



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Rokas Rimkevičius**

**ŠALUTINIŲ AGRO-PRODUKTŲ PANAUDOJIMO GALIMYBĖS**  
**PIENO RŪGŠTIES GAMYBAI PRITAİKANT FERMENTINĘ**  
**HIDROLIZĘ IR PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJAS**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovas**

Lekt. dr. Dalia Čižeikienė

**Kaunas, 2017**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**ŠALUTINIŲ AGRO-PRODUKTŲ PANAUDOJIMO GALIMYBĖS**  
**PIENO RŪGŠTIES GAMYBAI PRITAIKANT FERMENTINĘ**  
**HIDROLIZĘ IR PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJAS**

Baigiamasis magistro projektas

**Studijų programa Pramoninė biotechnologija (kodas 621J70004)**

**Vadovas**

Lekt. dr. Dalia Čižeikienė

**Recenzentas**

Doc. dr. Jonas Damašius

**Darbą atliko**

Rokas Rimkevičius

**Kaunas, 2017**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**

Cheminės technologijos fakultetas

---

(Fakultetas)

Rokas Rimkevičius

---

(Studento vardas, pavardė)

Pramoninė biotechnologija, 621J70004

---

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Šalutinių agro-produktų panaudojimo galimybės pieno rūgšties gamybai pritaikant fermentinę hidrolizę ir pieno rūgšties bakterijas“

**AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

20 17 m. birželio 01 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Roko Rimkevičiaus**, Projektas tema „Šalutinių agro-produktų panaudojimo galimybės pieno rūgšties gamybai pritaikant fermentinę hidrolizę ir pieno rūgšties bakterijas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

# TURINYS

ĮVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
1.1 Lignoceliuliozinė žaliava ir jos panaudojimas .....	11
1.1.1 Kviečių šiaudai.....	13
1.1.2 Sėlenos .....	13
1.2 Lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimas .....	14
1.2.1 Mechaninis apdorojimas .....	15
1.2.2 Cheminis apdorojimas.....	15
1.2.3 Kompleksinis poveikis .....	16
1.2.4 Fermentinė hidrolizė .....	16
1.3 Vertingų cheminių medžiagų gamyba iš atsinaujinančių šaltinių .....	17
1.3.1 Pridėtinės vertės produktai .....	17
1.3.2 Pieno rūgštis ir jos gamyba .....	19
1.3.3 Pieno rūgšties fiziko-cheminės savybės.....	19
1.4 Pienarūgštės bakterijos.....	22
1.4.1 Pienarūgščių bakterijų fiziologija ir morfologija .....	23
1.4.2 Pienarūgščių bakterijų metabolizmas.....	23
1.4.3 Pienarūgščių bakterijų genetika .....	25
1.5 Fenoliniai junginiai ir oksidacinis stresas .....	25
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI .....	26
2.1 Tyrimo objektai .....	26
2.1.1 Fermentiniai preparatai .....	26
2.1.2 Organinė žaliava.....	26
2.1.3 Pienarūgštės bakterijos.....	26
2.2 Tyrimo metodai .....	27
2.2.1 Celiulazių aktyvumo nustatymas .....	27
2.2.2 Ksilanazių aktyvumo nustatymas.....	28
2.2.3 Beta-gliukanazių aktyvumo nustatymas .....	28
2.2.4 Temperatūros įtakos fermentinei hidrolizei nustatymas .....	29
2.2.5 Fermentinės hidrolizės optimalios trukmės nustatymas.....	29
2.2.6 Druskų koncentracijos įtakos fermentinei hidrolizei nustatymas .....	30
2.2.7 Fermentinių preparatų optimalaus kiekio sėlenų hidrolizei parinkimas .....	30
2.2.8 PRB augimo hidrolizuotose lignoceliuliozinės žaliavos terpėse nustatymas.....	31
2.2.9 Fermentuotos terpės drumstumo įvertinimas .....	32

2.2.10 Fermentuojamų terpių rūgštingumo nustatymas .....	33
2.2.11 L-pieno rūgšties ir D-pieno rūgšties kiekių nustatymas.....	33
2.2.12 Antioksidacinio aktyvumo fermentuotoje terpėje įvertinimas .....	34
2.2.13 Fenolinių junginių kiekio fermentuotoje terpėje nustatymas .....	35
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	36
3.1 Fermentinės hidrolizės sąlygų įtaka jos efektyvumui .....	36
3.1.1 Fermentinio preparato lignoceliuliozinei žaliavai parinkimas .....	36
3.1.2 Temperatūros įtaka celiulazių, ksilanazių ir beta-gliukanazių aktyvumui.....	36
3.1.3 Fermentinės hidrolizės trukmės ir preparato AphaStar Plus kiekio įtaka hidrolizės efektyvumui.....	38
3.1.4 Druskų koncentracijos įtaka fermentinei hidrolizei .....	38
3.2 PRB augimas hidrolizuotoje šiaudų terpėje .....	40
3.2.1 <i>Pediococcus pentosaceus</i> KTU05-9 augimas skirtingais fermentais apdorotose šiaudų terpėse.....	40
3.2.2 Kitų pienarūgščių bakterijų augimas skirtingais fermentais apdorotose šiaudų terpėse.....	41
3.3 Pieno rūgšties susidarymas po PRB fermentacijos šiaudų terpėje .....	42
3.4 Fermentacijos trukmės įtaka PRB ląstelių augimui, terpės pH, substrato pokyčiams bei pieno rūgšties susidarymui šiaudų ir sėlenų terpėse.....	44
3.4.1 Fermentacijos trukmės įtaka PRB ląstelių augimui šiaudų ir sėlenų terpėse.....	45
3.4.2 Fermentacijos trukmės įtaka terpės pH pokyčiams pieno rūgšties gamybos metu šiaudų ir sėlenų terpėse .....	45
3.4.3 Fermentacijos trukmės įtaka pieno rūgšties susidarymui šiaudų ir sėlenų terpėse .....	46
3.4.4 Substrato iš lignoceliuliozinės žaliavos pokyčiai pieno rūgšties gamybos metu .....	48
3.5 Sinergetinis PRB poveikis pieno rūgšties susidarymui .....	49
3.6 Sinergetinis PRB poveikis terpės pH vertei .....	51
3.7 Antioksidacinio aktyvumo ir fenolinių junginių įvertinimas .....	52
REKOMENDACIJOS.....	55
IŠVADOS.....	58
LITERATŪROS ŠALTINIAI.....	60
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DARBO TEMA SĄRAŠAS .....	70

Rimkevičius, Rokas. Šalutinių agro-produktų panaudojimo galimybės pieno rūgšties gamybai pritaikant fermentinę hidrolizę ir pieno rūgšties bakterijas. *Magistro Projektas/ vadovas* lekt. dr. Dalia Čižeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Biotechnologijos. Technologijos mokslai.

Reikšminiai žodžiai: fermentacija, pieno rūgštis, PRB.

Kaunas, 2017. 70 p.

### SANTRAUKA

Šio projekto tikslas buvo įvertinti šalutinių agro-produktų, tokių kaip kviečių šiaudų ir sėlenų panaudojimo galimybės L-pieno rūgšties gamyboje fermentacijos metu panaudojant naujai izoliuotas pienarūgščių bakterijų atmainas (PRB).

Šalutiniai agro-produktai buvo fermentuoti su *Lactobacillus* ir *Pediococcus* genties bakterijomis. Prieš fermentaciją buvo atlikta žaliavos hidrolizė fermentais – karbohidrazėmis. D/L-laktatų įvertinimui buvo panaudotas K-DLATE 07/14 (Megazyme Int. Ireland, Wicklow, Ireland) testas. Fermentinės hidrolizės efektyvumui įvertinti buvo panaudotos druskos, atitinkamomis koncentracijomis. 50 mg/L  $\text{CaCl}_2$  ir 100 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  druskų koncentracijos padidino hidrolizės efektyvumą, o NaCl druska - 50-175 mg/L ribose, efektyvumą sumažino. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterijų atmainos pagamino daugiausiai L-pieno rūgšties šiaudų terpėje. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI pagamino 94,4 g/kg. Sėlenų terpėje didžiausią kiekį pagamino *Lactobacillus sanfranciscensis* MW15 - 108,6 g/kg.

Tolimesnių tyrimų metu, po mikrobinės fermentacijos, spektrofotometriškai įvertintas bendras fenolinių junginių kiekis ir antioksidacinis aktyvumas (DPPH radikalo surišimo aktyvumas). Fermentuotoje šiaudų ir sėlenų terpėse didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo išmatuotas su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 ir *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI atitinkamai, 334 mg ir 231 mg (pagal Trolokso ekvivalentą 100g medžiagos). Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis išmatuotas su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI - 1187 mg (pagal Galo rūgšties ekvivalentą 100g žaliavos) šiaudų terpėje ir su *L. sanfranciscensis* MW15 - 766 mg (pagal Galo rūgšties ekvivalentą 100g žaliavos) sėlenų terpėje.

Rezultatai patvirtino, kad šalutiniai agro-produktai gali būti panaudoti L-pieno rūgšties gamybai su atitinkamais fermentais ir atrankiomis pieno rūgšties bakterijomis.

Rimkevičius, Rokas. The possibilities of bioconversion of agro-industrial by-products to lactic acid by applying enzymatic hydrolysis and lactic acid bacteria fermentation. Master's Project/ supervisor lect. dr. Dalia Čižeikienė; Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology.

Biotechnology. Technology sciences.

Keywords: fermentation, lactic acid, LAB.

Kaunas, 2017. 70 psl.

## SUMMARY

The aim of research was to investigate the usability of agro-industrial by-products, such as wheat bran and wheat straw in the production of L-lactic acid via fermentation applying by newly isolated lactic acid bacteria strains (LAB).

Agro-industrial by-products were fermented with LAB belonging to *Lactobacillus* and *Pediococcus* genera. Before fermentation enzymatic treatment of by-products was carried out using carbohydrases. An enzymatic test K-DLATE 07/14 (Megazyme Int. Ireland, Wicklow, Ireland) was used for lactic acid and D/L-lactates determination. The influence of magnesium, calcium and sodium salts on enzymatic hydrolysis efficiency was evaluated. The addition of 50 mg/L of CaCl<sub>2</sub>, 100 mg/L of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O in straw medium increased enzymatic hydrolysis efficiency, whereas the addition of NaCl in range 50-175 mg/L decreased cellulase activity. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains produced the highest amount of L-lactic acid in the wheat straw. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI - 94,4 g/kg. In wheat bran medium *Lactobacillus sanfranciscensis* MW15 produced the highest amount of L-lactic acid - 108,6 g/kg.

Furthermore, after microbial fermentation the total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of fermented wheat straw and wheat bran were determined spectrophotometrically. In wheat straw and wheat bran medium highest antioxidant activity was observed with *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI respectively, 334 mg and 231 mg of (Trolox equivalent per 100g) and highest total phenolic content was observed using *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI - 1187 mg (Gallic acid equivalent per 100g) in wheat straw and with *L. sanfranciscensis* MW15 - 766 mg (Gallic acid equivalent per 100g) in wheat bran.

The results confirm that tested agro-industrial by-products could be used for L-lactic acid production using selected enzymes and lactic acid bacteria strains.

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

PRB – pienrarūgštės bakterijos;

PDO – 1,3-propandiolis;

PPR – poli-pieno rūgštis;

PHA – polihidroksialkanoatas;

DNS – 3,5-dinitrosalicilo rūgštis;

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrihidrazilo radikalas;

TE – trolokso ekvivalentas;

GE – galo rūgšties ekvivalentas.



## ĮVADAS

Šiaudai ir sėlenos yra antrinis žemės ūkio kultūrų perdirbimo produktas. Lietuvoje gaunami didžiuliai šiaudų kiekiai, kurie yra panaudojami gyvulių pašarams, popieriaus gamyboje, o sėlenos – kaip maisto produktas.

Šiuo metu ypatingai didelis dėmesys skiriamas atsinaujinančios antrinės organinės žaliavos biokonversijai į pridėtinės vertės produktus. Jau yra sukurti procesų modeliai, kurių metu panaudojant tikslius katalizatorius - fermentus, organinę žaliavą sudarantys polimerai yra hidrolizuojami. Taip iš celiuliozės, hemiceliuliozės, lignino ir krakmolo yra gaunami laisvai prieinami sacharidai, kurie panaudojant mikrobinę fermentaciją su atrankiais mikroorganizmais yra konvertuojami į tikslius pridėtinės vertės produktus. Vienas plačiausiai gaminamų cheminių junginių fermentacijos proceso metu yra pieno rūgštis.

Tiriamo darbo metu dėmesys skirtas PRB gaminamos pieno rūgšties izomerų identifikacijai, bei jų susidarymui, fermentuojant įvairias šalutinių produktų terpes. Pasaulyje pieno rūgštis yra vienas plačiausiai paplitusių chemikalų, kuris naudojamas ne tik maisto ir gėrimų pramonėje, o taip pat suyrančių maisto produktų pakuočių (biopolimerų) gamybai. Pieno rūgštis gali būti gaminama cheminiu būdu iš naftos produktų arba biotechnologiniu. COST veiklos Ubiochem (KTU dalyvis) atlikti ekonominiai skaičiavimai patvirtino, kad pieno rūgšties gamyba naudojant homofermentinės PRB yra pigesnė ir ypač iš augalinės biomasės, negu vykdant cheminę sintezę iš vis labiau brangstančių naftos produktų. Kitas svarbus biotechnologinio poli-pieno rūgšties gamybos būdo privalumas, kad tik fermentacijos būdu galima gauti optiškai grynus izomerus (L- arba D-pieno rūgšties izomerus), sąlygojančius optimalias biopolimero savybes. Tik optiškai grynai L(+)- arba D(-) - pieno rūgšties izomerai gali polimerizuotis iki aukšto kristališkumo poli-pieno rūgšties, kuri yra tinkama prekybiniam panaudojimui. Tuo tarpu sintezės būdu, skirtingai nei biocheminiu, susidaro izomerų mišinys. Taikant PRB maisto tikslams, taip pat svarbu žinoti izomero tipą ir atrinkti L-pieno rūgštį gaminančias PRB, kurių poveikis žmogaus sveikatai yra priimtinas. Dėl to, pastaruoju metu biotechnologinis pieno rūgšties gamybos būdas yra pranašesnis ir sulaukė didelio susidomėjimo, ir kaip alternatyva aplinkos taršai mažinti (biomasių perdirbimas) ir dėl ribotų naftos produktų atsargų. Vienai iš pagrindinių mikroorganizmų grupių, naudojamų pieno rūgšties gamybai, priskirtinos PRB, o iš jų homofermentinės PRB, gali būti naudojamos pramoninei pieno rūgšties gamybai. Pigios žaliavos fermentacijai panaudojimas leistų padidinti šio chemikalo gamybos efektyvumą.

