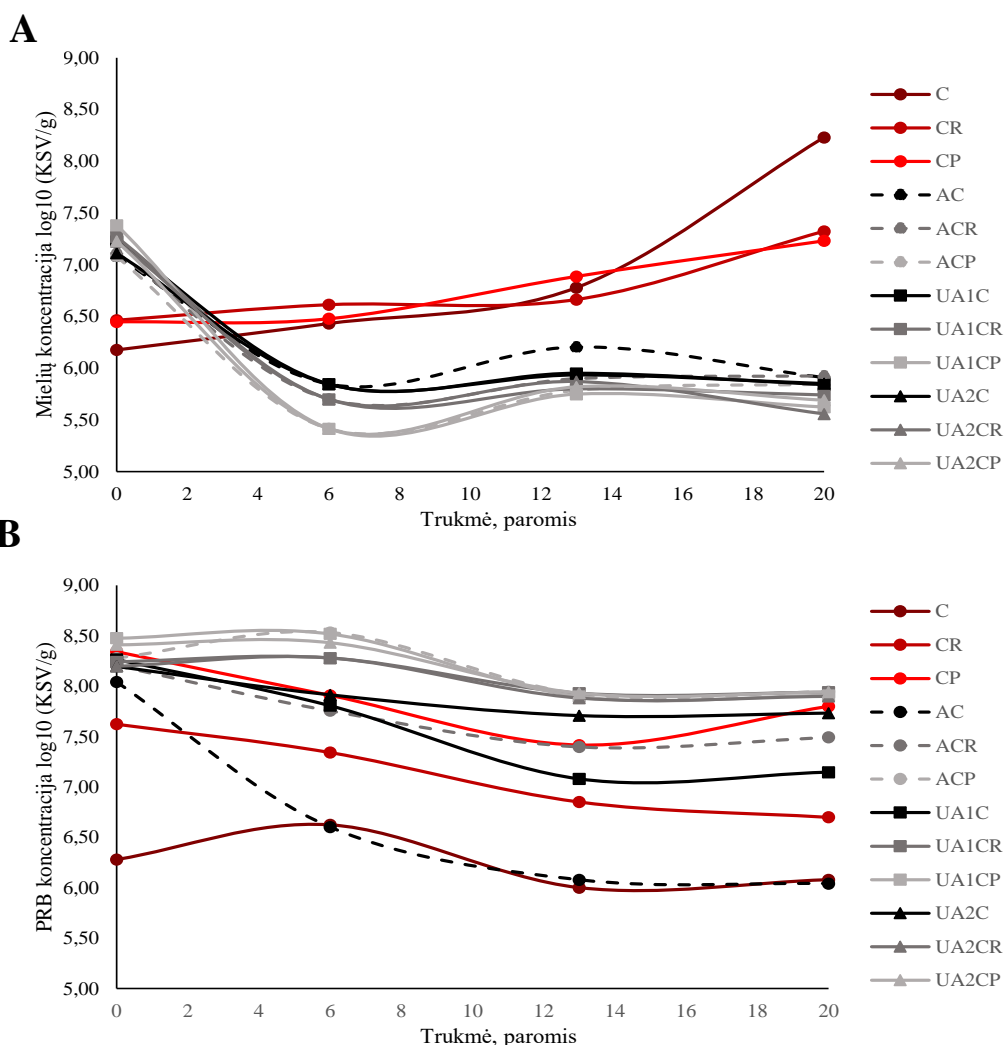
Mėginiai, kurių ruošime panaudotos aviečių išspaudos, po trijų parų antrinės fermentacijos pasižymėjo mažesnėmis aerobinių mikroorganizmų koncentracijomis, lyginant su kontroliniais mėginiais C, CR ir CP. Taip pat, mėginiuose su aviečių išspaudomis, nustatytos didesnės mielių ir mezofilinių PRB koncentracijos.

Tyrimo metu nustatyta, kad mėginiai, kurių ruošime buvo panaudotos aviečių išspaudos, vidutiniškai pasižymėjo didesne PRB koncentracija nei kontroliniai mėginiai. Mėginiuose AC, ACR ir ACP, nustatytos atitinkamai $8,03 \pm 0,02$, $8,21 \pm 0,05$ ir $8,29 \pm 0,06$ log KSV/g PRB koncentracijos. Mėginiuose UA1C, UA1CR ir UA1CP, atitinkamai nustatytos $8,26 \pm 0,07$, $8,24 \pm 0,05$ ir $8,48 \pm 0,02$ log KSV/g PRB koncentracijos. Mėginiuose UA2C, UA2CR ir UA2CP, atitinkamai nustatytos $8,20 \pm 0,04$, $8,26 \pm 0,04$ ir $8,41 \pm 0,03$ log KSV/g PRB koncentracijos.

G. Juodeikienė ir kt. (2021) tyrime nurodoma, kad fermentuojant ultragarsu paveiktą augalinę žaliavą, susidaro didesnis PRB biomasės kiekis nei fermentuojant ultragarsu neapdorotą žaliavą. Tai galima paaiškinti tuo, kad augalinėje žaliavoje esančios skaidulinės medžiagos, priklausomai nuo ultragarso galios ir intensyvumo, tampa tirpios vandenyje. Manoma, kad ultragarso apdorojimo parametrų parinkimas gali pakeisti žaliavos funkcines savybes, o tai gali turėti įtakos PRB fermentacijos proceso intensyvumui [78]. Tyrimo metu pastebėti PRB skirtumai tarp tiriamųjų mėginių nebuvo reikšmingi, dėl to nebuvo nustatytas sąryšis tarp ultragarsinio aviečių išspaudų apdorojimo ir PRB koncentracijų.

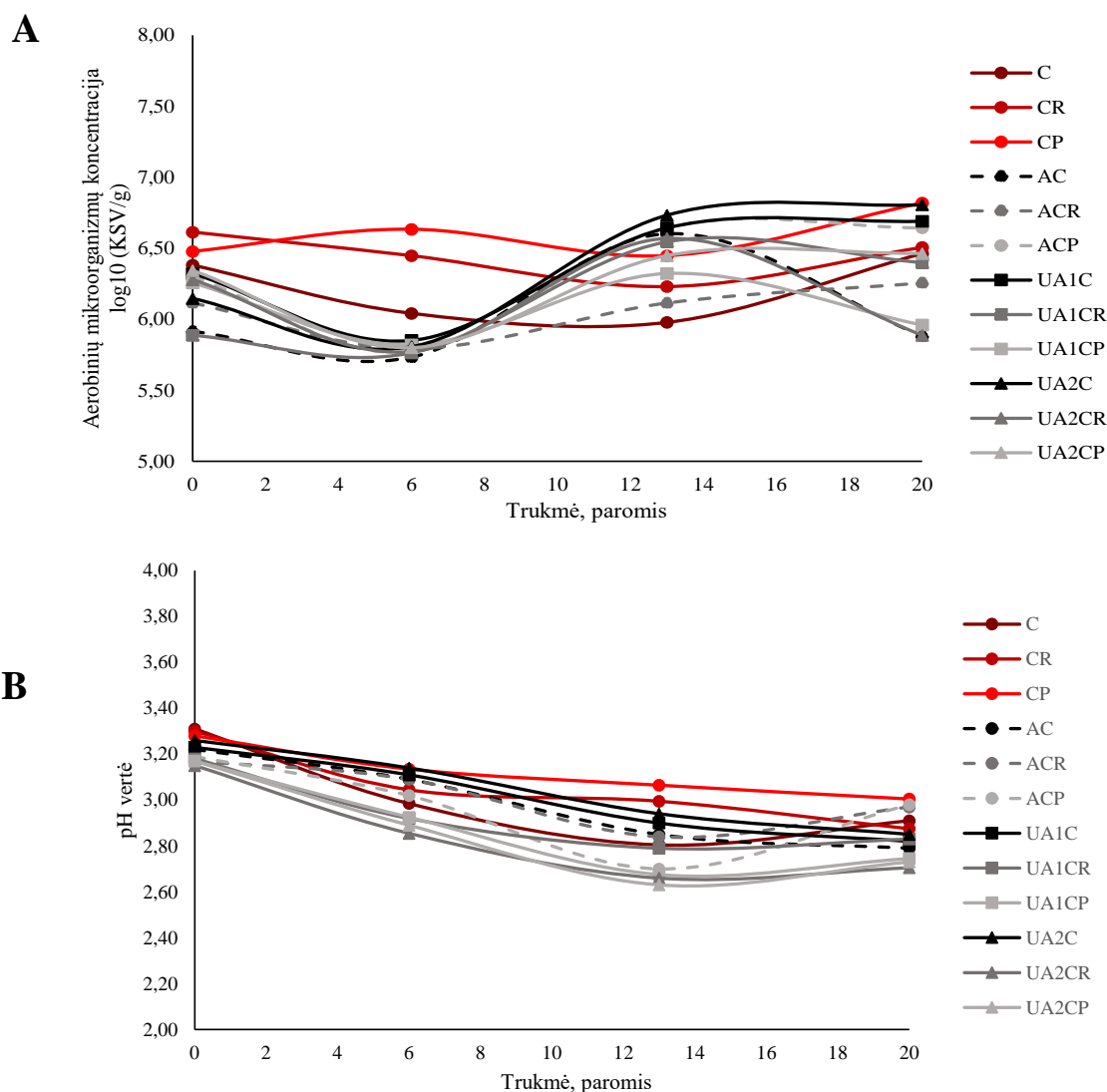
3.5. Fermentuotų gėrimų mėginių mikrobiologinio stabilumo tyrimai

Siekiant įvertinti aviečių išspaudų (apdorotų ir neapdorotų ultragarsu) bei PRB priedo įtaką fermentuotų gėrimų mėginių mikrobiologiniam stabilumui 20 parų laikotarpyje, buvo atliekama mėginių mikrobiologinė analizė keturiuose taškuose – po 0, 6, 13 ir 20 d. po mėginio paruošimo. Mielių bei mezofilinių PRB skaičiaus kitimas mėginiuose per 20 parų laikotarpį pateiktas 3.10 paveiksle.