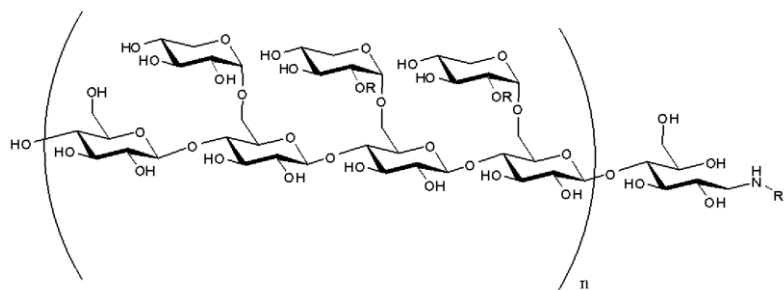
**Darbo tikslas:** ištirti atsinaujinančios organinės žaliavos – kviečių šiaudų ir sėlenų fermentinės hidrolizės optimalias sąlygas, jas parinkus vykdyti fermentaciją su atrankiomis pienarūgštėmis bakterijomis ir įvertinti pieno rūgšties izomerų susidarymą fermentacijos metu.

**Darbo uždaviniai:**

1. Parinkti fermentinius preparatus ir optimalias fermentinės hidrolizės sąlygas (temperatūrą, trukmę, fermento kiekį, druskų koncentraciją) kviečių šiaudų ir sėlenų organinei žaliai.
2. Nustatyti pienarūgščių bakterijų augimo galimybes fermentais apdorotoje organinėje žaliavoje, įvertinat jų skaičių, terpės pH ir monosacharidų pokyčius fermentacijos metu.
3. Nustatyti šiaudų ir sėlenų terpių, gautų po fermentinės hidrolizės, tinkamumą pieno rūgšties gamybai fermentacijos su pieno rūgšties bakterijomis metu.
4. Nustatyti sinergetinį PRB poveikį pieno rūgšties gamybai šiaudų ir sėlenų terpėse.
5. Įvertinti mikrobinės fermentacijos metu susidariusių produktų įtaką antioksidaciniam aktyvumui ir nustatyti bendrą fenolinių junginių kiekį.

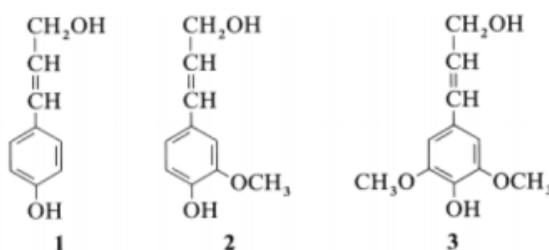


arabinoksilanai sudaryti iš pentozių: arabinozės ir ksilozės, gliukomananai sudaryti iš D-manozės ir D-gliukozės, o ksilogliukanai iš ksilozės ir gliukozės monomerų [9]. Hemiceliuliozės struktūra pavaizduota 1.2 paveiksle. Hemiceliuliozė yra augalų sienelių sudėtyje, ji suteikia struktūrinį tvirtumą, nes jungia celiuliozę į mikrofibriles ir jas skersinėmis jungtimis sujungia kartu su ligninu [10].



1.2 pav. Augaluose aptinkamos hemiceliuliozės schematinė reprezentacija [11]

Trečioji lignoceliuliozinės žaliavos sudedamoji dalis yra ligninas, tai amorfinis tridimensinis polimeras, sudarytas iš fenilpropano struktūrinių vienetų, dažniausiai aptinkami: p-kumarilo, koniferilo ir sinapilo alkoholiai (1.3 pav.) [9, 12].



1.3 pav. P-kumarilo, koniferilo ir sinapilo alkoholiai, kurie aptinkami lignino struktūroje [9]

Ligninas atlieka tarpląstelinę imobilizavimo funkciją, nes suriša individualias fibriles į bendrą matricą ir suteikia visapusišką tvirtumą ląstelių sienelėms. Celiuliozė, hemiceliuliozė ir ligninas yra nevienodai pasiskirstę ląstelių sienelėse. Šių komponentų struktūra ir kiekiai kinta atitinkamai pagal augalo rūšį, audinį bei augalo amžių [13, 14, 15].

Didžiausi lignoceliuliozinės žaliavos kiekiai susidaro šalutinio produkto forma žemės ūkio sektoriuje, o taip pat gaunami perdirbant grūdus. Pagrindinės lignoceliuliozinės atliekos yra miežių šiaudai, kviečių šiaudai, kukurūzų stiebai ar perdirbtos cukranendrių atliekos [16].

Tačiau didžiausią potencialą turi šiaudai. Remiantis statistiniais duomenimis, Lietuvoje užauginama 950 tūkst. ha javų, o gamybos potencialas siekia 4 mln. tonų. 15–20 %, šio kiekio lieka laukuose [17]. Lietuvoje perdirbant sėklinius augalus, susidaro didelis kiekis antrinių pašarų, pvz., grūdų sėlenos, aliejinių augalų sėklų išspaudos, cukrinių runkelių ar kukurūzų grūdų atliekos, melasa ir kt. [18]. Sėlenos gali būti kvietinės, ruginės, miežinės, avižinės, ir kt. Kadangi Lietuvoje

žemės ūkio veiklos metu susidaro dideli kiekiai lignoceliuliozinės žaliavos atliekų, galime teigti, jog yra potencialas ją perdirbti į pridėtinės vertės produktus.

### 1.1.1 Kviečių šiaudai

Šiaudai – tai lignoceliuliozinė žaliava, kuri gaunama kaip antrinis produktas žemės ūkio sektoriuje. Didžiausią dalį sudaro celiuliozė, hemiceliuliozė, ligninas. Tikslūs kiekiai sudarantys šiaudus kinta priklausomai nuo augalo rūšies ir yra pateikti 1.1 lentelėje [19].

**1.1 lentelė.** Šiaudus sudarančių medžiagų suvestinė [19,20]

<b>Sudedamoji dalis</b>	<b>Kiekis (%)</b>
Baltymai	3,6
Hemiceliuliozė	21–26
Celiuliozė	33,7–40
Ligninas	11–22,9
Pelenai	7–9,9
Kalcis	0,018
Fosforas	0,05

Didelė problema pasauliniu mastu yra šiaudų deginimas siekiant juos utilizuoti. Toks reiškinys sukelia ekologines problemas, nes didelis kiekis anglies dvideginio yra išmetamas į aplinką ir gali sukelti sveikatos problemų aplinkiniams gyventojams [20].

Šiaudai yra vertinga atsinaujinanti žaliava. Ji gali būti panaudojama kaip pašaras gyvuliams, išgaunant elektros energiją biokuro katilinėse ar šilumą gazifikacijos, degimo procesų metu. Vienos aktualiausių šiaudų pritaikymo galimybių yra etanolio gamyba mikrobinės fermentacijos metu, metano gamyba anaerobinėmis sąlygomis bei popieriaus gamyba [19]. Vis dar išlieka aktuali yra jų perdirbimo galimybių į vertingas chemines medžiagas, tokias kaip pieno rūgštis paieška.

### 1.1.2 Sėlenos

Sėlenos – grūdų perdirbimo produktas, malimo proceso metu atskirtos grūdų luobelės. Tai šalutinis miltų ir kruopų gamybos produktas. Sėlenas sudaro grūdo luobelės (perikarpio) ir aleurono sluoksnio dalelės. Jas sudaro daug vertingų medžiagų – baltymai (15 %), angliavandeniai (70 %) bei daug naudingų mineralų, tokių kaip kalcis (0,78 %) fosforas (0,56 %) ar geležis (0,015 %) ir kitų sudėtinių dalių kurios yra pateiktos 1.2 lentelėje [21].

**1.2 lentelė.** Sėlenas sudarančių medžiagų suvestinė [21]

<b>Sudedamoji dalis</b>	<b>Sudaroma dalis (%)</b>
Baltymai	15
Hemiceliuliozė	30
Celiuliozė	24,5
Krakkolas	9,8
Ligninas	5,6
Pelenai	5
Kalcis	0,78
Fosforas	0,56
Geležis	0,015

Angliavandeniai sudaro apie (70 %) sėlenų masės – hemiceliuliozė (30 %), celiuliozė (24 %), krakkolas (9,8 %) ir ligninas (5,6 %). Taip pat sudėtyje yra reikšmingas kiekis fenolinių rūgščių, tokių kaip ferulo bei p-kumaro [22].

Perdirbant grūdus susidaro dideli kiekiai sėlenų, dėl to, aktuali yra jų perdirbimo galimybių į vertingas chemines medžiagas paieška. Suskaičiuota, kad apie 100 mln. tonų yra laisvai prieinama Europos sąjungoje [23]. Grūdinių kultūrų pramonėje sėlenos sudaro 14–19 % nuo žaliavos, kurios gali būti panaudotos, kaip nebrangi žaliava atsinaujinančiai energijai ar vertingiems cheminiams junginiams gauti [21, 22].

### **1.2 Lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimas**

Viena svarbiausių užduočių biocheminės lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimo procese, yra struktūros suardymas, kurio metu siekiama celiuliozę padaryti kuo laisviau prieinamą fermentams. Tokiu būdu angliavandenių polimerai gali būti konvertuojami į fermentuojamus cukrus. Pirminis žaliavos apdorojimas yra pripažintas kaip daugiausiai išlaidų reikalaujantis etapas [9, 24, 25, 26].

Pirminio apdorojimo tikslas yra paveikti celiuliozę, hemiceliuliozę, kad (fermentinė) hidrolizė būtų kuo efektyvesnė. Tai atliekama suardžius kristalinę celiuliozės struktūrą arba pašalinus ligniną. Aktualiausi (fermentinės) hidrolizės vykdymo kriterijai: a) padidintas paviršiaus plotas ir poriškumas, b) lignino struktūros modifikavimas, c) dalinė hemiceliuliozės depolimerizacija, d) celiuliozės kristališkumo sumažinimas. Pasirenkant optimaliausią organinės žaliavos apdorojimo būdą yra įvertinama junginių degradacijos įtaka fermentinei hidrolizei ir fermentacijai, bei proceso ekonomiškumas [9, 27].

Žaliavos pirminio apdorojimo metodai yra skirstomi į mechaninius, cheminius, kompleksinius biologinius ir elektrinius, toliau aptariami plačiausiai naudojami metodai [9]. Lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimas skirstomas į tris pagrindines kategorijas: mechaninis, cheminis ir kompleksinis apdorojimai.

### 1.2.1 Mechaninis apdorojimas

Šiai kategorijai priklauso smulkinimas malimo būdu ir ardymas ultragarsu.

- Dalelių dydžio sumažinimas yra dažnai naudojamas, siekiant palengvinti žaliavos naudojimą ir padidinti medžiagos paviršiau plotą. Tai pasiekama malimo, karpymo ar trynimo metu. Smulkinimo etapas dažniausiai atliekamas prieš apdorojimo procesą, nes nuo to priklausys tolimesnių procesų efektyvumas. Mechaninį apdorojimą lemiantys faktoriai yra vykdymo kaštai ir įrangos nusidėvėjimas [9].
- Lignoceliuliozinės žaliavos suardymas ultragarsu yra ištirtas laboratoriniame lygyje, tai plačiai naudojama technologija, kurios pranašumas yra pastebimas vykdant fermentinę hidrolizę. Reakcijos greitis apdorojus žaliavą ultragarsu gali padidėti 200 % [28].

### 1.2.2 Cheminis apdorojimas

Šiai kategorijai priskiriamas apdorojimas karštu vandeniu, silpnomis rūgštimis, stipriomis rūgštimis ir bazėmis.

- Biomasės apdorojimas karštu vandeniu esant slėgiui, arba kitaip – hidroterminis apdorojimas, yra vykdomas aukštose temperatūrose, 15 min. 200–230 °C ir pasiekiamas 40–60 % biomasės ištirpimas. Daugiau nei 90 % hemiceliuliozės yra gaunama kaip cukrų monomerai, jeigu toliau reakcijos mišinys apdorojamas rūgštimi. Apdorojimo karštu vandeniu metu gali susidaryti acto rūgštis, kuri veikia kaip polisacharidų hidrolizės katalizatorius [29].
- Praskiestų rūgščių metodas yra efektyviausias ir plačiausiai naudojamas lignoceliuliozinei žaliavai apdoroti. Praskiesta rūgštis yra išpurškiama žaliavos paviršiuje ir inkubuojama 160–220 °C temperatūroje trumpą laiko tarpą. Reakcijos metu įvyksta hemiceliuliozės hidrolizė ir yra atpalaiduojami monomeriniai cukrūs ir tirpūs oligomerai iš ląstelių sienelių matricos. Šio metodo metu naudojamos organinės bei neorganinės rūgštys [30].
- Koncentruotosios rūgštys – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ir HCl yra naudojamos kaip labai patikimi agentai celiuliozės hidrolizei. Teigiami aspektai naudojant šį metodą yra žema temperatūra bei didelis monosacharidų kiekis. Pagrindinė neigiama pasekmė yra rūgštims būdingas koroziškumas [31].

- Šarmų panaudojimas žaliavos apdorojime yra atliekamas dėl jų savybės pašalinti ligniną. Taip pat šarminio apdorojimo metu yra pašalinami acetil grupės pakaitai, kurie lemia tolimesnio fermento efektyvumo sumažėjimą ir hemiceliuliozės bei celiuliozės paviršiaus pasiekiamumą [32].

### 1.2.3 Kompleksinis poveikis

Šiai kategorijai priskiriami apdorojimo garais, CO<sub>2</sub> ir skystu amoniaku aukštame slėgyje metodai:

- Apdorojimas garais aukštame slėgyje yra plačiai naudojamas procesas, nes lemia mažas cheminių medžiagų bei energijos sąnaudas. Mechanizmas pagrįstas biomasės poveikiu prisotintais garais aukštame slėgyje. Temperatūros gali siekti 160–260 °C [33, 34].
- Biomasė paveikiama skystu amoniaku aukštame slėgyje ir temperatūroje, praėjus kelioms sekundėms, slėgis sumažinamas. Procesas atliekamas 90 °C, 30 min., jo metu sumažinami lignino, hemiceliuliozės kiekiai, dekristalizuojama celiuliozė [35].
- Apdorojimas CO<sub>2</sub> aukštame slėgyje yra vykdomas biomasę paveikiant CO<sub>2</sub> dujomis, kurios reaguoja su ištirpusiu anglies dvideginiu vandenyje ir tokiu būdu pagerinama hidrolizė [36].

### 1.2.4 Fermentinė hidrolizė

Žaliavos pirminis apdorojimas pripažintas kaip būtinas technologinis etapas prieš tolimesnius biomasės apdorojimo procesus [37, 38]. Toliau žaliava yra apdorojama fermentais, kurie hidrolizuoja biomasės polimerus į fermentuojamus cukrus [39]. Fermentas yra atsakingas už bendrą celiuliozės skaidymo proceso reguliavimą. Svarbus hidrolizės greitį ribojantis veiksnys yra fermentų nesuderinamumas ir vieni gali slopinti kitus, bet tokio reiškinio pavyksta išvengti, nes celiuliozės fermentinės hidrolizės kinetika yra išsamiai ištirta [2].

Celiuliozę skaidantys fermentai, pagal veikimo pobūdį ir vietą, skirstomi į endofermentus – veikiantys polimerinio substrato cheminę ryšį, jie skaido molekules į fragmentus, egzofermentus – veikiančius substrato molekulės galines grupes ir fermentus, kurie skaido fragmentus iki gliukozės [40].

Siekiant gauti kuo didesnę degradacijos laipsnį yra pasitelkiami keturi celiulaziniai fermentai, dėl jų sinergetinio poveikio: endogliukanazės (EC 3.2.1.4), celobiohidrolazės (EC 3.2.1.176), egzogliukohidrolazės (EC 3.2.1.74) ir β-gliukozidazės (EC 3.2.1.21) [27, 28]. Be sinergizmo svarbu pažymėti, jog prieš vykdant hidrolizę būtina celiulazių adsorbcija ant turimo netirpaus substrato [41].



Celobiohidrolazė yra pagrindinis celiuliozei skaidyti naudojamas fermentas. Fermento katalitinė dalis sudaryta iš vijų, kurios sukuria tunelio formos veiklųjį regioną ir celiuliozės grandinėms juo skverbiantis, tam tikrais laiko tarpais yra atskeliamas celobiozilradikalas [2].

Endogliukanazės veikia atsitiktinius gliukozidinius ryšius mažo kristališkumo celiuliozės fibrilių regionuose, atlaisvindamos oligosacharidus. Celobiohidrolazės degraduoja celiuliozę, pašalindamos celobiozę, veiklios kristaliniame celiuliozės regione, kur paveikia redukuojančias ir neredukuojančias gliukozės grandines. Egzogliukohidrolazės yra atsakingos už gliukozės vienetų pašalinimą nuo neredukuojančių ciklodekstrinų galūnių, o  $\beta$ -gliukozidazės hidrolizuoja celobiozę į gliukozę bei pašalina gliukozę nuo neredukuojančių mažų ciklodekstrinų galų [41, 42].

Hemiceliuliozės hidrolizei yra naudojama sudėtingesnė grupė fermentų, vadinamų hemiceliulazėmis. Ksilano fermentinei hidrolizei, reikalingi endo- $\beta$ -1,4-ksilanazė (EC 3.2.1.8), kuri veikia atsitiktinius ksilano ryšius, ko pasekoje gaunami ksilo-oligosacharidai,  $\beta$ -ksilozidazė (EC 3.2.1.37), kuri veikia neredukuojančias ksilozės grandinių galus ir atpalaiduoja ksilozę ir kiti papildomi fermentai  $\alpha$ -L-arabinofuranozidazė (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -galaktozidazė (EC 3.2.1.22), acetilksilano esterazė (EC 3.1.1.72) bei ferulio rūgšties esterazė (EC 3.1.1.73) [41, 43].

Perdirbant krakmolingą žaliavą yra įvertinama, tai, jog celiulazės yra 100 kartų mažiau efektyvios negu amilazės. Kadangi krakmolą yra sudarytas iš amilozės -  $\alpha$ -1,4 glikozidiniais ryšiais sujungtų gliukozės vienetų ir amilopektino  $\alpha$ -1,4 ir  $\alpha$ -1,6 glikozidiniais ryšiais sujungtų gliukozės vienetų [44], tai norint pasiekti efektyvią fermentinę hidrolizę, reikia  $\alpha$ -amilazių ir gliukoamilazių fermentų komplekso.  $\alpha$ -amilazės hidrolizuoja vidinius amilozės  $\alpha$ -1,4 ryšius, o amilopektino ryšius – atsitiktinai. Tokiu būdu suformuojamos trumpos polimerinės 10–20 gliukozės vienetų grandinės, maltozės bei laisvos gliukozės monomerai [45]. Gliukoamilazės hidrolizuoja 1,4- ryšiais sujungtus  $\alpha$ -D-gliukopiranozilo vienetus, suformuojant  $\beta$ -D-gliukozę [46].

### **1.3 Vertingų cheminių medžiagų gamyba iš atsinaujinančių šaltinių**

#### **1.3.1 Pridėtinės vertės produktai**

Ankstesniuose skyriuose aptartos atsinaujinančios lignoceliuliozinės ir krakmolingos žaliavos ypatybės ir jų apdorojimas prieš biokonversiją. Organinės žaliavos biokonversija galėtų būti išskirta į du tipus. Pirmasis, kuomet panaudojant apdorotą žaliavą ir biotechnologines žinias – tai yra įvairius ekonomiškos fermentacijos kelius [1, 47, 48], galima išgauti apie 30 potencialių monomerų. Svarbu paminėti, jog dauguma susintetintų medžiagų yra gaunama iš sacharidų, todėl, jų dydis siekia iki 6 anglies atomų. Jie toliau gali būti panaudojami kaip struktūriniai vienetai sudėtingų cheminių medžiagų gamybai. Antrasis – pasinaudoti žiniomis apie specifinius metabolizmo kelius ir tokiu būdu žaliavą konvertuoti į vidutinio sudėtingumo medžiagas.

Pagrindiniai pridėtinės vertės produktai, išgaunami vykdant organinės žaliavos biokonversiją, yra aptariami 1.3 lentelėje [1, 47, 48].

**1.3 lentelė.** Pridėtinės vertės produktai gaunami iš atsinaujinančios augalinės žaliavos (adaptuota pagal [1])

<b>Medžiagos pavadinimas</b>	<b>Molekulinė formulė</b>	<b>Panaudojimas</b>
1,4-dirūgštys (sukcino, fumaro, malo)	$C_4H_6O_4$	Tirpiklių gamyba
2,5-furano dikarboksilinė rūgštis	$C_6H_6O_3$	Polietilentereftelatatų (PET) analogas su pagerintomis savybėmis (buteliukai, konteineriai)
3-hidroksipropioninė rūgštis	$C_3H_6O_3$	Kontaktiniai lešiai, absorbuojantys polimerai
Pieno rūgštis	$C_3H_6O_3$	Pieno produktai, alkoholinių gėrimų gamyba, detergentai
Asparto rūgštis	$C_4H_7NO_4$	Chelatinės druskos, saldikliai
Gliukaro rūgštis	$C_6H_{10}O_8$	Tirpikliai, neilono gaminiai
Glutamo rūgštis	$C_5H_9NO_4$	Monomerai poliesteriams ir poliamidams
Itakono rūgštis	$C_5H_6O_4$	Įeina stireno butadieno polimerų sudėtį (pagerina dažų sukibimą), nitrilo lateksas
Levulino rūgštis	$C_5H_8O_3$	Tirpikliai, polikarbonatų sintezė
3-hidroksi sviesto lactonas	$C_4H_6O_3$	Aukštos pridėtinės vertės farmacinių medžiagų gamyba
Glicerolis	$C_3H_8O_3$	Burnos higienos produktai, vaistų gamyba, maisto pramonė, poliolių gamyba
Sorbitolis	$C_6H_{14}O_6$	Aušinimo skysčio gamyba, polimerų gamyba
Ksililitolis/Arabitolis	$C_5H_{12}O_5$	Saldikliai, nesočios poliesterių dervos

Vieni pirmųjų komerciškai sukurtų rinkoje prieinamų bioproduktų buvo bioplastikai. Šie plastikai turi didžiulį potencialą selektyviose rinkose, dėl galimybės savaime suirti gamtoje.

Vieni pagrindinių:

- 1,3-propandiolis (PDO) – tai polimeras gaunamas fermentuojant kukurūzų cukrus, biotechnologinių procesų metu. Daugiau nei dvylika produktų yra gaunami iš PDO, Zemea® [49] propandiolis naudojamas kosmetikoje, namų apyvokos valymo produktų gamybai, pasižymi švarumu.
- Polipieno rūgštis (PPR) – tai polimeras pasižymintis dideliu potencialu dėl savo pigumo ir prieinamumo. Šiuo metu didžiausias polipieno rūgšties dalyvis rinkoje Ingeo® [50]. PLA

yra panaudojamas pakeičiant tradicinius plastikus, nes turi ypatingas ekologines charakteristikas.

- Polihidroksialkanoatas (PHA) – komerciškai patrauklus poliesteris pasižymintis savaiminio degradavimo savybėmis. PHA taip pat pasižymi terminiu atsparumu ir dėl to turi daugelį pritaikymo sričių, tokių kaip tvirtinimo juostų, pluoštų bei kietų putų gamyboje. Pagrindiniai gamintojai – Metabolix ir SyntheZyme. Šio plastiko kasmetinis potencialas siekia 4,72 mlrd. eurų [51, 52].

### 1.3.2 Pieno rūgštis ir jos gamyba

Pieno rūgštis buvo atrasta C.W. Scheele 1780 metais suraugintame piene, o pramoniniu mastu pradėta gaminti 1881 metais, fermentacijos būdu. Šiuo metu pasaulinis pieno rūgšties gamybos kiekis siekia 328,9 tūkst. metrinių tonų per metus (Global Industry Analysts, Inc.). Susidomėjimą pieno rūgštimi lėmė daugelis aspektų, tarp kurių yra gaunama didelė pridėtinė vertė, produkto patekimas į GRAS (angl. Generally Recognized As Safe) produktų kategoriją, gamyboje gali būti panaudojama daugelis žaliavų, kurios yra gaunamos kaip atliekos žemės ūkio srityje [53].

Pieno rūgšties gamyba apima didelę dalį chemijos pramonės rinkos, tam įtakos turi jos panaudojimas smulkių (polipropileno-glikolio) ir stambių (akrilo) polimerų gamyboje. Tai savaime aplinkoje degraduojantys polimerai, kurie yra panaudojami produktų pakavime ir žymėjime bei vaistų dozavimo technikos kurime. Viena iš jų yra poliglikolio rūgštis (Polipieno rūgštis) [53, 54].

Kosmetikos industrijoje, pieno rūgštis yra naudojama higienos bei estetinių produktų kūrimo, dėl savo drėkinančio, antimikrobinio ir atnaujinančio poveikio odai bei burnos higienos produktams, suteikimo. Pieno rūgšties esterio dariniai plačiai naudojami dėl savo higroskopiškumo bei emulsijas sudarančio poveikio [55].

Vidutiniškai 70 % pagamintos pieno rūgšties yra sunaudojama maisto pramonėje jogurto bei sūrio gamyboje. Jogurtų paruošimo eigoje, pieno rūgštis gaunama po ko-fermentacijos veikiant *Streptococcus thermophilus* ir *Lactobacillus bulgaricus* bakterijoms. Sūrio gamyboje pH kritimas dėl išsiskiriančios rūgšties, lemia kazeino micelių agregaciją. Kartais pieno rūgšties susidarymas yra spontaniškas, pvz., šlapio kukurūzų apdirbimo metu terpėje esančių mikroorganizmų pagamintą rūgštis sumažina patogeninių bakterijų augimą bei suteikia savitą skonį, aromatą [55, 56].

### 1.3.3 Pieno rūgšties fiziko-cheminės savybės

Pieno rūgštis, pagal IUPAC 2-hidroksipropano rūgštis, yra organinė rūgštis, plačiai aptinkama gamtoje. Tai paprasčiausia 2-hidroksikarboksilinė rūgštis su chiraliniu anglies atomu ir egzistuojanti kaip dvi enantiomerų formos – izomeras L(+) ir izomeras D(-) (1.4 pav.).

Cheminis aktyvumas yra nusakomas rūgšties fiziko-cheminėmis savybėmis, tokiomis kaip: a) rūgštingumas vandeniniuose tirpaluose; b) reaktyvumas susijęs su karboksilinės bei hidroksilinės grupės buvimu, tai lemia dvipusišką reakingumą; c) Antrojo anglies atomo optinio aktyvumo asimetriškumą [9, 53].

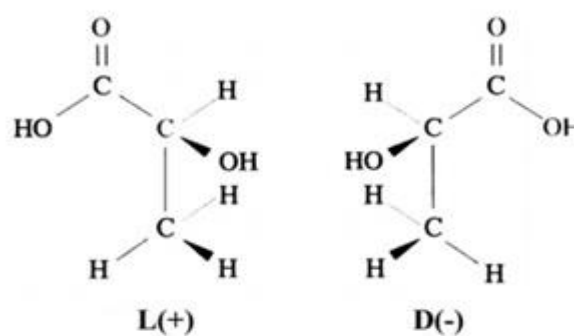
Norint pasiekti didžiausią pieno rūgšties gamybos išeią, panaudojant mikroorganizmus, reikia pieno rūgšties bakterijas (PRB) auginti atitinkamoje terpėje, kurioje būtų užtikrinamas maisto medžiagų (anglies, azoto, vitaminų ir mineralų) prieinamumas lengviausiai prieinamoje formoje [53, 57].

Anglis mikroorganizmų terpėje gali egzistuoti cukrų, amino rūgščių ar organinių rūgščių formose. Azotas, kuris dalyvauja katabolitiniuose ir anabolitiniuose procesuose, yra prieinamas amino rūgščių, peptidų ir neorganinių junginių formose. Mineralinės medžiagos (Mg, Fe), pateikiamos druskų pavidalu, be to vitaminai yra svarbūs elementai, kurie atlieka ko-faktorių funkciją daugelio fermentinių reakcijų metu [53, 58].

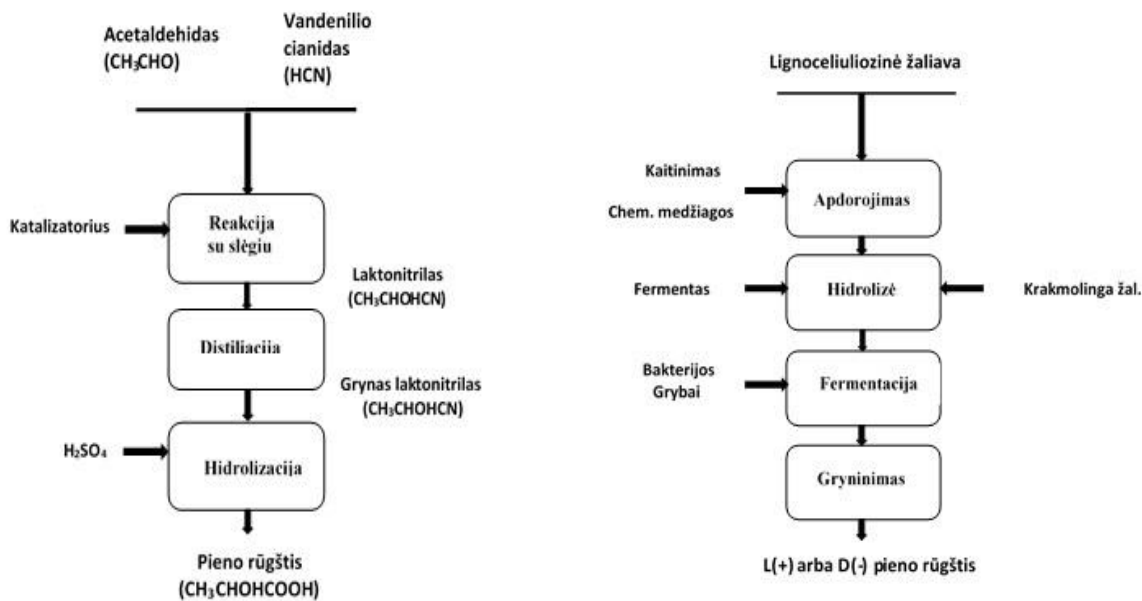
Pieno rūgšties gamyba galima dviem būdais: a) vykdant cheminę sintezę ir b) mikrobinės fermentacijos pagalba panaudojant įvairius anglies šaltinius.