3.10 pav. Mielių skaičiaus (A dalis) ir mezofilinių pieno rūgšties bakterijų (PRB) skaičiaus (B dalis) kitimas laike nuo 0 iki 20 parų

Aerobinių mikroorganizmų skaičiaus bei pH vertės kitimas mėginiuose per 20 parų laikotarpį pateiktas 3.11 paveiksle.



3.11 pav. Aerobinių mikroorganizmų skaičiaus (A dalis) ir pH vertės (B dalis) kitimas laike nuo 0 iki 20 parų

Po 6 laikymo parų pastebėta, kad kontroliniuose mėginiuose (C, CR, CP), kuriuose nebuvo aviečių išspaudų, mielių skaičius tolygiai augo. Nustatyta, kad aviečių išspaudos slopino mielių vystymąsi (3.10 pav. A) bei skatino PRB augimą (3.10 pav. B). Taip pat, mažino aerobinių mikroorganizmų skaičių (3.11 pav. A).

Po 13 laikymo parų pastebėta, kad mielių skaičius kontroliniuose (C, CR, CP) mėginiuose toliau tolygiai augo (3.10 pav. A), o PRB gyvybingumas nežymiai mažėjo (3.10 pav. B). Mėginiuose su aviečių išspaudomis, bendras PRB skaičius taip pat mažėjo. Mėginiuose su aviečių išspaudomis, bendras aerobinių mikroorganizmų skaičius augo (3.11 pav. A), o PRB – mažėjo (3.10 pav. B).

Po 20 laikymo parų aviečių išspaudos stabilizavo gedimo intensyvumą, mielių skaičius išliko didelis (3.10 pav. A), tačiau PRB išliko panašiam lygyje kaip ir po 13 dienų. Tokiu būdu susidarė

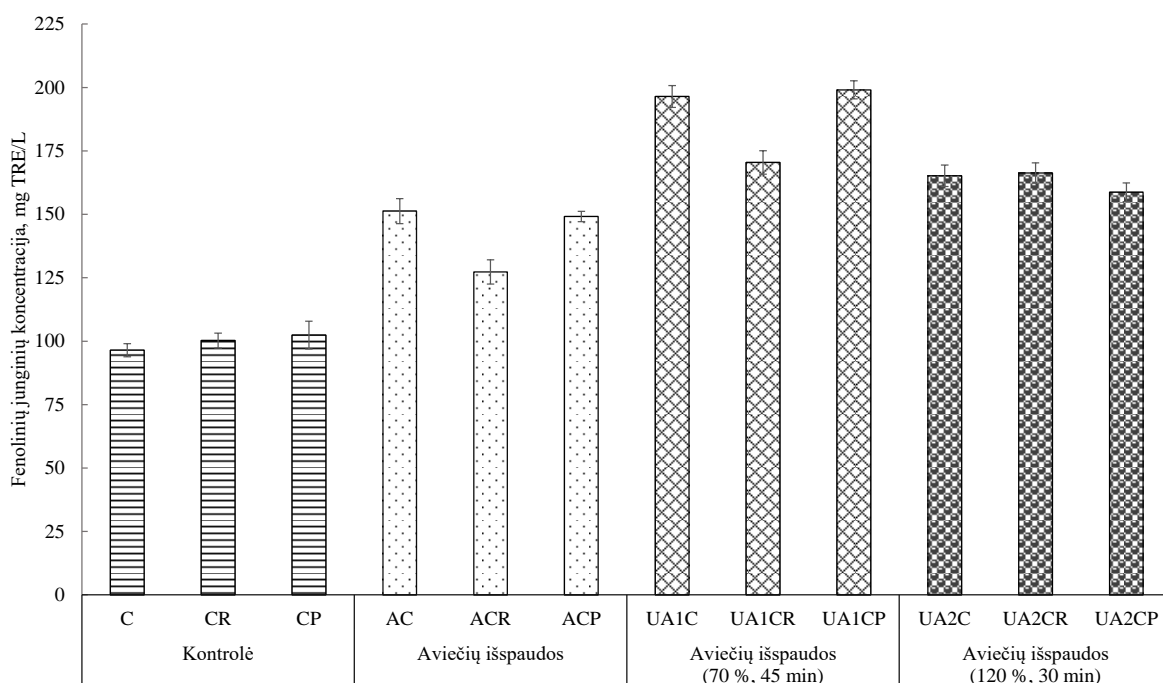
atitinkamas santykis tarp mikroorganizmų skaičiaus ir tai lemia matricos su aviečių išspaudomis kokybę t.y. tinkamumą naudoti.

3.6. Fermentuoto gėrimo biologiškai aktyvių junginių sudėtis

Paruošti fermentuoti gėrimų mėginiai buvo išanalizuoti siekiant nustatyti fenolinių junginių koncentracijos, antocianinų koncentracijos ir antioksidacinio aktyvumo vertes po antrinės mėginių fermentacijos etapo. Šiame tyrimo etape buvo įvertinta aviečių išspaudų ultragarsinio apdorojimo įtaka fermentuotų mėginių funkcionalumui.

3.6.1. Biogėrimų bendroji fenolinių junginių koncentracija

Siekiant įvertinti aviečių išspaudų ultragarsinio apdorojimo įtaką fenolinių junginių koncentracijoms fermentuotuose gėrimuose, buvo atliktas fenolinių junginių nustatymas Folino-Kiokalto metodu. Tyrimo rezultatai pateikti 3.12 paveiksle.



3.12 pav. Fenolinių junginių koncentracijos fermentuotų gėrimų mėginiuose, išreikšta mg tanino rūgšties ekvivalentu (TRE)/L

Mažiausios fenolinių junginių koncentracijos buvo nustatytos kontroliniuose mėginiuose (C, CR, CP), kurių gamyboje nebuvo panaudotos aviečių išspaudos. Kontroliniuose mėginiuose C, CR ir CP, atitinkamai nustatytos $96,47 \pm 2,59$, $100,27 \pm 2,94$ ir $102,41 \pm 5,49$ mg TRE/L fenolinių junginių koncentracijos.

Rezultatai rodo, kad ultragarsu paveiktos aviečių išspaudos lemia didesnes fenolinių junginių koncentracijas fermentuotuose gėrimuose, lyginant su ultragarsu neapdorotomis aviečių išspaudomis. Nustatyta, kad didžiausios fenolinių junginių koncentracijos buvo mėginiuose, kurių ruošime panaudotos 70 % intensyvumo ir 45 min ultragarsu paveiktos aviečių išspaudos – UA1C, UA1CR ir UA1CP. Šiuose mėginiuose, atitinkamai, nustatyta $196,44 \pm 4,30$, $170,46 \pm 4,60$ bei $199,07 \pm 3,58$ mg TRE/L. Vidutiniškai, šie mėginiai pasižymėjo 32,34 % didesne fenolinių junginių koncentracija, lyginant su mėginiais, kurių gamyboje buvo naudotos ultragarsu neapdorotos aviečių išspaudos (AC,

ACR, ACP). Mėginiuose AC, ACR bei ACP, nustatytos atitinkamai $151,23 \pm 4,93$, $127,28 \pm 4,76$ bei $149,15 \pm 2,02$ mg TRE/L fenolinių junginių koncentracijos.

Mėginiuose UA2C, UA2CR ir UA2CP, kurių gamybai naudoti 120 % intensyvumo ir 30 min trukmės ultragarsu apdorotos aviečių išspaudos, nustatytos atitinkamai $165,20 \pm 4,24$, $166,30 \pm 4,03$ bei $158,70 \pm 3,71$ mg RE/L fenolinių junginių koncentracijos. Vidutiniškai, šie mėginiai pasižymėjo 14,62 % didesne fenolinių junginių koncentracija, lyginant su UG neapdorotomis aviečių išspaudomis (AC, ACR, ACP).

D. Morales ir kt. (2023) tyrime nurodoma, kad fermentuoti žaliosios arbatos gėrimai su *M.gisevii*, pasižymi fenolinių junginių koncentracija nuo $44,2 \pm 0,3$ mg/L iki $164,7 \pm 4,1$ mg/L, priklausomai nuo gamyboje naudotų vaisių ar uogų [79]. Kitame tyrime, atliktame K. Jakubczyk ir kt. (2020) nurodoma, kad žaliosios arbatos fermentuotų gėrimų fenolinių junginių kiekis siekia $299,6 \pm 3,1$ mg/L [80]. Taigi, fenolinių junginių koncentracija fermentuotuose gėrimuose priklauso nuo to, kokios žaliavos buvo naudotos jų gamyboje. Šiuo atveju, naudojant tą pačią žaliavą (aviečių išspaudas), tačiau jas apdorojus ultragarsu, galima pasiekti didesnes fenolinių junginių koncentracijas mėginiuose.

3.6.2. Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

Tyrimo metu buvo ištirta ultragarsinio aviečių išspaudų apdoravimo įtaką fermentuotų gėrimų mėginių antioksidaciniam aktyvumui. Tyrimo rezultatai pateikiami 3.8 lentelėje.

3.8 lentelė. Fermentuotų gėrimų mėginių antioksidacinis aktyvumas, išreikštas trolokso ekvivalentu (TE) mg/L

Mėginio pavadinimas	Antioksidacinis aktyvumas, mg TE/L	Ultragarsinio apdoravimo intensyvumas, %	Ultragarsinio apdoravimo laikas, min
C	$0,22 \pm 0,01$	-	-
CR	$0,22 \pm 0,00$		
CP	$0,22 \pm 0,00$		
AC	$0,22 \pm 0,01$		
ACR	$0,22 \pm 0,01$		
ACP	$0,22 \pm 0,00$		
UA1C	$0,23 \pm 0,00$	70	45
UA1CR	$0,23 \pm 0,01$		
UA1CP	$0,23 \pm 0,01$		
UA2C	$0,24 \pm 0,01$	120	30
UA2CR	$0,24 \pm 0,01$		
UA2CP	$0,23 \pm 0,01$		

Gautieji rezultatai rodo, jog didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo mėginiai, kurių fermentacijos procesuose buvo panaudotos ultragarsu apdorotos aviečių išspaudos. Vidutiniškai, ultragarsu apdorotų aviečių išspaudų mėginiai lėmė 4,91 % didesnę antioksidacinį aktyvumą, lyginant su neapdorotomis aviečių išspaudomis.

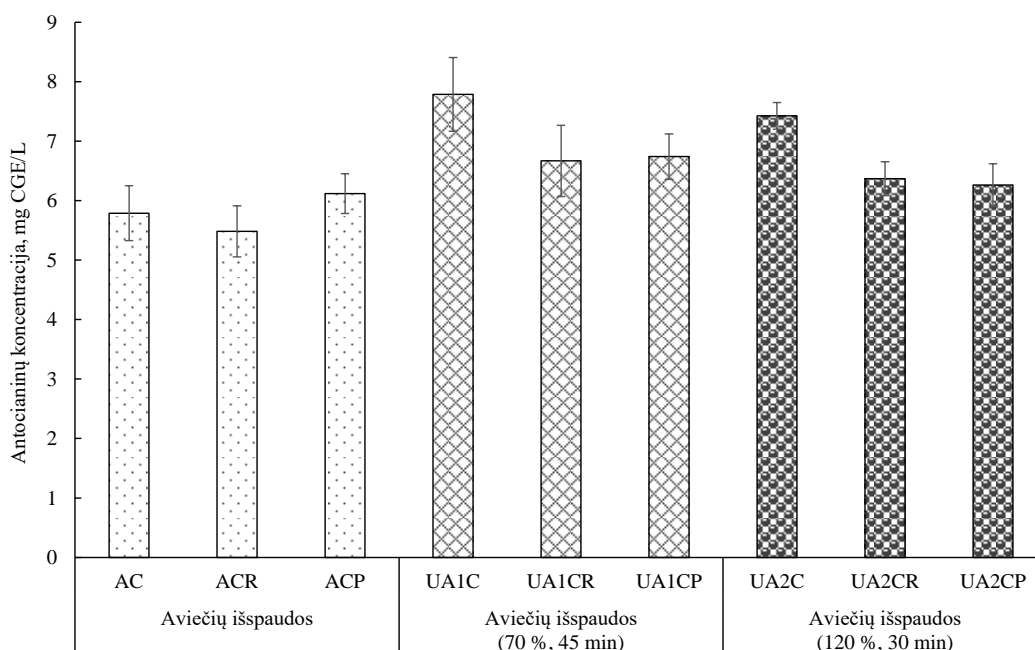
Mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo kontroliniai mėginiai C, CR ir CP, kurių gamybos procese nebuvo panaudotos aviečių išspaudos. Šie mėginiai vidutiniškai pasižymėjo 4,19 % mažesniu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su mėginiais, kurių gamyboje buvo panaudotos aviečių išspaudos. Taigi, tokių žaliavų panaudojimas, kaip uogų išspaudos, gali pagerinti fermentuotų gėrimų funkcionalumą.

D. Morales ir kt. (2023) tyrimo duomenimis, fermentuoti žaliosios arbatos gėrimai su *M.gisevii*, pasižymi antioksidaciniu aktyvumu nuo $0,023 \pm 0,1$ iki $0,90 \pm 0,07$ mg/L, priklausomai nuo gamybos procese naudotų augalinių žaliavų [79]. Taigi, tyrimo rezultatai atitinka mokslinėje literatūroje nurodytus duomenis.

A. L. Herrera-Ponce ir kt. (2022) tyrime nurodoma, kad aukšto intensyvumo 40 kHz dažnio (11 W/cm^2) ultragarsu (3 bei 10 min) paveikus aviųž salyklą ir išrūgas, prieš fermentaciją su PRB, pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su kontroliniais mėginiais [81].

3.6.3. Biogėrimų bendroji antocianinų koncentracija

Tyrimo metu atliktas antocianinų koncentracijos nustatymas fermentuotuose gėrimuose, kurių gamyboje buvo panaudotos aviečių išspaudos. Aviečių išspaudoms raudoną spalvą suteikia jose esantys antocianinai, dėl to kontroliniai mėginiai (C, CR ir CP), kurių gamyboje nebuvo panaudotos aviečių išspaudos, nebuvo tiriami. Tyrimo rezultatai pateikti 3.13 paveiksle.



3.13 pav. Antocianinų koncentracija fermentuotų gėrimų mėginiuose, išreikšta mg cianidin-3-gliukozido ekvivalentu (CGE)/L

Tyrimo metu nustatyta, kad fermentuotuose gėrimuose antocianinų koncentracija svyruoja nuo $5,48 \pm 0,43$ iki $7,79$ mg CGE/L. Mėginiai, kurie ruošti su neapdorotomis aviečių išspaudomis, pasižymėjo mažiausia antocianinų koncentracija – AC, ACR ir ACP mėginiuose, atitinkamai nustatyta $5,79 \pm 0,46$, $5,48 \pm 0,43$ bei $6,12 \pm 0,33$ mg CGE/L antocianinų koncentracija.

Didžiausia šių junginių koncentracija nustatyta mėginiuose, kurie ruošti su ultragarsu (70% intensyvumo ir 45 min trukmės) apdorotomis aviečių išspaudomis. Vidutiniškai, UA1C, UA1CR ir UA1CP pasižymėjo 17,96 % didesne antocianinų koncentracija, lyginant su neapdorotomis aviečių išspaudomis (AC, ACR ir ACP). Mėginiuose UA1C, UA1CR ir UA1CP esančios antocianinų koncentracijos, nustatytos atitinkamai $7,79 \pm 0,62$, $6,67 \pm 0,60$ ir $6,74 \pm 0,38$ mg CGE/L.

Mėginiai UA2C, UA2CR ir UA2CP, kurių gamyboje panaudotos ultragarsu apdorotos aviečių išspaudos (120% intensyvumo ir 30 min trukmės), vidutiniškai pasižymėjo 13,29 % didesne antocianinų koncentracija, lyginant su AC, ACR ir ACP. Mėginiuose UA2C, UA2CR ir UA2CP esančios antocianinų koncentracijos, nustatytos atitinkamai $7,43 \pm 0,22$, $6,37 \pm 0,29$ ir $6,26 \pm 0,36$ mg CGE/L.