Lignoceliuliozinė biomasė ir krakmolinga žaliava prieš naudojimą turi būti atitinkamai apdorojama, kad būtų suardytos stiprios jungtys tarp krakmolo, celiuliozės, hemiceliuliozės bei lignino [58]. Tuomet gauti cukrūs gali būti toliau fermentuojami su atrinktais mikroorganizmais į atitinkamos konformacijos L(+) ar D(-) pieno rūgštį. Cukrinimas ir fermentacija gali būti atliekama vienu metu, tokiu būdu fermentinė hidrolizė ir fermentacijos procesai yra atliekami toje pačioje terpėje [58, 59].

Optiškai gryna L(+) ar D(-) pieno rūgštis gaunama panaudojant atitinkamai parinktus mikroorganizmus. Raceminė DL- pieno rūgštis yra visa laiką gaunama cheminės sintezės metu iš naftos produktų (1.5 pav.) [60]. Pieno rūgšties gamybos metu neišvengiamas reiškinys, kuomet homopolimerai formuoja reguliarias struktūras ir sudaro kristalinę fazę, o ko-polimerizacija su L(+) ar D(-) pieno rūgštimi inhibuoja reguliarių struktūrų ir amorfinių medžiagų susidarymą. Norint pasiekti norimas polimero savybes, reikalingi aukšto švarumo lygio L(+) ar D(-) pieno rūgšties monomerai [60].



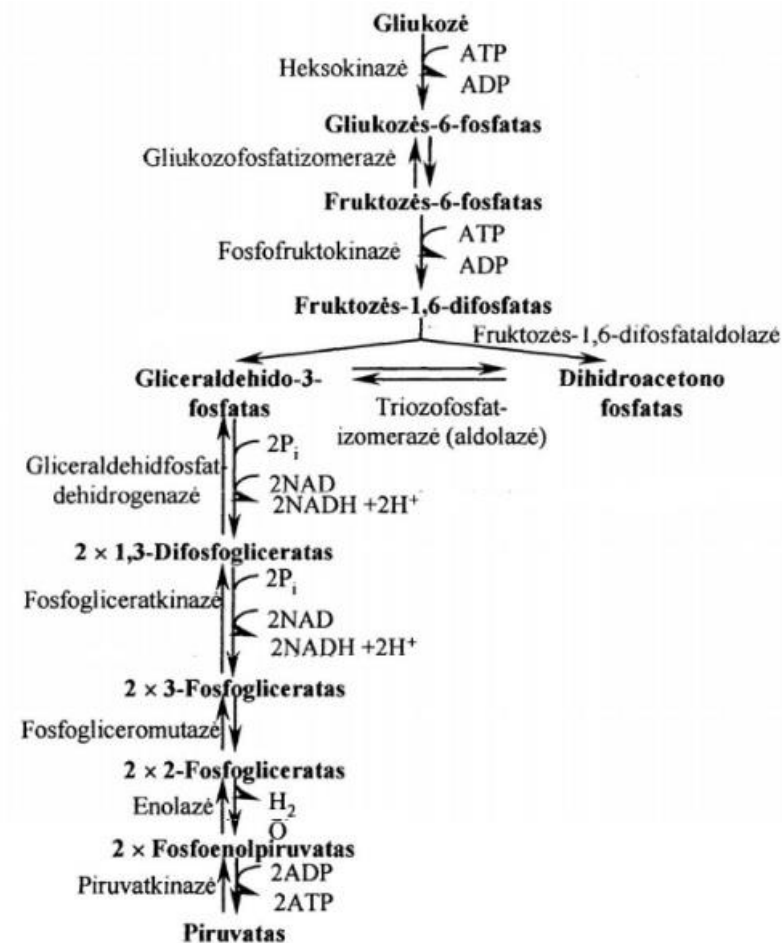
**1.4 pav.** L(+) is D(-) pieno rūgšties izomerų struktūra (adaptuota pagal [53])



**1.5 pav.** Pieno rūgšties gamybos cheminės sintezės (kairėje) ir mikrobinės fermentacijos (dešinėje) būdai (adaptuota pagal [58])

Daugiau nei 100 skirtingų pienarūgščių bakterijų ar grybų jau išbandyta mikrobinės pieno rūgšties gamyboje iš atsinaujinančių gamtinių žaliavų. Tačiau, dažniausiai yra naudojamos *Lactobacillus* ir *Lactococcus* rūšies bakterijos [58]. Visgi paieška naujų mikroorganizmų galinčių gaminti didelius L-pieno rūgšties kiekius yra būtina, kad padidinti šio chemikalo išėigas.

Esant sąlygai, kad yra prieinamas gliukozės šaltinis bei limituotam deguonies kiekiui, homofermentinė PRB, pvz. *Lc. lactis*, *Lb. delbruecki*, ir *Lb. helveticus* gali vieną molį gliukozės Embden-Meyerhof-Parnas keliu konvertuoti į du molius piruvato (1.6 pav.). Heterofermentacijos metu, tam tikri mikroorganizmai cukrus metabolizuoja pentozės-fosfato keliu. Pvz., *Lb. brevis* yra heterofermentinė pieno rūgšties bakterija, kuri gamina pieno rūgštį, anglies dioksidą bei etanolį iš heksozių. *Lb. sanfrancisco* yra kita heterofermentinė PRB kuri konvertuoja gliukozę į gliceraldehido-fosfatą, o toliau į pieno ir acto rūgštį, katalizuojant acetil-fosfatą [58, 61, 62].



1.6 pav. Metabolizmo EMP būdu schema (adaptuota pagal [62])

Įvertinus sacharidų konversijos į pieno rūgštį būdus, galime teigti, kad mikrobinės fermentacijos paprastumas, organinio substrato žaliavos prieinamumas ir panaudojamų mikroorganizmų įvairovė lemia šio proceso platesnį pritaikymą, lyginant su chemine sinteze. Kitame skyriuje aptariami mikroorganizmai, naudojami mikrobinės fermentacijos procesų metu.

#### 1.4 Pienarūgštės bakterijos

Pienarūgštės bakterijos (PRB) sąvoka buvo pripažinta 20 a. pradžioje [63]. Anksčiau naudoti pavadinimai tokie kaip – pieną rauginančios bakterijos bei pieno rūgštį gaminančios bakterijos. 1919 metais Orla-Jensen paskelbta publikacija apie PRB užbaigė anksčiau kildavusius sistematikos klausimus. PRB klasifikacija buvo pagrįsta morfologija, gliukozės fermentacijos modeliu, augimo tam tikrose temperatūrose bei cukraus fermentavimu. Nors taksonomija buvo patobulinta, fundamentalūs skirstymo principai, įtvirtinti Orla-Jensen, yra išlikę iki dabar. Jie bus aptariami kitame skyriuje [55].

### 1.4.1 Pienarūgščių bakterijų fiziologija ir morfologija

Pienarūgštės bakterijos yra sudarytos iš grupės bakterijų, kurios pasižymi tam tikromis morfologinėmis, metabolinėmis bei fiziologinėmis savybėmis bei yra panašios filogenetiškai. Gramo reakcija bei pieno rūgšties gamyba iš įvairių fermentuojamų angliavandenių yra pagrindiniai kriterijai PRB taksonomijai. Bakterijų klasifikacija į atitinkamas eiles yra grindžiama jų morfologija (kokai, lazdelės), gliukozės fermentacijos metodu (homo-, heterofermentinis), atsparumo skirtingoms temperatūroms, gaminamos pieno rūgšties konfigūracijos (L(+) ar D(-) arba jų mišinį), galimybėmis augti didelėse druskos koncentracijose bei tolerancija rūgštinei, šarminėi augimo terpei [64]. Pagrindinis bakterijų, patenkančių į šią grupę, apibūdinimas yra gram-teigiamos, nesporinės lazdelės ar kokai, kurios, angliavandenių fermentacijos metu, pagamina pieno rūgštį, kaip pagrindinį produktą. Priimta, kad yra pagrindinės keturios PRB gentys - *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ir *Streptococcus*. Naujausi taksonomijos pakeitimai leido jau esantį sąrašą papildyti šiomis – *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, ir *Weissella* bakterijų gentimis [65].

Bakterijų fiziologija tapo labai svarbia mikroorganizmų mokslinių tyrimų dalimi, ypač tuomet, kai įvertinta pienarūgščių bakterijų svarba maisto bei pašarų rūgštinimo procesuose. Žinios apie bakterijų fiziologiją, pvz., metabolizmą ir maistingų medžiagų utilizaciją, suteikė galimybę jas panaudoti labiau kontroliuojamuose procesuose. Pienarūgštės bakterijos turi gana „paprastą“ metabolizmą, kurio metu gaunamas vienas ar keletas tikslinių produktų, manoma, kad tai yra griežtų sąlygų laikymosi pasekmė jas auginant laboratorijose [66].

### 1.4.2 Pienarūgščių bakterijų metabolizmas

Pienarūgštės bakterijos yra chemotrofiniai organizmai, visa energiją, reikalingą metabolizmui vykdyti gauna iš cheminių junginių oksidacijos. Yra du pagrindiniai energijos gavimo iš cukrų asimiliacijos keliai – homofermentinis ir heterofermentinis [55].

Homofermentinės bakterijos transformuoja beveik visus cukrus į pieno rūgštį. Homofermentinė reakcija susideda iš dviejų etapų. Pirmuoju etapu vykdoma glikolizė arba Embden – Meyerhof – Parnas reakcija, gliukozė yra transformuojama į piruvo rūgštį, antruoju etapu ji redukuojama iki pieno rūgšties, NADH elektronų pernašos pagalba. Tokiu būdu pieno rūgštis yra gaunama kaip tikslinis produktas tiesiogiai iš gliukozės. Procesas apibūdinamas supaprastinta lygtimi:



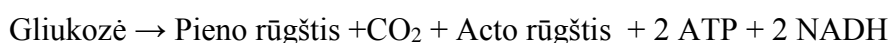
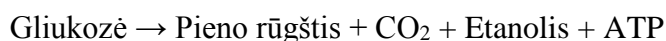
Mikroorganizmai kurie naudoja šį kelią angliavandenių suvartojimui, yra vadinami obligatiniais homofermentiniais organizmais. Juos sudaro *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* ir *Lactobacillus salivarius* (1.4 lent.) [53, 67].

**1.4 lentelė.** Plačiausiai naudojamos bakterijos pieno rūgšties gamyboje (adaptuota pagal [53])

Mikroorganizmas	Fermentacijos būdas	Substratas
<i>Bacillus sp.</i>	Homofermentinis	Cukranendrių atliekos
<i>Enterococcus faecalis</i>	Homofermentinis	Cukranendrių melasa
<i>Escherichia coli</i> (genetiškai modifikuota)	Homofermentinis	Gliukozė, melasa
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	Homofermentinis	Krakmolai
<i>L. amylovorus</i>	Homofermentinis	Krakmolai
<i>L. casei subsp. rhamnosus</i>	Heterofermentinis	Gliukozė, melasa
<i>L. coyneformis subsp. torquens</i>	Homofermentinis	Celiuliozė
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Homofermentinis	Laktozė, sūrio išrūgos ir permeatas
<i>L. helveticus</i>	Homofermentinis	Laktozė, sūrio išrūgos ir permeatas
<i>Lactococcus lactis</i>	Homofermentinis	Gliukozė, ksilozė

Homofermentinio proceso metu teoriškai turėtų būti gaunama 2 moliai pieno rūgšties iš kiekvieno molio suvartotos gliukozės su teoretiniu 1 g produkto iš 1 g substrato, tačiau eksperimentiniai rezultatai gaunami mažesni (0,74–0,99 g/g), nes dalis anglies šaltinio yra sunaudojama biomasės augimui (0,07–0,22 g/g) [53, 67].

Heterofermentinis procesas yra charakterizuojamas produktų, tokių kaip CO<sub>2</sub>, etanolis ir/arba acto rūgštis susidarymu ir tiksliniu produktu – pieno rūgštimi. Pirmasis gliukozės degradacijos etapas yra vadinamas pentozės fosfato keliu ir jo metu susidaro gliceraldehido 3-fosfatas, acetil-fosfatas ir CO<sub>2</sub>. Gliceraldehidas yra transformuojamas į pieno rūgštį glikolizės keliu, o acetilfosfatas yra konvertuojamas į acto rūgštį ir/arba etanolį pagal supaprastintas lygtis [53, 67]:



Ryšys tarp acto rūgšties ir etanolio gamybos, kuris sumažina teoretinę išeigą iki 0,50 g/g, priklauso nuo mikroorganizmo gebėjimo reoksiduoti NADH, sugeneruotą ankstesniuose proceso



etapuose. Mikroorganizmai kurie naudoja šį metabolinį kelią vadinami obligatiniais heterofermentiniais organizmais, pagrindiniai jų: *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. parabuchneri* ir *L. reuteri* [53].

### 1.4.3 Pienarūgščių bakterijų genetika

Šiuo metu yra žinoma daugiau nei 19 visiškai ištirtų streptokokų genomo sekų, kurios apima pagrindinių *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ir *Streptococcus* bakterijų atmainų genomus. 2002 metais buvo įkurta programa, kurios tikslas plataus masto PRB bakterijų genomų sekvenavimas (Lactic Acid Bacteria Genome Sequencing Consortium). *Lactobacillales* šeimos bakterijos turi mažus genomus, kurių ilgis siekia nuo ~1,600 iki ~3,000 genų. Tokia genų variacija įrodo, jog pienarūgščių bakterijų evoliucijos eiga įtakojo genų praradimą, dublikaciją bei naujų genų atsiradimą [55].

Pienarūgščių bakterijų identifikacijai pasitelkiami fenotipiniai metodai. Šiuo metu vis plačiau naudojami genetininiai tyrimai, pvz., 16S rDNR sekvenavimo metodas. Šio metodo pagalba galima tiksliau ir greičiau identifikuoti turimas individualias atmainas. Trumpų 16S rDNR sekų nustatymas naudojamas siekiant lengvai aptikti rūšis, turint pienarūgščių bakterijų izoliatus [68].

### 1.5 Fenoliniai junginiai ir oksidacinis stresas

Yra žinoma, kad po organinės žaliavos fermentacijos yra aptinkamas didesnis fenolinių junginių kiekis ir antioksidacinio aktyvumo padidėjimas. Fermentacijos metu, skirtingi fermentai yra išskiriami iš kieto substrato ir tuo pat metu utilizuojami išskiriant fenolinius junginius [69].

Fenolinės rūgštys yra vienos labiausiai paplitusių metabolitų jvų augaluose ir pasižymi teigiamomis antioksidacinėmis savybėmis [70, 71, 72]. Dauguma funkcinių komponentų, tokių kaip vitaminai, mineralai ir fenoliai yra lokalizuoti jvų sėlenose. Dėl šios ypatybės sėlenos yra tinkama žaliava fenoliniams junginiams išskirti [73].