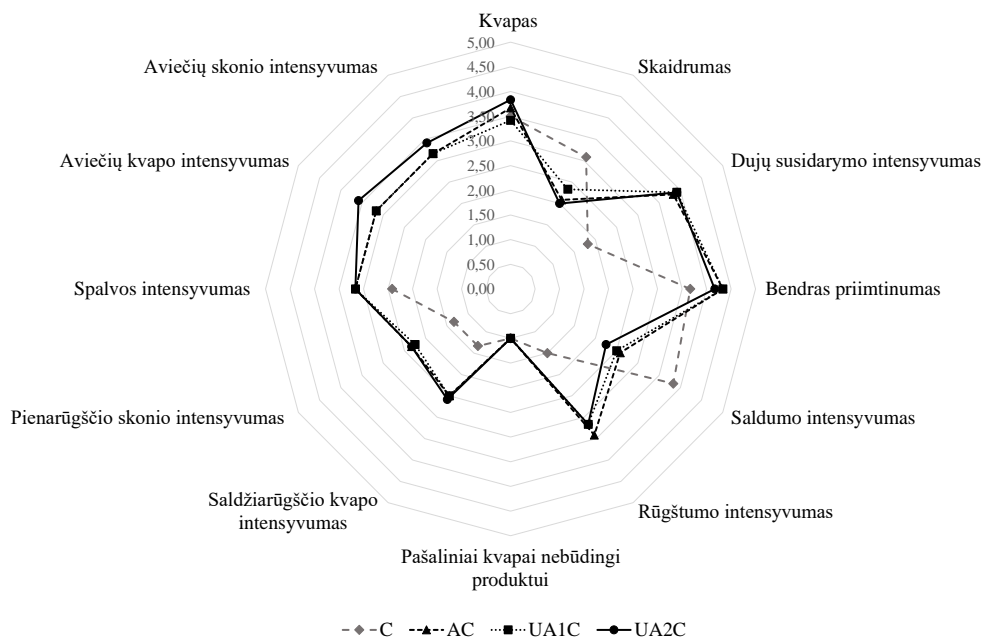
Literatūroje nurodoma, kad fermentuotuose žaliosios arbatos gėrimuose įprastai nėra antocianinų. Siekiant praturtinti fermentuotus gėrimus antocianiniais, gamybos procese turi būti panaudoti vaisiai bei uogos [82]. Tyrimo rezultatai rodo, kad ultragarsu apdorotos žaliavos panaudojimas fermentacijos procesuose, gali lemti didesnes antocianinų koncentracijas fermentuotuose gėrimuose nei ultragarsu neapdorotos žaliavos.

3.7. Fermentuotų gėrimų mėginių juslinė analizė

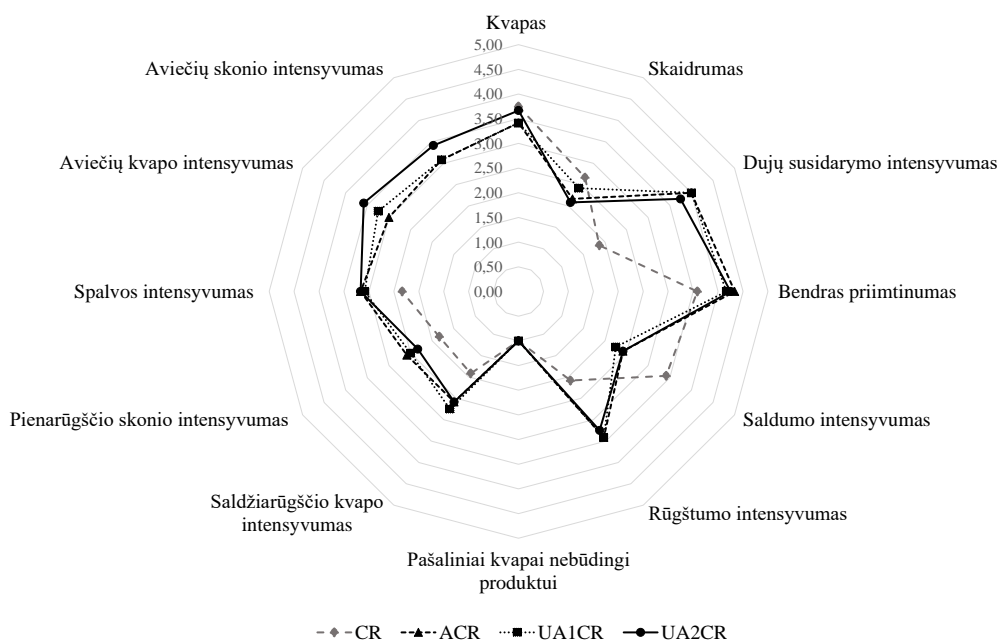
Literatūroje nurodoma, kad probiotikai gali pakeisti gėrimų cheminę sudėtį, rūgštingumą, spalvą ir bendrą priimtinumą vartotojams [83]. Augalinių gėrimų gamyboje, fermentacijos procesai padidina kvapiųjų junginių, tokių kaip organinės rūgštys ir lakieji metabolitai, koncentracijas [84]. Visgi, aukštesnis probiotinių produktų rūgštumas gali turėti įtakos probiotikų gyvybingumui (išlikimui) šiuose produktuose bei/arba pabloginti juslinį šių produktų priimtinumą. Dėl to, yra svarbu įvertinti skirtingų PRB poveikį produkto rūgštingumui.

Juslinė analizė buvo atlikta su 12 fermentuotų gėrimų mėginiais (žr. 2.4.10 skyrių). Įvairios šių mėginių savybės buvo vertinamos 5 balų sistemoje, o juslinio vertinimo anketa pateikta 1 priede.

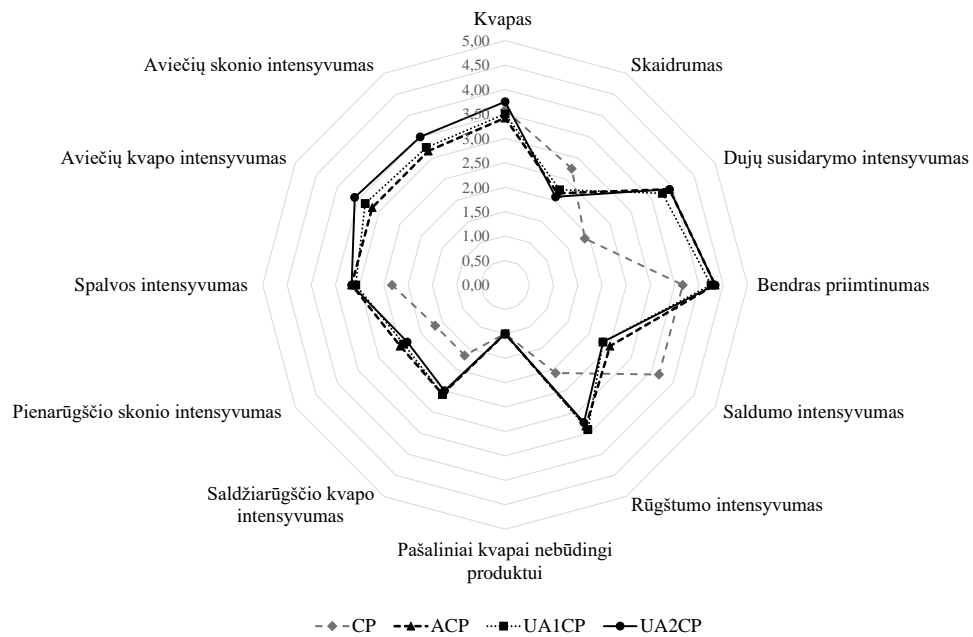
Tyrimo juslinio vertinimo rezultatai pateikti 3.14, 3.15 ir 3.16 paveiksluose.



3.14 pav. Fermentuotų gėrimų mėginių juslinės analizės rezultatai: C – mėginys be aviečių išspaudų; AC – mėginys su aviečių išspaudomis; UA1C – mėginys su ultragarsu (70%, 45 min) apdorotomis aviečių išspaudomis; UA2C – mėginys su ultragarsu (120%, 30 min) apdorotomis aviečių išspaudomis.



3.15 pav. Fermentuotų gėrimų mėginių juslinės analizės rezultatai: CR – mėginys su *L. reuteri* kultūra be aviečių išspaudų; ACR – mėginys su aviečių išspaudomis; UA1CR – mėginys su *L. reuteri* kultūra ir ultragarsu (70%, 45 min) apdorotomis aviečių išspaudomis; UA2CR – mėginys su *L. reuteri* kultūra ir ultragarsu (120%, 30 min) apdorotomis aviečių išspaudomis.



3.16 pav. Fermentuotų gėrimų mėginių juslinės analizės rezultatai: CP – mėginys su *L. plantarum* kultūra be aviečių išspaudų; ACP – mėginys *L. plantarum* kultūra ir aviečių išspaudomis; UA1CP – mėginys su *L. plantarum* kultūra ir ultragarsu (70%, 45 min) apdorotomis aviečių išspaudomis; UA2CP – mėginys su *L. plantarum* kultūra ir ultragarsu (120%, 30 min) apdorotomis aviečių išspaudomis.

Įvertinus fermentuotus gėrimus nustatyta, kad nei vienas mėginys nepasižymėjo pašaliniais kvapais, nebūdingais fermentuotos žaliosios arbatos gėrimams, dėl to šis rodiklis buvo įvertintas žemiausiu balu – 1. Kvapas visuose mėginiuose (kontroliniuose bei su aviečių išspaudomis) įvertintas vidutiniškai $3,58 \pm 0,15$ balu. Vidutiniškai, skaidrumas mėginiuose su aviečių išspaudomis buvo įvertintas $2,18 \pm 0,13$ balų, o spalvos intensyvumas – $3,15 \pm 0,04$ balų. Kontroliniuose mėginiuose skaidrumas buvo įvertintas aukštesniu balu – vidutiniškai $2,83 \pm 0,22$ balų, o spalvos intensyvumas mažesniu balu – $2,36 \pm 0,05$.

Dujų susidarymo intensyvumas mėginiuose su aviečių išspaudomis vidutiniškai įvertintas $3,89 \pm 0,09$, o kontroliniuose mėginiuose – $1,86 \pm 0,11$. Taigi, aviečių išspaudų priedas lėmė reikšmingai didesnę dujų susidarymo intensyvumą.

Bendras priimtinumą geriausiai buvo įvertintas mėginiuose, ruoštuose su aviečių išspaudomis ir vidutiniškai įvertintas $4,28 \pm 0,07$ balo. Kontroliniai mėginiai (C, CR, CP) vidutiniškai įvertinti $3,64 \pm 0,05$ balo. Tai rodo, kad aviečių išspaudų priedas lemia didesnę fermentuotų gėrimų mėginių priimtinumą vartotojui.

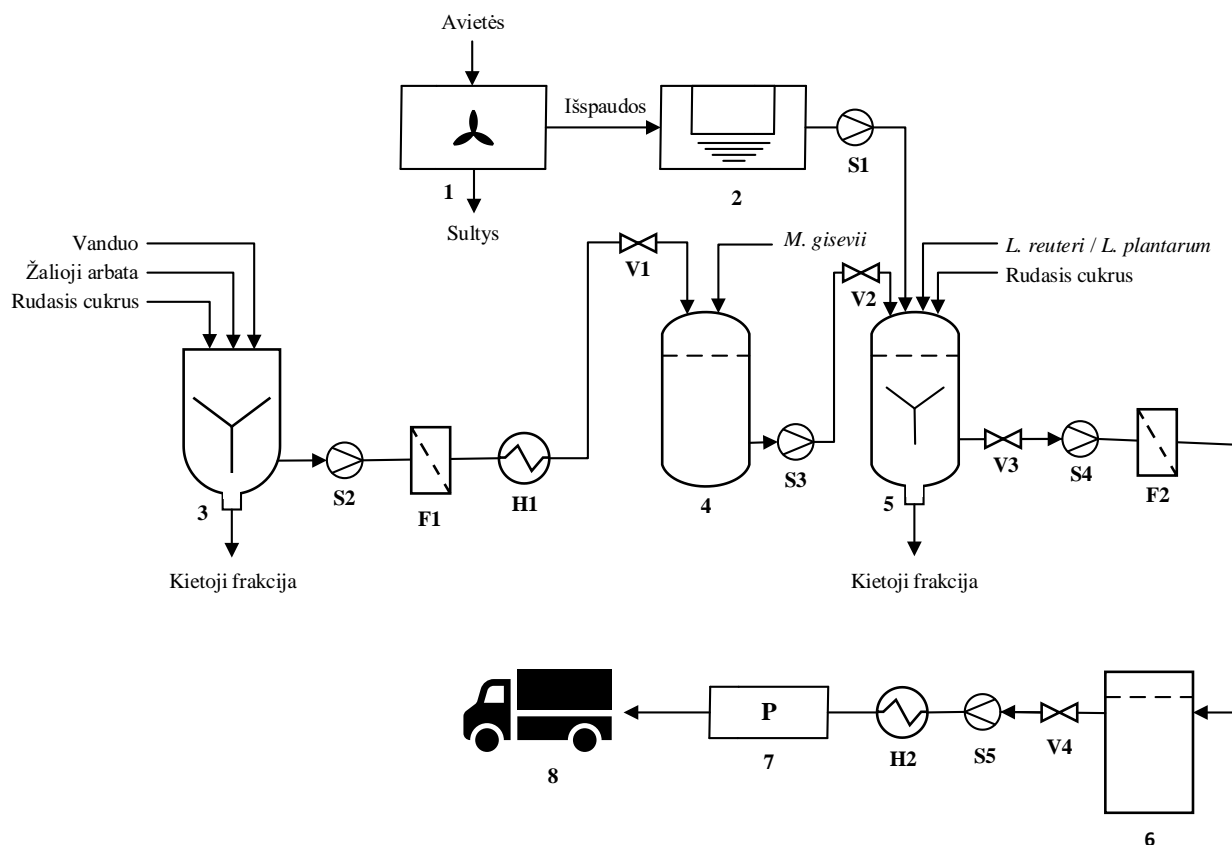
Didžiausias saldumo intensyvumas nustatytas kontroliniuose mėginiuose ir vidutiniškai siekė $3,64 \pm 0,21$ balo. Mėginiai, su aviečių išspaudomis, bet be PRB priedo (AC, UA1C, UA2C) vidutiniškai buvo įvertinti $2,44 \pm 0,17$ balu. Mažesniu saldumo intensyvumu pasižymėjo mėginiai, ruošti su pridėtine PRB (CR, CP, ACR, ACP, UA1CR, UA1CP, UA2CR ir UA2CP), kadangi PRB fermentacijos metu cukrus naudoja kaip maisto šaltinį. Taip pat, šie mėginiai pasižymėjo rūgštesniu skoniu, taip pat didesniu pienarūgščio bei saldžiarūgščio skonio intensyvumu, tačiau tai neturėjo neigiamos įtakos fermentuotų gėrimų mėginių bendram priimtinumui.

S. Plessas (2022) mokslinėje literatūroje apžvalgoje nurodė, kad PRB pagerina fermentuotų produktų kvapą bei skonį, o su tuo padidėja ir produkto priimtumas vartotojams. PRB kultūrų panaudojimas įvairių vaisių sulčių fermentacijoje pagerina ne tik jų juslines savybės, bet ir maistinę vertę [85]. Visgi, T. C. Pimentel ir kt. tyrime (2020) pastebėta, kad produktų su didesniu probiotikų kiekiu (*L. plantarum*) 8 log KSV/mL buvo įvertinti mažiau balų pagal visus jutimo požymius nei produktai su 4 arba 6 log KSV/mL. Anot autorių, tai galėjo lemti rūgštesnis skonis, jaučiamas vertintuose mėginiuose [86]. Šiame tyrime nepastebėta neigiamos PRB įtakos fermentuotų gėrimų mėginių juslinėms savybėms, tačiau taip pat nustatytas rūgštesnis skonis už mėginius, ruoštus be pridėtinės PRB (C, AC, UA1C, UA2C).

Nustatyta, kad mėginiai, kurie ruošti su ultragarsu apdorotomis aviečių išspaudomis, pasižymėjo intensyvesniu aviečių kvapu bei skoniu. Tai galima paaiškinti tuo, jog ultragarsinio apdorojimo metu iš aviečių išspaudų augalinės struktūros išsiskiria įvairūs lakūs organiniai junginiai, kurie vaidina svarbų vaidmenį formuojant aviečių skonį. Būtent tai ir paaiškintų intensyvesnį aviečių kvapą mėginiuose UA1C, UA1CR, UA1CP, UA2C, UA2CR ir UA2CP.

4. Rekomendacijų dalis

Fermentuotų gėrimų gamybai rekomenduojama naudoti 37 kHz (70 %, 45 min) intensyvumo ultragarsu apdorotas aviečių išspaudas, kurios lemia didžiausias fenolinių junginių ir antocianinų koncentracijas, bei antioksidacinį aktyvumą fermentuotų gėrimų mėginiuose. Siūloma tokia (žr. 4.1 pav) fermentuotų gėrimų su *M. gisevii*, pridėtine PRB (*L. plantarum* arba *L. reuteri*) ir ultragarsu apdorotomis aviečių išspaudomis aparatūrinė schema.



4.1 pav. Fermentuoto gėrimo su aviečių išspaudomis aparatūrinė schema

4.1 lentelė. Gamybos technologinė įranga

Įrenginio Nr.	Įrenginys
1	Sulčių ekstraktorius
2	Ultragarso vonia
3	Maišyklė
4	Fermentatorius
5	Fermentatorius su maišykle
6	Produkto laikymo talpa
7	Pakavimo įrenginys
8	Autotransportas
F1-F2	Metalinio tinklelio filtrai (100 μm)
S1-S5	Išcentriniai siurbliai
H1-H2	Šilumokaičiai
V1-V4	Dviejų kelių vožtuvai

Į sulčių ekstraktorių (1) tiekiamos avietės bei atliekama aviečių sulčių ekstrakcija. Susidariusios aviečių išspaudos patenka į ultragarso vonią (2), kurioje vykdomas aviečių išspaudų apdorojimas 37 kHz, 70 % intensyvumo ultragarsu, palaikant 35 °C temperatūrą. Ultragarinio apdorojimo poveikio trukmė – 45 min. Apdorotos aviečių išspaudos nukreipiamos į fermentatorių (7), kuriame vykdoma antrinė fermentacija.