Epidemiologinių tyrimų metu buvo įrodyta, kad jvų produktų naudojimas, kuriuose gausu antioksidantų, apsaugo nuo chroniškų ligų, diabeto, viršsvorio ar vėžio [74, 75]. Šie apsaugantys faktoriai pasireiškia esant svarbiems cheminiams junginiams, vieni iš jų: polifenoliai, dietinė ląsteliena, baltymai, lipidai ir t.t. [74, 76]. Šie junginiai dalyvauja laisvų radikalų susidarymo inhibicijoje. Antioksidantai yra skirstomi į sintetinius ir natūralius. Sintetiniai antioksidantai yra plačiai naudojami, nes jie yra pigesni už natūralūs. Tačiau daug dėmesio skiriama ir natūraliems antioksidantams dėl jų savybės stabdyti lipidų peroksidaciją ir taip apsaugoti žmogaus organizmą nuo laisvų radikalų poveikio [74, 77-82].

## 2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

### 2.1 Tyrimo objektai

#### 2.1.1 Fermentiniai preparatai

Celustar XL bei Viscoferm yra stabilios formos hemiceliuliozės/celiuliozės skaldyme dalyvaujančių fermentų, kurie yra aktyvūs plačiose pH (3,5–7,5) ir temperatūros 35°C–60°C ribose, mišinys. Fermentų preparato tankis yra 1,15–1,25. Pagrindiniai fermentai esantys mišinyje yra: ksilanazės, celiulazės ir beta-gliukanazės, tačiau gamintojo teigimu yra papildomų, tokių kaip: pektinazės, amilazės, proteazės ir kt.

AlphaStar PLUS stabilios formos krakmolą skaldančių fermentų – amilazių mišinys, kuris yra aktyvus plačiose pH (5,8–7,5) ir temperatūros 30–45°C ribose. Šis fermentinis preparatas naudotas katalizuoti krakmolo, esančio sėlenų biomasėje, hidrolizę, tam, kad padidinti fermentuojamų sacharidų kiekį.

#### 2.1.2 Organinė žaliava

Tyrimo objektas – atrinkta sausa kviečių šiaudų ir sėlenų žaliava, kuri buvo susmulkinta iki 0,5–1,0 mm dalelių dydžio ir saugota tamsioje, vėsioje vietoje.

#### 2.1.3 Pienarūgštės bakterijos

Tyrimams atlikti, buvo pasirinkta 19 pienarūgščių bakterijų, kurių optimalios augimo temperatūros 25 °C – *Lactobacillus sanfranciscensis* MR29, *Lactobacillus rossiae* GL14, H10, H2, *Lactobacillus crustorum* W19, *Lactobacillus sanfranciscensis* MW15; 30 °C – *Lactobacillus casei* DSM 20011, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DSM 20244, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC-53103, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU05-10, *Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8, *Pediococcus pentosaceus* KTU05-9; 37 °C – *Lactobacillus helveticus* DSM 20075, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, *Lactobacillus acidophilus* ATCC-53103. PRB saugomos kultūrų kolekcijoje, Kauno Technologijos Universitete, Maisto mokslo ir technologijos katedroje, – -80 °C temperatūroje (Šaldiklis, Angelantoni Life Science, Platilab 110, Italija).

Be to, sudaryti ir tyrimuose naudoti atrankiųjų pienarūgščių bakterijų mišiniai. Mišinį I sudarė – *L. sanfranciscensis* MW15, *L. crustorum* W19 bei *L. sanfranciscensis* MR29; mišinį II – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI; mišinį III – *L. crustorum* W19 bei *L. sanfranciscensis* MR29 padermės.

## 2.2 Tyrimo metodai

### 2.2.1 Celiulazių aktyvumo nustatymas

**Metodo esmė.** Fermento aktyvumui nustatyti naudotas metodas panaudojant DNS (3,5-dinitrosalicilo rūgštis) reagentą. Veikiant celiulazei, celiuliozė yra degraduojama iki  $\beta$ -gliukozės ar trumpesnių polisacharidų ir oligosacharidų, kurie esant 3,5-dinitrosalicilo rūgščiai, šarminėje aplinkoje sudaro spalvotus junginius [83, 84]. Fermento aktyvumo vienetas išreikštas fermento kiekiu, reikalingu išskirti 1  $\mu$ mol gliukozės ekvivalento iš celiuliozės filtro popieriaus per 1 min 50 °C temperatūroje esant pH 4,8 vertei.

#### Naudotos medžiagos.

1. Citrinos rūgštis (Reachem, Slovakija);
2. 3,5-dinitrosalicilo rūgštis (Aldrich, Indija);
3. Gliukozės tirpalas 1 mg/ml (Eurochemicals, Slovakija);
4. Substratas. Filtro popierius „Watman“ sukarpytas į 1,0 x 6,0 cm<sup>2</sup> juosteles;
5. Viscoferm ir Celustar XL fermentiniai preparatai (Dyadic International, JAV).

**Tyrimo eiga.** Reakcijos mišinys, sudarytas iš celiuliozės filtro popieriaus (1x6 cm<sup>2</sup>, ~50 mg) ir 0,9 ml citratinio buferio (0,05 M, pH 4,8), inkubuotas 5 min 50 °C temperatūroje. Reakcijos mišinys papildytas 0,1 ml tiriamu fermentiniu preparatu ir išlaikytas 1 val. 50 °C temperatūroje. Reakcijos mišinyje nustatytas redukuojančių sacharidų kiekis, tam ekvivalentiškai tirpalo ir DNS reagento kiekiai (po 0,5 ml) sumaišyti ir kaitinti 5 minutes 100 °C temperatūros vandens vonelėje (Memmert WNB7, Vokietija). Po kaitinimo mėgintuvėliai atvėsinti iki kambario temperatūros. Mėgintuvėlių turinys praskiestas distiliuotu vandeniu santykiu 1:10. Iš karto spektrofotometru (Genesys 10, Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Vokietija) išmatuojama 540 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Fermentų aktyvumui apskaičiuoti sudaryta sugertiems tiriamais tirpalais verčių priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos tirpale. Standartinei tiesei sudaryti buvo paruošti gliukozės tirpalai, kuriuose buvo atitinkamai 0,28; 0,56; 1,11; 1,67; 2,22; 2,78; 5,55  $\mu$ mol/ml gliukozės ir išmatuota 540 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis šiais tirpalais. Fermentų aktyvumas mililitre fermento tirpalo apskaičiuotas panaudojant formulę (1):

$$AV/ml = \frac{GE \times PF}{t_r \times V_f} \quad (1)$$

kur:  $GE$  – gliukozės ekvivalentas standartinėje tiesėje;  $PF$  – praskiedimo faktorius;  $t_r$  – reakcijos trukmė (min);  $V_f$  – fermento kiekis (ml).

### 2.2.2 Ksilanazių aktyvumo nustatymas

**Metodo esmė.** Fermento aktyvumui nustatyti naudojamas metodas panaudojant DNS (3,5-dinitrosalicilo rūgštis) reagentą. Veikiant ksilanazei vyksta ksilano hidrolizė, susidaro ksilozė, kuri esant 3,5-dinitrosalicilo rūgščiai [83, 84], šarminėje aplinkoje sudaro spalvotus junginius. Vienas fermento aktyvumo vienetas yra tam tikras fermento kiekis, reikalingas išskirti 1  $\mu\text{mol}$  ksilozės ekvivalento iš beržo ksilano (pH 4,5; 40 °C) per 1 min.

#### Naudotos medžiagos.

1. Natrio acetatas (Eurochemicals, Slovakija);
2. D-ksilozė (Merck, Vokietija);
3. 3,5-dinitrosalicilo rūgštis (Aldrich, Indija);
4. Substratas. Beržo ksilano (Roth, Vokietija) tirpalas (1 mg/ml) ruoštas natrio acetato buferyje (0,1 M, pH 4,5). Eksperimento metu laikytas 4 °C temperatūroje;
5. Viscoferm ir Celustar XL fermentiniai preparatai (Dyadic International, JAV).

**Tyrimo eiga.** Reakcijos mišinys (1 ml), sudarytas iš tiriamo fermentinio preparato (100  $\mu\text{l}$ ), ksilano tirpalo (50  $\mu\text{l}$ ) ir acetatinio buferio (850  $\mu\text{l}$ , 0,1 M, pH 4,5), inkubuotas 1 val. 40 °C temperatūroje. Reakcijos mišinyje nustatytas redukuojančių sacharidų kiekis. Tam ekvivalentiškai tirpalo ir DNS reagento kiekiai (po 0,5 ml) sumaišyti, o mišinys kaitintas 5 minutes 100 °C temperatūros vandens vonelėje (Memmert WNB7, Vokietija), po to atvėsintas iki kambario temperatūros ir praskiestas distiliuotu vandeniu santykiu 1:10. Spektrofotometru (Genesys 10, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Vokietija) išmatuota 540 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Fermentų aktyvumui apskaičiuoti sudaryta absorbcijos verčių priklausomybė nuo ksilozės koncentracijos tirpale. Standartinei tiesei sudaryti buvo paruošti ksilozės tirpalai, kuriuose buvo atitinkamai 0,33; 0,67; 1,33; 2,00; 2,66; 3,33; 6,66  $\mu\text{mol/ml}$  ksilozės ir išmatuota 540 nm bangos ilgio spindulio sugertis šiais tirpalais. Fermentų aktyvumas apskaičiuotas analogiškai celiulaziniui aktyvumui, panaudojant formulę (1), bei įvertinant ksilozės ekvivalentą standartinėje tiesėje.

### 2.2.3 Beta-gliukanazių aktyvumo nustatymas

**Metodo esmė.** Fermentų aktyvumui nustatyti pritaikytas metodas panaudojant DNS (3,5-dinitrosalicilo rūgštis) reagentą. Vienas beta-gliukanazių fermento aktyvumo vienetas yra tam tikras fermento kiekis, reikalingas išskirti 1  $\mu\text{mol}$  gliukozės ekvivalento iš beta-gliukano per 1 min. esant pH vertei 4,5 ir 40 °C temperatūrai.

#### Naudotos medžiagos.

1. Natrio acetatas (Eurochemicals, Slovakija);
2. 3,5-dinitrosalicilo rūgštis (Aldrich, Indija);

3. Gliukozės tirpalas 1 mg/ml (Eurochemicals, Slovakija);
4. 0,1% beta-gliukano (Megazyme, Airija) tirpalas;
5. Viscoferm ir Celustar XL fermentiniai preparatai (Dyadic International, JAV).

**Tyrimo eiga.** Reakcijos mišinys (1 ml), sudarytas iš fermentų tirpalo (100 µl), beta gliukano tirpalo (50 µl) ir acetatinio buferio (850 µl, 0,1 M, pH 4,5), inkubuotas 1 val. 50 °C temperatūroje. Reakcijos mišinyje nustatytas redukuojančių sacharidų kiekis. Tam ekvivalentiškai tirpalo ir DNS reagento kiekiai (po 0,5 ml) sumaišyti. Mišinys kaitintas 5 minutes 100 °C temperatūros vandens vonelėje (Memmert WNB7, Vokietija), po to atvėsintas iki kambario temperatūros ir praskiestas distiliuotu vandeniu santykiu 1:10. Spektrofotometu Genesys 10 (Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Germany) išmatuota 540 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamais tirpalais. Fermentų aktyvumui apskaičiuoti sudaryta sugerties verčių priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos tirpale. Standartinei tiesei sudaryti buvo paruošti gliukozės tirpalai, kuriuose buvo atitinkamai 0,33; 0,67; 1,33; 2,00; 2,66; 3,33; 6,66 µmol/ml gliukozės ir spektrofotometru išmatuota 540 nm bangos ilgio šviesos sugertis šiais tirpalais. Fermentų aktyvumas apskaičiuotas analogiškai celiulaziniui aktyvumui, panaudojant formulę (1).

#### 2.2.4 Temperatūros įtakos fermentinei hidrolizei nustatymas

**Metodo esmė.** Nustatyti temperatūros įtaką fermentinio preparato Celustar XL celiulazių, ksilanazių ir beta-gliukanazių veikimui prie skirtingų temperatūrų, įvertinant susidariusių redukuojančių sacharidų kiekius, panaudojant DNS (3,5-dinitrosalicilo rūgšties) reagentą.

**Tyrimo eiga.** Bandymas vykdytas remiantis celiulazių, ksilanazių ir beta-gliukanazių tyrimų metodika, įvertinant skirtingų temperatūrų – 35°C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C ir 60 °C, įtaką fermentų aktyvumams. Fermentų aktyvumas apskaičiuotas pasinaudojant formule (1), įvertinant išmatuotus gliukozės ir ksilozės ekvivalento kiekius iš atitinkamų standartinių tiesių.

#### 2.2.5 Fermentinės hidrolizės optimalios trukmės nustatymas

**Metodo esmė.** Nustatyti fermentinio preparato fermentų gebėjimą hidrolizuoti šiaudų biomasę priklausomai nuo hidrolizės trukmės įvertinant susidariusių redukuojančių sacharidų kiekius, panaudojant DNS (3,5-dinitrosalicilo rūgšties) reagentą.

##### Naudotos medžiagos.

1. Celustar XL fermentinis preparatas (Dyadic International, JAV);
2. Smulkinti kviečių šiaudai 0,5–1,0 mm.

**Tyrimo eiga.** Susmulkinti kviečių šiaudai užpilti distiliuotu vandeniu  $\frac{m}{V}/\% = 5$  ( $m$  – žaliavos masė,  $V$  – vandens tūris) ir autoklavuoti 121°C temperatūroje 30 min., termiškai apdorota žaliava atvėsinta iki kambario temperatūros, į mišinį supiltas nustatytas Celustar XL fermentinio

preparato kiekis, pagal gamintojo rekomendacijas (250 g/t apdorotos žaliavos) ir inkubuota 3 val. vandens vonelėje 55 °C temperatūroje. Praėjus 1, 2 ir 3 val. reakcijos mišinyje nustatyti redukuojančių sacharidų kiekiai. Ekvivalentiški bandinio tirpalo (0,5 ml) ir DNS reagento kiekiai (0,5 ml) sumaišyti, mišinys kaitintas 5 minutes 100 °C temperatūros vandens vonioje, po to atvėsintas iki kambario temperatūros ir praskiestas distiliuotu vandeniu santykiu 1:10. Spektrofotometru Genesys 10 (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Germany) išmatuota 540 nm bangos ilgio spindulio sugertis tiriamais tirpalais. Redukuojančių sacharidų kiekis išreikštas gliukozės ekvivalentu  $\mu\text{mol/ml}$ .

### 2.2.6 Druskų koncentracijos įtakos fermentinei hidrolizei nustatymas

**Metodo esmė.** Įvertinti šiaudų hidrolizę su fermentiniu preparatu Celustar XL, atitinkamai pridėjus skirtingų druskų koncentracijas reakcijos mišini: 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L, 125 mg/L, 150 mg/L, 175 mg/L. Nustatyti įvairių druskų koncentracijos (50, 75, 100, 125, 150 ir 175 mg/L) įtaką šiaudų hidrolizės efektyvumui naudojant Celustar XL fermentinį preparatą.