Į maišyklę (3) dozuojamas 100 °C temperatūros vanduo, žalioji arbata ir rudasis cukrus. Mišinys maišomas 20 min, po kurių maišyklė išjungžiama ir mišinys paliekamas nusistovėti. Kietoji frakcija nusėda ant dugno, o skystoji frakcija tiekiami pro 100 µm metalinio tinklelio filtrą (F1) išcentrinio siurblio (S2) pagalba. Šilumokaičio (H1) pagalba mišinys atvėsina iki 20 °C ir tiekiamas į fermentatorių (4). Į fermentatorių (4) patalpinama *M. gisevii* biologinė struktūra ir vykdoma pirminė fermentacija. Pirminė fermentacija vykdoma keturias paras, palaikant 20 °C temperatūrą.

Po keturių parų, gautasis fermentuotas tirpalas iš fermentatoriaus (4) tiekiamas į fermentatorių su maišykle (5), kuriame vykdoma antrinė fermentacija. Į fermentatorių tiekiamos ultragarsu apdorotos aviečių išspaudos, rudasis cukrus bei *L. reuteri* arba *L. plantarum* suspensija. Antrinė fermentacija vykdoma tris paras, palaikant 20 °C temperatūrą bei maišant terpės mišinį. Po antrinės fermentacijos, gautasis mišinys paliekamas nusistovėti, o skystoji frakcija tiekiami pro metalinio tinklelio filtrą (F2) į produkto laikymo talpą (6). Šilumokaičio (H2) pagalba fermentuotas gėrimas atvėsina iki 3 ± 1 °C temperatūros ir tiekiamas į pakavimo įrenginį (7), kuriame supakuojamas į tarą. Fermentuoti gėrimai išvežami autotransportu bei laikomi 3 ± 1 °C temperatūroje.

Atsižvelgiant į atlikto tyrimo rezultatus ir išvadas, rekomenduojame plėtoti tyrimą šiomis kryptimis:

1. Atlikti fermentuotų gėrimų mėginių cheminę analizę, siekiant nustatyti įvairius mikroorganizmų metabolizmo produktus – organines rūgštis, vitaminus ir kt.
2. Atlikti aviečių išspaudų antimikrobinio aktyvumo prieš tam tikrus patogenus nustatymą. Įvertinti ultragarsinio apdorojimo įtaką aviečių išspaudų antimikrobiniam aktyvumui prieš patogeninius mikroorganizmus.

Išvados

1. Aviečių išspaudų apdorojimas ultragarsu padidino fenolinių junginių ir antocianinų koncentracijas, taip pat antioksidacinį aktyvumą aviečių išspaudose, tačiau neturėjo įtakos jų pH vertei. Parinkti du optimalūs apdorojimo ultragarsu režimai – 70 % intensyvumo ir 45 min trukmės ultragarsas bei 120 % intensyvumo ir 30 min trukmės. Nustatyta, kad apdorojimas ultragarsu lėmė 31,82 % didesnes fenolinių junginių koncentracijas, 9,81 % didesnę antioksidacinį aktyvumą bei 25,80 % didesnes antocianinų koncentracijas aviečių išspaudose, lyginant su kontroliniais ultragarsu neapdorotomis aviečių išspaudomų mėginiais.
2. Atlikus *Medusomyces gisevii* metagenominę analizę:
 - 2.1 Identifikuota 370 skirtingų mikroorganizmų, sudarančių *Medusomyces gisevii* kultūrą, iš kurių 88,30 % sudaro bakterijos, 8,40 % – eukariotai, 0,02 % – virusai, 0,003 % – archėjos, 3,29 % – neidentifikuotos genetinės sekos.
 - 2.2 Pagrindinės bakterijų gentys, sudarančios *Medusomyces gisevii* kultūrą, yra *Komagataeibacter*, *Gluconobacter*, *Oenococcus* ir *Acetobacter*, o pagrindinės eukariotų gentys - *Brettanomyces*, *Lachancea*, *Saccharomyces*, *Pichia* ir *Ogataea*.
 - 2.3 Identifikuoti du genai, lemiantys bakterijų atsparumą prieš antibiotikus – *qacG* genas, lemiantis atsparumą ketvirtiniams amonio junginiams. Taip pat nustatytas *vanY* genas, esantis *vanB* klasteryje, kuris lemia atsparumą vankomicinui.
 - 2.4 Identifikuoti genai, atsakingi už įvairių angliavandenių aktyvumo fermentų sintezę. Genai, koduojantys glikosiltransferazės, sudaro 53,11 %, glikosidų hidrolazes – 33,67 %, angliavandenius surišančius modulius – 5,59 %, angliavandenių esterazes – 4,59 %, pagalbinės veiklos fermentus – 2,03 %, polisacharidų liazes – 1,10 %
3. Fermentacijos tyrimų metu nustatyta, kad:
 - 3.1 Vykdamas pirminę fermentaciją su *Medusomyces gisevii* biologine struktūra, po trijų pakartojimų nusistovėjo mikrobiologinė pusiausvyra ir biologinė struktūra buvo tinkama naudoti fermentuotų gėrimų mėginių gamyboje. Tyrimo metu pH vertė kito rūgštėjimo kryptimi.
 - 3.2 Nustatyta, kad antrinės fermentacijos tyrimo metu aviečių išspaudos lėmė vidutiniškai didesnes pieno rūgšties bakterijų koncentracijas fermentuotuose gėrimuose, lyginant su kontroliniais mėginiais: mėginiuose, su 70 % 45 min ultragarsu apdorotomis aviečių išspaudomis, vidutinė PRB koncentracija buvo 8,33 log KSV/g, mėginiuose su 120 % 30 min ultragarsu apdorotomis aviečių išspaudomis vidutinė PRB koncentracija buvo 8,29 log KSV/g. Neapdorotų aviečių išspaudų mėginiuose vidutinė PRB koncentracija buvo 8,18 log KSV/g, o kontroliniuose mėginiuose – 7,42 log KSV/g.
4. Nustatyta, kad pirminis aviečių išspaudų apdorojimas ultragarsu lėmė didesnes fenolinių junginių, antocianinų koncentracijas bei antioksidacinį aktyvumą fermentuotuose gėrimuose:
 - 4.1 Nustatyta, kad fermentuotuose gėrimuose su 70 % intensyvumo ir 45 min apdorotomis aviečių išspaudomis fenolinių junginių koncentracija vidutiniškai padidėjo 32,34 %, antocianinų – 17,96 %, antioksidacinis aktyvumas – 4,02 %, lyginant su ultragarsu neapdorotomis aviečių išspaudomis.
 - 4.2 Nustatyta, kad fermentuotuose gėrimuose su 120 % intensyvumo ir 30 min apdorotomis aviečių išspaudomis fenolinių junginių koncentracija vidutiniškai padidėjo 14,62 %, antocianinų – 13,29 %, antioksidacinis aktyvumas – 1,10 %, lyginant su ultragarsu neapdorotomis aviečių išspaudomis.
5. Fermentuotų gėrimų mėginių mikrobiologiniuose stabilumo tyrimų metu nustatyta, kad:

- 5.1 Po 6 parų fermentuotų gėrimų mėginių laikymo, aviečių išspaudos slopino mielių vystymąsi, aerobinių mikroorganizmų skaičių bei skatino pieno rūgšties bakterijų augimą, lyginant su mėginiais, kurių gamyboje nebuvo panaudotos išspaudos.
- 5.2 Po 20 laikymo parų aviečių išspaudos stabilizavo fermentuotų gėrimų gedimo intensyvumą, mielių skaičius buvo didelis, tačiau pieno rūgšties bakterijų skaičius išliko panašiam lygyje kaip ir po 13 dienų. Tokiu būdu susidarė atitinkamas santykis tarp mikroorganizmų skaičiaus ir tai lėmė aviečių išspaudų tinkamumą fermentuotų gėrimų gamybai.

Literatūros sąrašas

1. SARKER, A., et al. A comprehensive review of food waste valorization for the sustainable management of global food waste. *Sustainable Food Technology* [interaktyvus]. 2024, 2(1), 48-69 [žiūrėta 2024-01-03]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1039/D3FB00156C>
2. STRUCK, S., et al. Berry pomace – a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2016, 51 [žiūrėta 2024-01-03]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13112>.
3. BRODOWSKA, A. J., et al. Raspberry pomace – composition, properties and application. *European Journal of Biological Research*. 2017, 7(2), 86-96. ISSN 2449-8955.
4. SZYMANOWSKA, U., et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential and Consumer Acceptance of Wafers Enriched with Freeze-Dried Raspberry Pomace. *Applied Sciences*. 2021, 11(15). ISSN 2076-3417.
5. SOMMER, S., et al. Upcycling of black currant pomace for the production of a fermented beverage with *Wolfiporia cocos*. *Journal of Food Science and Technology*. 2023, 60(4), 1313-1322. ISSN 0975-8402.
6. VULIĆ, J., et al. Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts. *Acta Periodica Technologica* [interaktyvus]. 2011, 42, 271-279 [žiūrėta 2024-01-03]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.2298/APT1142271V>.
7. PECYNA, A., et al. Impact of Incorporating Two Types of Dried Raspberry Pomace into Gluten-Free Bread on Its Nutritional and Antioxidant Characteristics. *Applied Sciences*. 2024, 14(4). ISSN 2076-3417.
8. KUMAR, N., et al. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*. 2019, 24, e00370. ISSN 2215-017X.
9. CHEN, J., et al. Degradation kinetics and pathways of red raspberry anthocyanins in model and juice systems and their correlation with color and antioxidant changes during storage. *LWT*. 2020, 128, 109448. ISSN 0023-6438.
10. GOLOVINSKAIA, O., et al. Review of Functional and Pharmacological Activities of Berries. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2021, 26(13). ISSN 1420-3049.
11. BOBINAITĖ, R., et al. Phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of raspberry fruit, pulp, and marc extracts. *CyTA – Journal of Food*. 2013, 11(4), 334-342. ISSN 1947-6337.
12. MA, Y., et al. Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control*. 2019, 106, 106712. ISSN 0956-7135.
13. KHAMENEH, B., et al. Phytochemicals: A Promising Weapon in the Arsenal against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2021, 10(9). ISSN 2079-6382.
14. KUMAR, K., et al. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2021, 70, 105325. ISSN 1350-4177.
15. HU, W., et al. Ultrasound Treatment on Stability of Total and Individual Anthocyanin Extraction from Blueberry Pomace: Optimization and Comparison. *Molecules*. 2019, 24(14). ISSN 1420-3049.

16. YUSOFF, I. M., et al. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International*. 2022, 157, 111268. ISSN 0963-9969.
17. FLYURIK, E. A., et al. Medusomyces gisevii: cultivation, composition, and application. *Foods and Raw Materials*. 2023, 11(1), 152–161. ISSN 2405-8440.
18. VILLARREAL-SOTO, S. A., et al. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*. 2018, 83(3), 580-588. ISSN 0022-1147.
19. TODOROV, S., et al. Lactobacillus Plantarum: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Food Reviews International*. 2010, 26(3), 205-229. ISSN 8755-9129.
20. ZAPANSNIK, A., et al. Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods (Basel, Switzerland)*. 2022, 11(9). ISSN 2304-8158.
21. ABEDI, E., et al. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*. 2020, 6(10). ISSN 2405-8440.
22. YADAV, R., et al. Impact of Chemical Food Preservatives Through Local Product on Human Health – A Review. *High Technology Letters*. 2021, 27, 767-773. ISSN 1006-6748.
23. STEVENS, M., et al. *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*. Woodhead Publishing, 2011. 129-160. ISBN 978-1-84569-669-6.
24. MU, Q., et al. Role of Lactobacillus reuteri in Human Health and Diseases. *Frontiers in microbiology*. 2018, 9, 757. ISSN 1664-302X.
25. BEHERA, S.S., et al. Lactobacillus plantarum with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *BioMed research international*. 2018, 2018, 9361614. ISSN 2314-6141 2314-6133.
26. SEDDIK, H. A., et al. Lactobacillus plantarum and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2017, 9(2), 111-122. ISSN 1867-1314 1867-1306.
27. CEBECI, A., et al. Properties of potential probiotic Lactobacillus plantarum strains. *Food Microbiology*. 2003, 20(5), 511-518. ISSN 0740-0020.
28. ARASU, M. V., et al. In vitro importance of probiotic Lactobacillus plantarum related to medical field. *Saudi journal of biological sciences*. 2016, 23(1), 6-10. ISSN 1319-562X 2213-7106.
29. ALAM, K., et al. Strategies for Natural Products Discovery from Uncultured Microorganisms. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2021, 26(10). ISSN 1420-3049.
30. THOMAS, T., et al. Metagenomics – a guide from sampling to data analysis. *Microbial informatics and experimentation*. 2012, 2(1), 3. ISSN 2042-5783.
31. LIU, Y. X., et al. A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & cell*. 2021, 12(5), 315-330. ISSN 1674-8018 1674-800X.
32. QUINCE, C., et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature biotechnology*. 2017, 35(9), 833-844. ISSN 1546-1696 1087-0156.
33. KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 152/2009. 2009 m. sausio 27 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 152/2009, nustatantis oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos ėminių ėmimo ir analizės metodus.
34. ALY, M. O., et al. Authentication of protein, fat, carbohydrates, and total energy in commercialized high protein sports foods with their labeling data. *Scientific reports*. 2023, 13(1), 15359. ISSN 2045-2322.

35. MAKKAR, H. P. S., et al. *Plant Secondary Metabolites*. Humana Press, 2007. ISBN 978-1-58829-993-2
36. NIELSEN, H.B., et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(8), 822-828. ISSN 1546-1696.
37. MCARTHUR, A. G., et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2013, 57(7), 3348-3357. ISSN 1098-6596 0066-4804.
38. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS [LST EN ISO 4833-1:2013]. Maisto grandinės mikrobiologija. Bendrasis mikroorganizmų skaičiavimo metodas. 1 dalis. Kolonijų skaičiavimas 30 °C temperatūroje, taikant lėkštelių užpylimo būdą (ISO 4833-1:2013). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2008.
39. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST ISO 21527-1:2008]. Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis mielių ir pelėsinų grybų skaičiavimo metodas. 1 dalis. Kolonijų skaičiavimo būdas produktuose, kurių vandens aktyvumas didesnis kaip 0,95 (tapatus ISO 21527-1:2008). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2008.
40. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST ISO 15214:2009]. Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis mezofilinių pieno rūgšties bakterijų skaičiavimo metodas. Kolonijų skaičiavimo 30 °C temperatūroje būdas (tapatus ISO 15214:1998). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2009.
41. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS [LST ISO 4832:2006]. Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis koliforminių bakterijų skaičiavimo metodas. Kolonijų skaičiavimo metodas (tapatus ISO 4832:2006). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2006.
42. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST ISO 16649-2:2002/P:2009]. Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis β -gliukuronidazę gaminančių žarninių lazdelių (*Escherichia coli*) skaičiavimo metodas. 2 dalis. Kolonijų skaičiavimo 44 °C temperatūroje, naudojant 5-brom-4-chlor-3-indolil β -D-gliukuronidą, metodas (tapatus ISO 16649-2:2001). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2009.
43. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST EN ISO 13299:2016]. Juslinė analizė. Metodika. Bendrieji nurodymai dėl juslinio profilio sudarymo (ISO 13299:2016). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2016.
44. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST EN ISO 8586:2023]. Juslinė analizė. Juslinę analizę atliekančių vertintojų atranka ir mokymas (ISO 8586:2023). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2023.
45. ROSS, K. A., et al. Dried berry pomace as a source of high value-added bioproduct: drying kinetics and bioactive quality indices. *International Journal of Food Properties.* 2020, 23(1), 2123-2143. ISSN 1094-2912.
46. GOUW, V. P., et al. Functional properties, bioactive compounds, and in vitro gastrointestinal digestion study of dried fruit pomace powders as functional food ingredients. *LWT.* 2017, 80, 136-144. ISSN 0023-6438.
47. RADOČAJ, O., et al. Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oils extracted from dried press pomace after longterm frozen storage of berries can be used as functional food ingredients. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 2014, 116(8), 1015-1024. ISSN 1438-7697.

48. SANTOS, S., et al. Agro-industrial waste as a source of bioactive compounds: ultrasound-assisted extraction from blueberry (*Vaccinium myrtillus*) and raspberry (*Rubus idaeus*) pomace. *Acta Scientiarum. Technology*. 2021, 43, e55564 [žiūrēta 2024-01-08]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v43i1.55567>.
49. FOTSCHKI, B., et al. Grinding levels of raspberry pomace affect intestinal microbial activity, lipid and glucose metabolism in Wistar rats. *Food Research International*. 2019, 120, 399-406. ISSN 0963-9969.
50. BAUZA-KASZEWSKA, J., et al. Synergistic Antimicrobial Effect of Raspberry (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) Preparations and Probiotic Bacteria on Enteric Pathogens. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2021, 71, 51-59 [žiūrēta 2024-01-05]. Prieiga per doi: <http://dx.doi.org/10.31883/pjfn/132897>.
51. SORIA, A. C., et al. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2010, 21(7), 323-331. ISSN 0924-2244.
52. AGUILAR, K. Evaluating ultrasound pre-treatment as a tool for improving the process of a fermented beverage made from pineapple by-products. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2022, 25. ISSN 1981-6723.
53. GUANWEN, S., et al. Effect of Ultrasound Treatment on the Sterilization and Quality of Cucurbita pepo. *E3S Web Conf*. 2021, 290, 03027. [žiūrēta 2024-01-05]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202129003027>.
54. ZOU, Y., et al. Sonication enhances quality and antioxidant activity of blueberry juice. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2017, 37. [žiūrēta 2024-01-07]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1590/1678-457X.27816>.
55. KIDAK, R., et al. Ultrasonic destruction of phenol and substituted phenols: A review of current research. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2006, 13(3), 195-199. ISSN 1350-4177.
56. GOLMOHAMADI, A., et al. Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonics sonochemistry*. 2013, 20(5), 1316-1323. ISSN 1873-2828 1350-4177.
57. SANTANA DE CARVALHO, D., et al. The Space-Exposed Kombucha Microbial Community Member *Komagataeibacter oboediens* Showed Only Minor Changes in Its Genome After Reactivation on Earth. *Frontiers in microbiology*. 2022, 13, 782175. ISSN 1664-302X.
58. MARIČ, L., et al. Description of *Komagataeibacter melaceti* sp. nov. and *Komagataeibacter melomenus* sp. nov. Isolated from Apple Cider Vinegar. *Microorganisms*. 2020, 8(8). ISSN 2076-2607.
59. HARROUARD, J., et al. *Brettanomyces bruxellensis*: Overview of the genetic and phenotypic diversity of an anthropized yeast. *Molecular ecology*. 2023, 32(10), 2374-2395. ISSN 1365-294X 0962-1083.
60. STEENSELS, J., et al. *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, 206, 24-38. ISSN 0168-1605.
61. AMARASINGHE, H., et al. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. *Food Science & Nutrition*. 2018, 6(3), 659-665. ISSN 2048-7177.
62. FISCHETTI, V. A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Antimicrobials/Genomics*. 2008, 11(5), 393-400. ISSN 1369-5274.