#### Naudotos medžiagos.

1. Distiliuotas vanduo;
2. NaCl (Eurochemicals, Slovakija);
3. CaCl<sub>2</sub> (Eurochemicals, Slovakija);
4. MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Chempur, Lenkija);
5. Celustar XL fermentinis preparatas (Dyadic International, JAV).

**Tyrimo eiga.** Bandinio pradžioje susmulkinti šiaudai sumaišyti su distiliuotu vandeniu buvo autoklavuoti 30 min. 121°C temperatūroje. Paruošti skirtingų koncentracijų druskų tirpalai ir supilti į reakcijos mišinius, atitinkamai: 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L, 125 mg/L, 150 mg/L, 175 mg/L. Bandiniai su fermentiniu preparatu inkubuoti 55 °C temperatūroje. Reakcijos mišinyje nustatyti susidarę redukuojančių sacharidų kiekiai po 1 ir 2 val., ekvivalentiški bandinio tirpalo (0,5 ml) ir DNS reagento kiekiai (0,5 ml) sumaišyti, o gautas mišinys kaitintas 5 minutes 100°C temperatūros vandens vonioje. Po to, atvėsintas iki kambario temperatūros ir praskiestas distiliuotu vandeniu santykiu 1:10. Spektrofotometru (Genesys 10, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Vokietija) išmatuota 540 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Standartinei tiesei sudaryti buvo paruošti gliukozės tirpalai, kuriuose buvo atitinkamai 0,33; 0,67; 1,33; 2,00; 2,66; 3,33; 6,66  $\mu\text{mol/ml}$  gliukozės ir išmatuota 540 nm bangos ilgio spindulio sugertis šiais tirpalais.

### 2.2.7 Fermentinių preparatų optimalaus kiekio sėlenų hidrolizei parinkimas

**Metodo esmė.** Panaudojant fermentus Celustar XL bei AlphaStar ir skirtingos koncentracijos fermentų mišinių tirpalus, nustatyti optimalius fermento kiekius reikalingus

fermentinei hidrolizei įvertinant susidariusių redukuojančių sacharidų kiekius, panaudojant DNS (3,5–dinitrosalicilo rūgšties) reagentą.

**Naudotos medžiagos.**

1. Distiliuotas vanduo;
2. Celustar XL ir AlphaStar Plus fermentiniai preparatai (Dyadic International, JAV);
3. Susmulkintos kviečių sėlenos 0,5–1,0 mm;
4. 3,5-dinitrosalicilo rūgštis (Aldrich, Indija).

**Tyrimo eiga.** Susmulkintos kviečių sėlenos apdorotos  $\sim 90$  °C distiliuotu vandeniu  $\frac{m}{V}/\% = 5$  ( $m$  – žaliavos masė,  $V$  – vandens tūris) ir inkubuotos 30 min. Praskiestas AlphaStarPlus fermentinis preparatas santykiu 1:10 ir supiltas į bandinius atitinkamais kiekiais – 1  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, 10000  $\mu$ l. Mėginiai inkubuoti 30 °C vandens vonelėje 3 val. (Memmert WNB7, Vokietija), po hidrolizės amilazėmis, 3 val. vykdyta fermentinė hidrolizė su gamintojo nustatytu optimaliu Celustar XL fermentų mišinio kiekiu – 250 g/t apdorotos žaliavos, 55 °C temperatūroje. Fermentinės hidrolizės metu po 1, 2 ir 3 val. reakcijos mišinyje nustatyti redukuojančių sacharidų kiekiai. Ekvivalentiškai bandinio tirpalo (0,5 ml) ir DNS reagento kiekiai (0,5 ml) sumaišyti, mišinys kaitintas 5 minutes 100 °C temperatūros vandens vonioje, po to atvėsintas iki kambario temperatūros ir praskiestas distiliuotu vandeniu santykiu 1:10. Spektrofotometru (Genesys 10, Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Vokietija) išmatuota 540 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Standartinei tiesei sudaryti buvo paruošti gliukozės tirpalai, kuriuose buvo atitinkamai 0,33; 0,67; 1,33; 2,00; 2,66; 3,33; 6,66  $\mu$ mol/ml gliukozės ir išmatuota 540 nm bangos ilgio spindulio sugertis šiais tirpalais.

### **2.2.8 PRB augimo hidrolizuotose lignoceliuliozinės žaliavos terpėse nustatymas**

**Metodo esmė.** Panaudojus Celustar XL bei Viscoferm fermentinius preparatus hidrolizuota šiaudų biomasė buvo fermentuota su skirtingomis PRB bakterijomis ir nustatyta šių PRB galimybė augti tokiose terpėse.

**Naudotos medžiagos.**

1. Distiliuotas vanduo;
2. PRB suspensijos (0,1 %);
3. MRS sultinys (Biolife, Italija);
4. MRS AGAR terpė (Biolife, Italija);
5. Hidrolizuota žaliava (kviečių šiaudai ir sėlenos);
6. Fiziologinis tirpalas (0,9 % NaCl).

**Tyrimo eiga.** Paruošta fermentais hidrolizuota žaliava (kviečių šiaudų pagal 2.2.6, sėlenų pagal 2.2.7 skyrių metodiką) fermentinė hidrolizė vykdyta 2 val., sėlenų hidrolizei AlphaStarPlus

fermentinio preparato kiekis, praskiestas santykiu 1:10 buvo paimtas 100 µl, Celustas XL kiekis sėlenų ir šiaudų hidrolizei, pagal gamintojo rekomendacijas – 250 g/t apdorotos žaliavos. Prieš fermentinę hidrolizę į šiaudų reakcijos mišinį buvo pridėta – 50 mg/L CaCl<sub>2</sub> ir 100 mg/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O druskų koncentracijos. Po fermentinės hidrolizės, mėginiai supilstyti į karščiui atsparias stiklines, sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje 15 min. Atvėsinus iki optimalios temperatūros steriliomis sąlygomis, atrinktos PRB laminare buvo pasėtos į kviečių šiaudų ir sėlenų terpes ir augintos joms optimaliose augimo temperatūrose (pateikta 2.1.3 skyriuje). Iš fermentuojamų mišinių paimti mėginiai po 24, 48, 72 ir 120 val., ir nustatytas PRB skaičius grame terpės. Praskiesti fiziologiniame tirpale (NaCl 0,9 %) iki atitinkamų koncentracijų nuo 10<sup>1</sup> iki 10<sup>7</sup> ir 0,1 ml suspensijos kiekiai supilstyti ant agarizuotos MRS terpės (MRS Agar) *petri* lėkštelėse ir inkubuota 72 val, atitinkamose temperatūrose skirtingoms PRB ( pagal skyrių 2.1.3).

Suskaičiuotos PRB kolonijos išreikštos kolonijas sudarančiais vienetais grame (*KSV/ml*), pagal 2 formulę:

$$KSV/g = KSV_{lėkštelėje} \cdot sf/a \quad (2)$$

kur:  $KSV_{lėkštelėje}$  – išaugusių kolonijų skaičius lėkštelėje;  $sf$  – skiedimo faktorius;  $a$  – mėginio kiekis (ml) naudotas sėjimams į lėkštelę.

### 2.2.9 Fermentuotos terpės drumstumo įvertinimas

**Metodo esmė.** Lygiagrečių spindulių srautas, praėjęs pro drumstą ląstelių suspensiją, dėl išsklaidymo susilpninamas ir matuojamas kultūros optinio tankio pokytis prie 600 nm bangų ilgio, išmatuotas  $OV = 1$ , prilyginamas  $1 \cdot 10^9$  KSV/ml [90].

#### Naudotos medžiagos.

1. PRB fermentuota žaliava (Šiaudai);
2. Distiliuotas vanduo;
3. MRS sultinys (Biolife, Italija).

**Tyrimo eiga.** Apdorota šiaudų terpė (pagal skyrių 2.2.8) po fermentinės hidrolizės buvo centrifuguota (6000 g, 5 min) ir papildomai filtruota pro filtro popierių (Watman, Germany). Pašalinus suspenduotas daleles, skaidrus supernatantas išpilstytas į mėgintuvėlius ir sterilizuotas autoklave 121 °C temperatūroje 15 min. Atvėsinus iki optimalios temperatūros steriliomis sąlygomis, atrinktos PRB laminare buvo pasėtos į kviečių šiaudų terpę ir augintos joms optimaliose augimo temperatūrose (pateikta 2.1.3 skyriuje) su skirtingomis PRB. Mėginiai paimti po 72 val. Praėjusios pro bakterijų suspensiją šviesos intensyvumas išmatuotas spektrofotometru (Genesys 10, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Germany). Skystoje terpėje šviesos sugerties rezultatams gauti pasirinkta 600 nm bangos ilgio šviesa. Kontroliniam mėginiui buvo parinktos terpes be mikroorganizmų.



## 2.2.10 Fermentuojamų terpių rūgštingumo nustatymas

**Metodo esmė.** Nustatyti disocijuotų vandenilio jonų koncentraciją.

**Naudotos medžiagos.**

1. PRB fermentuota žaliava;

**Tyrimo eiga.** Iš fermentuotos žaliavos terpių su skirtingomis PRB, paimti mėginiai atitinkamai po 24, 48, 72, 96 ir 120 val. pH rezultatai gauti išmatavus fermentuotų terpių rūgštingumą pH-metru (WinLab Data Line, Germany).

## 2.2.11 L-pieno rūgšties ir D-pieno rūgšties kiekių nustatymas

**Metodo esmė.** Panaudojant Megazyme K-Dlate 07/14 (Megazyme Int. Ireland, Wicklow, Ireland) reagentų rinkinį pieno rūgšties įvertinimui, kurį sudaro D-laktato dehidrogenazė bei L-laktato dehidrogenazė, apskaičiuoti pieno rūgšties optinių izomerų kiekius [85, 86, 87].

**Naudotos medžiagos.**

1. Buferinis tirpalas, pH 10 (0,6 M glicilglicinas, 0.1 M L-glutamato rūgštis) (3.1);
2. Nikotinamido adenino dinukleotido (NAD) tirpalas (3.2);
3. Glutamato piruvato transaminazė (GPT) (3.3);
4. L-laktato dehidrogenazės (L-LDH) tirpalas (3.4);
5. D-laktato dehidrogenazės (D-LDH) tirpalas (3.5);

**Tyrimo eiga.** Po fermentacijos, atskirtos PRB ląstelės centrifuguojant (6000 g, 5 min.), o gautas centrifugatas praskiestas su distiliuotu vandeniu santykiu 1:100 ir naudotas pieno rūgšties nustatymui. D(-) ir L(+) pieno rūgščių izomerų nustatymas atliktas kartu. Tirpalai į kiuvetes supilstyti (mililitrais) pagal 2.1 lentelėje pateiktas proporcijas.

Į kiuvetę prieš reakciją supiltas distiliuotas vanduo, tiriamasis mėginys ir turimi tirpalai 3.1; 3.2 ir 3.3. Stikline lazdele kruopščiai sumaišytas turinys ir po 3 min. kambario temperatūroje matuota 340 nm ilgio UV spindulių sugertis tiriamais tirpalais. Gautos vertės ( $A_1$ ) užrašytos. Kontroliniam mėginiui paruošti naudojami tie patys reagentai, tačiau vietoje mėginio paimtas distiliuotas vanduo (2.1 lent.). Atlikus matavimus į tą patį tirpalą įpilta 0,02 ml tirpalo 3.5, stikline lazdele sumaišyta ir inkubuota 5 min. Pasibaigus reakcijai matuota 340 nm ilgio UV spindulių sugertis tiriamais tirpalais. Gautos vertės ( $A_2$ ) užrašytos.

**2.1 lentelė.** Reagentai naudoti reakcijos metu

	Kontrolinis variantas	Tiriamas variantas
	<b>Tūris, ml</b>	
Distiliuotas vanduo	1,60	1,50
Tiriamas mėginys	-	0,10
Tirpalas 3.1	0,50	0,50
Tirpalas 3.2	0,10	0,10
Tirpalas 3.3	0,02	0,02
Tirpalas 3.5	0,02	0,02
Tirpalas 3.4	0,02	0,02

Užrašius gautas vertes, reakcijos mišinys papildytas po 0,02 ml 3.4 tirpalo ir išmaišytas turinys. Inkubuota 10 min ir matuota 340 nm ilgio UV spindulio sugertis tiriamais tirpalais. Gautos vertės ( $A_3$ ) užrašytos. Pieno rūgšties kiekis apskaičiuotas pagal 3 formulę.

$$C = \frac{V \times M}{\varepsilon \times \delta \times v} \times \Delta A_i \times d \quad (3)$$

kur:  $C$  – pieno rūgšties kiekis, g/l;  $V$  – tiriamo tirpalo tūris, ml ( $V=2,24$  ml L-pieno rūgšties matavimuose,  $V=2,29$  ml D-pieno rūgšties matavimuose);  $v$  – tiriamo mėginio kiekis reakcijoje, ml (0,2 ml);  $M$  – molekulinė tiriamo junginio masė ( $M=90,08$ );  $\delta$  – spindulio kelias, cm (1 cm);  $\varepsilon$  – NADH sugerties koeficientas prie 340 nm ( $\varepsilon=6,3 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$ );  $\Delta A_i$  – gautos rezultatų reikšmės 340 nm ilgio UV spindulio sugerties tiriamais tirpalais pokytis ( $A_2-A_1$  D-pieno rūgšties matavimuose,  $A_3-A_2$  L-pieno rūgšties matavimuose);  $d$  – koeficientas įvertinant tiriamo mėginio praskiedimą.

### 2.2.12 Antioksidacinio aktyvumo fermentuotoje terpėje įvertinimas

**Metodo esmė.** Junginių, kurie pasižymi gebėjimu surišti laisvus radikalus, kiekio įvertinimas po fermentacijos skirtingomis PRB, naudojantis 2,2-difenilpikrilhidrazilo (DPPH) metodu [88].

#### Naudotos medžiagos.

1. PRB fermentuota žaliava;
2.  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Eurochemicals, Slovakija);
3. 2,2-difenilpikrilhidrazilas (Aldrich, Vokietija);
4.  $\text{CH}_3\text{CN}$  (Fluka, Vokietija).