63. OMATA, K., et al. Distribution and genome structures of temperate phages in acetic acid bacteria. *Scientific reports*. 2021, 11(1), 21567. ISSN 2045-2322.
64. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [interaktyvus]. [žiūrėta 2024-03-25]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
65. DAVIES, G. J., et al. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Catalysis and regulation/Proteins*. 2005, 15(6), 637-645. ISSN 0959-440X.
66. LAIRSON, L. L., et al. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual review of biochemistry*. 2008, 77, 521-555. ISSN 0066-4154.
67. Carbohydrate-active enzymes database [interaktyvus]. [žiūrėta 2024-03-25]. Prieiga per internetą: <http://www.cazy.org/>
68. RAI, A., et al. A shotgun approach to explore the bacterial diversity and a brief insight into the glycoside hydrolases of Samiti lake located in the Eastern Himalayas. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2022, 20(1), 162. ISSN 1687-157X.
69. SIDAR, A., et al. Carbohydrate Binding Modules: Diversity of Domain Architecture in Amylases and Cellulases From Filamentous Microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, 8. ISSN 2296-4185.
70. CHAKRABORTY, S., et al. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2017. 527-539. ISBN 978-0-444-63662-1.
71. SISTA KAMESHWAR, A. K., et al. Understanding the structural and functional properties of carbohydrate esterases with a special focus on hemicellulose deacetylating acetyl xylan esterases. *Mycology*. 2018, 9(4), 273-295. ISSN 2150-1203 2150-1211.
72. HOSSAIN, M. S., et al. *Advances in Lignocellulosic Biofuel Production Systems*. Woodhead Publishing, 2023. 143-159. ISBN 978-0-323-91192-4.
73. LARSSON, D. G. J., et al. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*. 2022, 20(5), 257-269. ISSN 1740-1534.
74. HEIR, E., et al. The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *Journal of applied microbiology*. 1999, 86(3), 378-388. ISSN 1364-5072.
75. STOGIOS, P. J., et al. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Science*. 2020, 29(3), 654-669. ISSN 0961-8368.
76. BISICCHIA, P., et al. Acquisition of VanB-type vancomycin resistance by *Bacillus subtilis*: the impact on gene expression, cell wall composition and morphology. *Molecular Microbiology*. 2011, 81(1), 157-178. ISSN 0950-382X.
77. STOGIOS, P. J., et al. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Science*. 2020, 29(3), 654-669. ISSN 0961-8368.
78. JUODEIKIENĖ, G., et al. Functionalization of soya press cake (okara) by ultrasonication for enhancement of submerged fermentation with *Lactobacillus paracasei* LUHS244 for wheat bread production. *LWT*. 2021, 152, 112337. ISSN 0023-6438.
79. MORALES, D., et al. Novel kombucha beverages with antioxidant activity based on fruits as alternative substrates. *LWT*. 2023, 189, 115482. ISSN 0023-6438.
80. JAKUBCZYK, K., et al. Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2020, 9(5). ISSN 2076-3921.

81. HERRERA-PONCE, A. L., et al. High-intensity ultrasound as pre-treatment in the development of fermented whey and oat beverages: effect on the fermentation, antioxidant activity and consumer acceptance. *Journal of food science and technology*. 2022, 59(2), 796-804. ISSN 0022-1155 0975-8402.
82. YILDIZ, E., et al. Determination of in-vitro phenolics, antioxidant capacity and bio-accessibility of Kombucha tea produced from black carrot varieties grown in Turkey. *Food Science and Technology*. 2021, 41. ISSN 0101-2061.
83. PIMENTEL, T. C., et al. Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. *Food Research International*. 2021, 140, 110033. ISSN 0963-9969.
84. HIDALGO-FUENTES, B., et al. Plant-Based Fermented Beverages: Nutritional Composition, Sensory Properties, and Health Benefits. *Foods*. 2024, 13(6). ISSN 2304-8158.
85. PLESSAS, S. Advancements in the Use of Fermented Fruit Juices by Lactic Acid Bacteria as Functional Foods: Prospects and Challenges of *Lactiplantibacillus (Lpb.) plantarum* subsp. *plantarum* Application. *Fermentation*. 2022, 8(1). ISSN 2311-5637.
86. PIMENTEL, T. C., et al. Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. *Food Research International*. 2021, 140, 110033. ISSN 0963-9969.

Publikacijų sąrašas

Darbo rezultatai pristatyti trijose tarptautinėse mokslinėse konferencijose:

1. Steigvilaitė Gabija, Vaičiulytė Lina. Sustainable processing of secondary plant-based raw materials using biological methods. 82th International Scientific Conference of the University of Latvia (UL) „Innovative and Applied Research in Biology”, March 8, 2024, Riga, Latvia.
2. Steigvilaitė Gabija, Vaičiulytė Lina. Application of sustainable technological solutions for the development of fermented plant products. 67th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences „Open readings 2024“, April 23-26, 2024, Vilnius, Lietuva.
3. Steigvilaitė Gabija, Vaičiulytė Lina. Application of physical methods in the biotechnological processing of plant by-products. 20th International Conference of Young Scientists on Energy and Natural Sciences Issues „CYSENI 2024“, May 21-23, 2024, Kaunas, Lithuania.

Priedai

1 priedas. Standartiniai skiedimai skirti tanino rūgšties kalibracinei kreivei paruošti

Tanino rūgšties tirpalo tūris, µl	Distiliuoto vandens tūris, µl	Galutinė tanino rūgšties koncentracija, mg/L
0	500	0
10	490	1
20	480	2
30	470	3
40	460	4
50	450	5
60	440	6
70	430	7
80	420	8
90	410	9
100	400	10

2 priedas. Standartiniai skiedimai skirti trolokso kalibracinei kreivei paruošti

Mėgintuvėlio Nr.	1,2 mmol/L trolokso tirpalo tūris, ml	Metanolio tūris, ml	Galutinė trolokso koncentracija, mmol/L
1	0	4,0	0
2	1,0	3,0	0,30
3	2,0	2,0	0,60
4	2,5	1,5	0,75
5	3,0	1,0	0,90
6	3,5	0,5	1,05
7	4,0	0	1,20

3 priedas. Fermentuotų gėrimų juslinės analizės anketa

Rodiklis ir vertinimo skalė	Vertinimo data											
	Mėginio ženklavimas ir juslinis įvertinimas, balais											
	C	CR	CP	AC	ACR	ACP	UAIC	UAICR	UAICP	UA2C	UA2CR	UA2CP
Kvapas (1 balas – mažas; 5 balai – didelis)												
Skaidrumas (1 balas – mažas; 5 balai – didelis)												
Dujų susidarymo intensyvumas (1 – mažas; 5 – didelis)												
Bendras priimtumas (1 – nevertojamas; 5 – priimtinas)												
Saldumo intensyvumas (1 – mažas; 5 – didelis)												
Rūgštumo intensyvumas (1 – mažas; 5 – didelis)												
Pašaliniai kvapai nebūdingi produktui* (1 – nėra; 5 – yra)												
Saldžiarūgščio kvapo intensyvumas (1 – mažas; 5 – didelis)												
Pienarūgščio skonio intensyvumas (1 – mažas; 5 – didelis)												
Spalvos intensyvumas (1 – blanki; 5 – ryški)												
Aviečių kvapo intensyvumas (1 – mažas; 5 – didelis)												
Aviečių skonio intensyvumas (1 – mažas; 5 – didelis)												

*jeigu yra pašalinių kvapų – nurodyti, kokie kvapai jaučiami