**Tyrimo eiga.** 100 mM natrio acetato buferio (pH=5,5) ir DPPH radikalo tirpalo (0,1 mM koncentracijos – acetonitrile ir metanolyje, santykiu 1:1) tirpalų mišinys paruoštas prieš analizę. Vienodi kiekiai (250ml) buferio ir radikalo tirpalo buvo sumaišyti ir sugertis pakoreguota iki 0,500 optinių vienetų (515 nm), pridendant aceto buferio. 77 µl fermentuotos žaliavos suspensijos, kuri gauta centrifuguojant (6000 g, 5 min.), sumaišyta su 3000 µl paruoštu DPPH tirpalu. Po 15 minučių inkubacijos kambario temperatūroje, tamsoje, spektrofotometru išmatuota 515 nm ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamais tirpalais. Kontrolinis mėginys buvo paruoštas sumaišius reagentus ir tirpalus be tiriamos medžiagos. Kalibracinei tiesei sudaryti buvo panaudotas troloksas (0,0078–0,25 mg/ml). Bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas trolokso ekvivalentu (GE) mg 100 g žaliavos (4).

$$x = \frac{C \cdot V \cdot 100}{m}, \text{ mg TE iš 100g žaliavos} \quad (4)$$

$C$  – trolokso ekvivalentas (TE), mg/ml, nustatytas iš kalibracinės tiesės;  $V$  – ekstrakto tūris, ml;  $m$  – žaliavos kiekis, g.

### 2.2.13 Fenolinių junginių kiekio fermentuotoje terpėje nustatymas

**Metodo esmė.** Bendro fenolinių junginių kiekio kviečių šiaudų ir sėlenų terpėje, po fermentacijos su skirtingomis PRB įvertinimas panaudojant modifikuotą Folin-Ciocalteu metodą [89].

#### Naudotos medžiagos.

1. PRB fermentuota žaliava;
2. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Eurochemicals, Slovakija) 3,3 % tirpalas;
3. Galo rūgštis (Sigma, Kinija);
4. Folin-Ciocalteu reagentas (Sigma-Aldrich, Šveicarija).

**Tyrimo eiga.** 100 µl fermentuotos žaliavos suspensijos, kuri centrifuguota (6000 g, 5 min.), sumaišyta su 3000 µl natrio karbonato tirpalu (3,3 %) ir 100 µl Folin-Ciocalteu reagentu. Mišinys inkubuotas 30 min. kambario temperatūroje, sugertis išmatuota prie 760 nm bangos ilgio šviesoje spektrofotometru (Genesys 10, Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Germany). Kalibracinei kreivei sudaryti buvo panaudota galo rūgštis (0,05–1 mg/ml). Bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas galo rūgšties ekvivalentu (GE) mg 100 g žaliavos.

Suminis fenolinių junginių kiekis išreiškiamas gramui žaliavos. Jis apskaičiuojamas pagal 5 formulę.

$$x = \frac{C \cdot V \cdot 100}{m}, \text{ mg GE iš 100g žaliavos}, \quad (5)$$

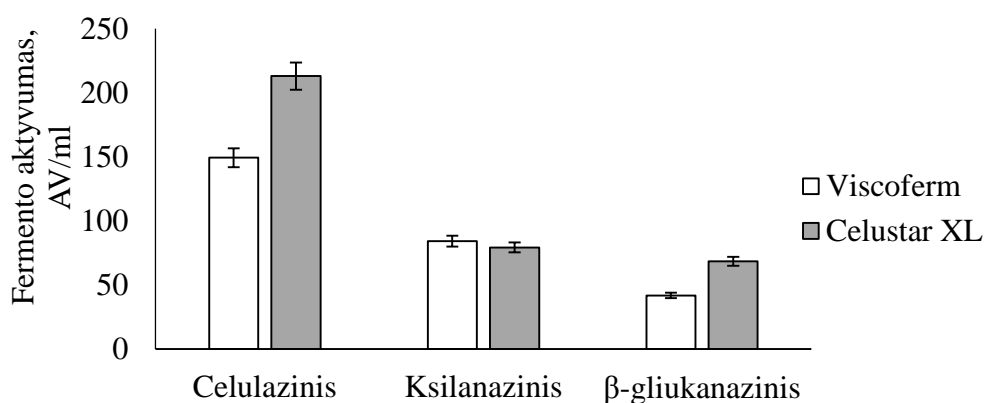
kur:  $C$  – galo rūgšties ekvivalentas (GE) mg/ml, nustatyta iš kalibracinės tiesės;  $V$  – ekstrakto tūris, ml;  $m$  – žaliavos kiekis, g.

### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1 Fermentinės hidrolizės sąlygų įtaka jos efektyvumui

##### 3.1.1 Fermentinio preparato lignoceliuliozinei žaliavai parinkimas

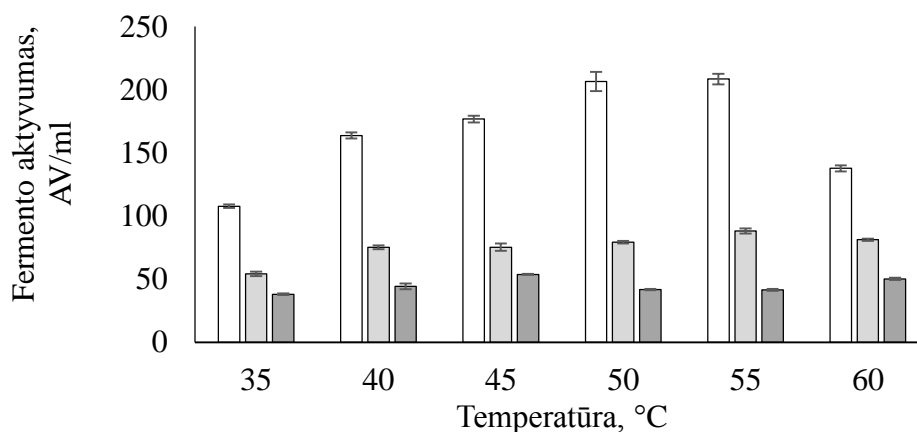
Pagrindinis fermentų aktyvumo nustatymo tikslas – įvertinti fermentų mišinio gebėjimą hidrolizuoti turimą žaliavą – šiaudus. Pasak Fenila ir Yogendra [91], Barret ir kt. [92], fermentinė hidrolizė yra vienas labiausiai naudojamų būdų apdoroti lignoceliuliozinę žaliavą. Šis procesas svarbus norint suardyti celiuliozę bei kitus angliavandenius polimerus į fermentuojamus cukrus, mėsų atveju gliukozę ir ksilozę. Nustatyti fermentinių preparatų Viscoferm ir Celustar XL celiulazinis, ksilanazinis bei  $\beta$ -gliukanazinis fermentiniai aktyvumai ir pateikti 3.1 paveiksle. Didžiausias fermento celiulazės aktyvumas buvo 148,6 AV/ml Viscoferm fermentinio preparato ir 216,0 AV/ml Celustar XL fermentinio preparato. Fermento ksilanazės aktyvumai buvo 85,3 ir 80,7 AV/ml atitinkamai Viscoferm ir Celustar XL preparatų, o  $\beta$ -gliukanazės – 41,7 ir 68,0 AV/ml atitinkamai Viscoferm ir Celustar XL fermentinių preparatų. Sekantiems tyrimams pasirinktas Celustar XL fermentinis preparatas dėl 1,45 karto didesnio celiulazinio aktyvumo.



**3.1 pav.** Fermentinių preparatų Celustar XL ir Viscoferm aktyvumų palyginimas (55 °C; pH 5,6)

##### 3.1.2 Temperatūros įtaka celiulazių, ksilanazių ir beta-gliukanazių aktyvumui

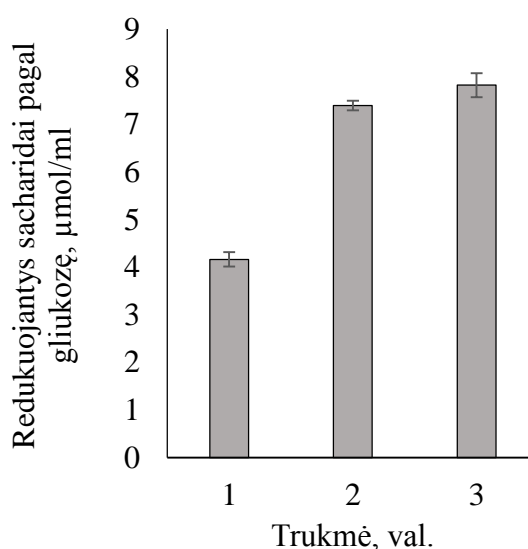
Tolimesniems tyrimams pasirinkus Celustar XL fermentinį preparatą buvo nustatyta temperatūros įtaka celiulazių, ksilanazių ir beta-gliukanazių aktyvumui. Fermentinių aktyvumų tyrimo rezultatai pateikti 3.2 paveiksle.



**3.2 pav.** Temperatūros įtaka fermentinio preparato Celustar XL fermentų aktyvumams, celiulazių (□), ksilanazių (▨) ir beta-gliukanazių (■) (pH 5,6; po 1 val.)

Tyrimo metu buvo nustatyta, kad celiulazių poveikis substratui buvo didžiausias prie 55 °C (3.2 pav.), nes gautas didžiausias fermento aktyvumas (208,47 AV/ml), o mažiausias fermento aktyvumas buvo prie 35 °C (107,80 AV/ml). Ksilanazių didžiausias aktyvumas pasireiškė prie 55 °C temperatūros (88,23 AV/ml), o mažiausias buvo esant 35 °C (54,24 AV/ml). Didžiausias β-gliukanazės aktyvumas gautas prie 45 °C (53,89 AV/ml), o mažiausiai prie 35 °C (38,17 AV/ml). Išanalizavus gautus rezultatus, buvo priimta išvada, kad optimali temperatūra vykdyti fermentinę hidrolizę yra 55 °C. Tokia temperatūra buvo pasirinkta tolimesniems tyrimams. Išanalizavus fermento veikimo ypatybes, kaip substratas buvo pasirinkta susmulkinta šiaudų biomasė.

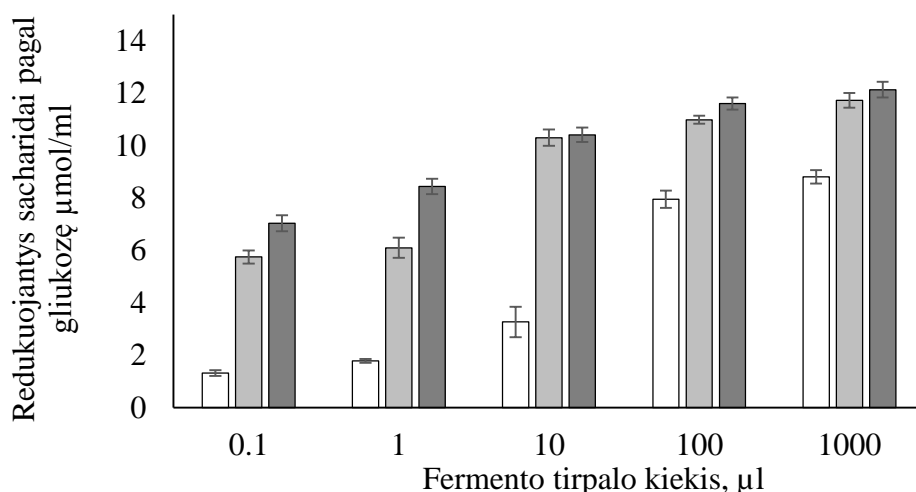
Siekiant sužinoti optimalią fermentinės hidrolizės trukmę, atliktas bandymas šiaudų biomasę hidrolizuojant Celustar XL fermentiniu mišiniu 3 val. Pasak Fenila ir Yogendra [91], hidrolizės trukmė yra tiesiogiai susijusi su sacharidų susidarymu hidrolizuojamoje lignoceliuliozinėje žaliavoje. Po 2 val. hidrolizės pastebėtas žymus redukuojančių sacharidų padidėjimas (7,39 μmol/ml), o po 3 val. – redukuojančių sacharidų padaugėjo, tačiau nežymiai (7,83 μmol/ml). Įvertinus tai, jog po 3 val. fermentinės hidrolizės redukuojančių sacharidų pokytis nebuvo labai žymus, tolimesniems tyrimams pasirinkta 2 val. hidrolizės vykdymo trukmė.



**3.3 pav.** Šiaudų fermentinės hidrolizės trukmės su Celustar XL fermentiniu preparatu įtaka susidariusiam gliukozės ekvivalentui (55 °C, pH 5,6)

### 3.1.3 Fermentinės hidrolizės trukmės ir preparato AphaStar Plus kiekio įtaka hidrolizės efektyvumui

Fermentinės hidrolizės trukmės ir preparato AphaStar Plus kiekio įtaka sėlenų biomasės hidrolizės efektyvumui pateikta 3.4 paveiksle. Fermentų mišinio koncentracijos, atitinkamai jas didinant, turėjo tiesioginį poveikį išlaisvintam gliukozės ekvivalentui iš sėlenų biomasės. Panaudojant fermentų mišinius hidrolizei atlikti mažiausiai redukuotųjų sacharidų po 1 val. susidarė mėginyje, kuriame buvo 0,1  $\mu\text{l}$  fermentų mišinio (1,32  $\mu\text{mol/ml}$ ), o daugiausia (8,80  $\mu\text{mol/ml}$ ), kai 1000  $\mu\text{l}$  fermento buvo naudota. Po 2 val. fermentinės hidrolizės, pastebėtas dėsningumas, jog didinant fermento tirpalo kiekį susidariusių redukuojančių sacharidų kiekis didėjo, tačiau panaudojus 10  $\mu\text{l}$  ir 100  $\mu\text{l}$  fermento mišinio, rezultatai buvo panašūs, atitinkamai – 10,30 ir 11,98  $\mu\text{mol/ml}$  redukuojančių sacharidų. Praėjus 3 val., redukuojančių sacharidų kiekis padidėjo atitinkamai su visomis fermento koncentracijomis: mažiausiai redukuojančių sacharidų susidarė panaudojus 0,1  $\mu\text{l}$  (7,04  $\mu\text{mol/ml}$ ), o daugiausiai panaudojus 1000  $\mu\text{l}$  (12,13  $\mu\text{mol/ml}$ ).



### 3.4. pav. Fermentinės hidrolizės trukmės ir preparato AphaStar Plus kiekio įtaka hidrolizės efektyvumui

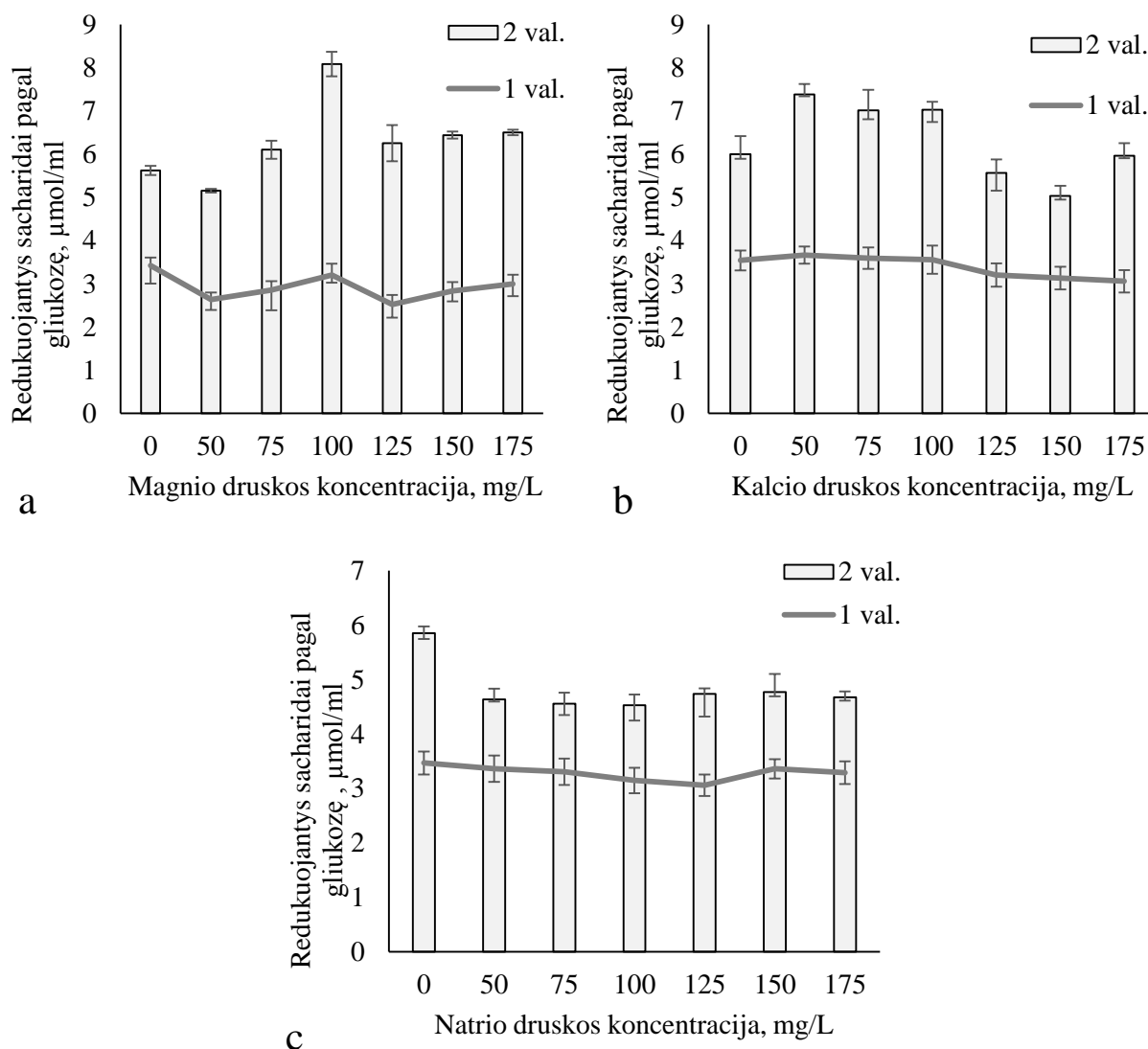
Fermentinio preparato AphaStar Plus nustatytas optimalus kiekis buvo 10  $\mu\text{l}$  (100 g/t apdorotos žaliavos), šis preparato kiekis pasirinktas tolimesniems tyrimams. Celustar XL fermentinio preparato kiekis pasirinktas pagal gamintojo rekomendacijas – 250 g/t apdorotos žaliavos. Optimali fermentinės hidrolizės trukmė – 2 val.

### 3.1.4 Druskų koncentracijos įtaka fermentinei hidrolizei

Fermentų aktyvumui padidinti ir efektyvesnei hidrolizei pasiekti yra pasitelkiami kofaktoriai – metalų jonai. Į šiaudų mišinį atitinkamomis koncentracijomis prieš fermentinę hidrolizę buvo

pridėtos druskos, kurios turi –  $Mg^{+2}$ ,  $Na^+$  ir  $Ca^{+2}$  jonus, ir nustatyta susidariusių redukuojančių sacharidų kiekio (pagal gliukozę) reakcijos mišinyje priklausomybė nuo druskos koncentracijos po 1 ir 2 val. fermentinės hidrolizės. Gauti rezultatai pateikti 3.5 paveiksle.

Nustatyta, kad nuo 75 iki 175 mg/L magnio druskos priedai į terpę padidino redukuojančių sacharidų susidarymą, nuo 8,73 iki 43,85 %, tačiau 50 mg/L magnio druskos priedas 8,11 % sumažino redukuojančių sacharidų susidarymą. Daugiausia redukuojančių sacharidų (8,08  $\mu\text{mol/ml}$ ) susidarė naudojant 100 mg/L magnio druskos.



**3.5 pav.** Druskų  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (a),  $CaCl_2$  (b),  $NaCl$  (c) koncentracijų įtaka fermentinės hidrolizės efektyvumui

Redukuojančių sacharidų kiekis padidėjo į fermentuojamą mišinį pridėjus 50, 75 ir 100 mg/L kalcio druskos atitinkamai 23,08, 16,91 ir 17,14 %. Tuo tarpu pridėjus šios druskos 125, 150 ir 175 mg/L redukuojančių sacharidų sumažėjo atitinkamai 7,20, 16,11 ir 0,57 %. Natrio druskos priedas turėjo neigiamą poveikį, nes pastebėtas staigus redukuojančių sacharidų sumažėjimas reakcijos terpėje (3.5 c pav.). Redukuojančių sacharidų pagal gliukozę sumažėjimas buvo

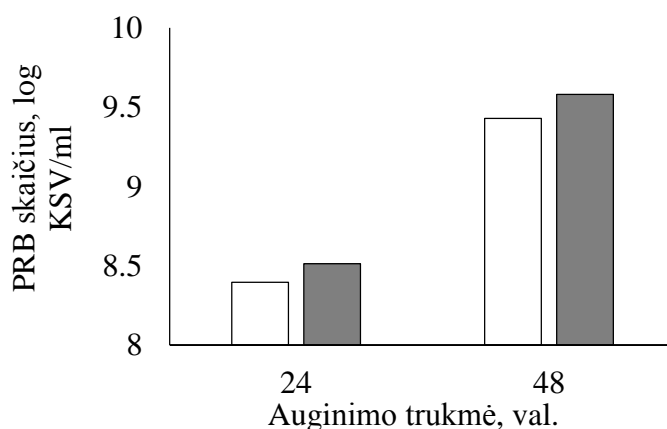
vidutiniškai 21,43 % pridėjus natrio druskos priedą ribose 50– 75 mg/L. Pasak Peijin ir kt. [93], prieš kvietrugių hidrolizę į reakcijos mišinį pridėti magnio ir kalcio jonai turėjo teigiamos įtakos redukuojančių sacharidų susidarymui, esant 160 mg/L magnio druskos koncentracijai gliukozės kiekis padidėjo 30,16 %, o pridėjus 160 mg/L kalcio druskos gliukozės kiekis padidėjo 69,31 %.

Įvertinus gautus duomenis nustatyta, kad magnio ir kalcio druskos turėjo teigiamą poveikį fermentinei hidrolizei, naudojant atitinkamai 100 ir 50 mg/L ir vykdant fermentinę hidrolizę 2 val., todėl sekančių tyrimų metu šie druskų kiekiai buvo naudojami fermentinės hidrolizės efektyvumui padidinti.

### 3.2 PRB augimas hidrolizuotoje šiaudų terpėje

#### 3.2.1 *Pediococcus pentosaceus* KTU05-9 augimas skirtingais fermentais apdorotose šiaudų terpėse

Siekiant įvertinti PRB galimybę augti šiaudų terpėje buvo pasirinkta PRB padermė – *Pediococcus pentosaceus*. Pirminiai mokslo grupės tyrimų rezultatai parodė, kad ši PRB gamina didelius kiekius pieno rūgšties krakmolingoje terpėje (rezultatai nepublikuoti). Atlikus šiaudų fermentinę hidrolizę į terpę buvo pasėta PRB kultūra – *P. pentosaceus* KTU05-9. Hidrolizė atlikta panaudojus Celustar XL bei Viscoferm fermentų mišinius. Bakterijos augintos 48 val. Nustatytas PRB skaičius po 24 ir 48 val. auginimo pateiktas 3.6 paveiksle. Didžiausias PRB skaičius buvo po 48 val fermentacijos (atitinkamai 9,42 ir 9,57 log KSV/ml). Didesnis PRB skaičius nustatytas šiaudų terpėje, kai fermentinei hidrolizei buvo naudotas Celustar XL fermentinis preparas, tai gali būti siejama su didesniu redukuojančių sacharidų susidarymu dėl šio preparato aktyvesnių celiulazių (3.1 pav.).



**3.6 pav.** *P. pentosaceus* KTU05-9 augimas šiaudų terpėje po fermentinės hidrolizės su Celustar XL (■) ir Viscoferm (□) fermentų mišiniais

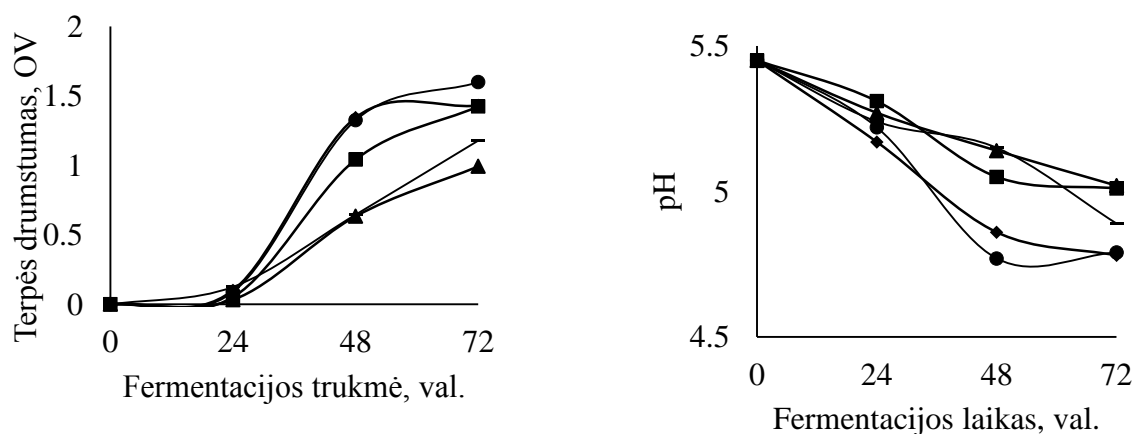


### 3.2.2 Kitų pienarūgščių bakterijų augimas skirtingais fermentais apdorotose šiaudų terpėse

Siekiant įvertinti skirtingų PRB augimą, matuotas šiaudų terpės drumstumas (optiniais vienetais) ir pH verčių pokyčiai bakterijų auginimo metu (3.7 pav.). Buvo užfiksuoti mikroorganizmų augimo etapai: lag, logaritminė bei stacionarioji fazės. Pienarūgščių bakterijų fermentuotoje šiaudų terpėje nežymus (lag fazė) augimas užfiksuotas jau po 24 val. išmatavus drumstumo pokytį tarp terpės be bakterijų ir su jomis, didžiausias prieaugis apskaičiuotas bakterijoms *P. pentosaceus* KTU05-10 – 0,126 OV ( $12,6 \cdot 10^8$  KSV/ml), bei *L. sanfranciscensis* MR24 – 0,101 OV ( $10,1 \cdot 10^8$  KSV/ml), mažiausias – *P. pentosaceus* KTU05-7 – 0,033 OV ( $3,3 \cdot 10^7$  KSV/ml). Po 48 val. fermentacijos didžiausias prieaugis apskaičiuotas bakterijos *L. sanfranciscensis* MR24 – 1,345 OV ( $1,35 \cdot 10^9$  KSV/ml) ir *P. pentosaceus* KTU05-9 – 1,326 OV ( $1,33 \cdot 10^9$  KSV/ml).

Įvertinus gautus rezultatus, galime teigti, kad PRB pradėjo sparčiai daugintis ir yra logaritminio augimo fazėje. Po 72 val., daugumos PRB augimas sulėtėjo, nes vyko perėjimas iš logaritminio augimo į stacionariąją fazę, nes užfiksuotas nežymus drumstumo padidėjimas – *L. sanfranciscensis* MR24 – 1,431 OV ( $1,43 \cdot 10^9$  KSV/ml) ir *P. pentosaceus* KTU05-9 – 1,599 OV ( $1,60 \cdot 10^9$  KSV/ml).

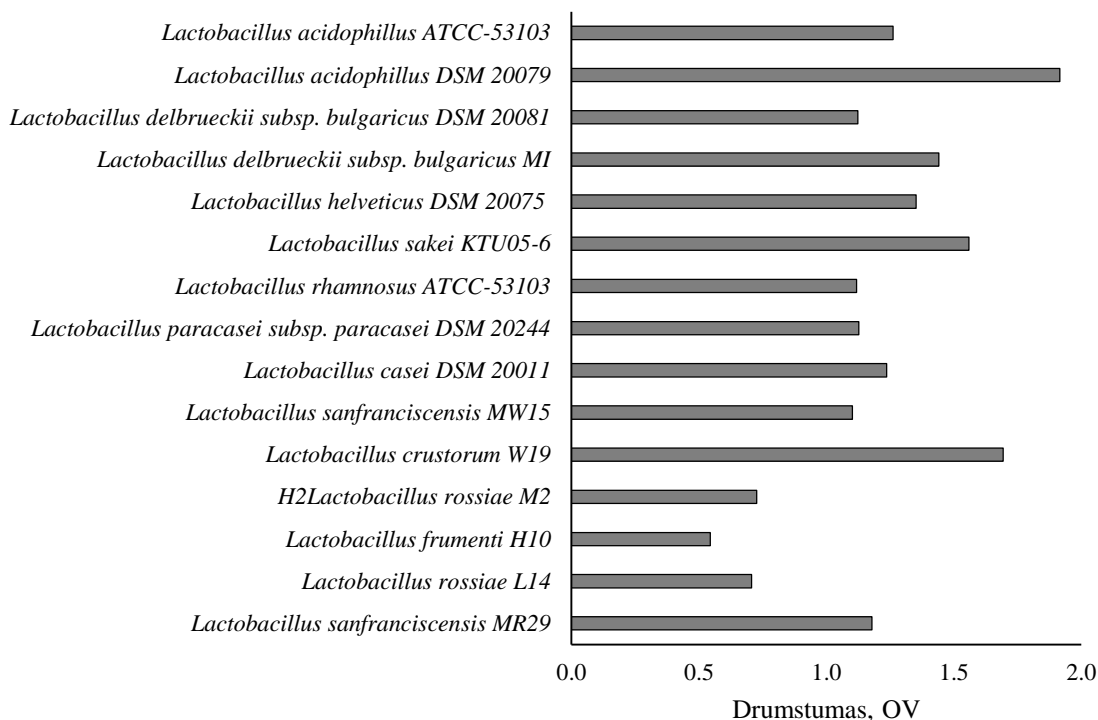
Po 72 val. mažiausias pH užfiksuotas fermentuotoje šieno terpėje su *L. sanfranciscensis* MR24 – 4,78 (3.7 pav.). Pagal Homayouni ir kt. [94], skirtingose sacharozės koncentracijos tirpaluose po 24 val. augimo, išmatuoti skirtingų padermių terpių drumstumas *L. acidophilus* nuo 0,561 OV iki 0,687 OV, *L. casei* nuo 1,339 OV iki 1,614 OV.



**3.7 pav.** Fermentuotos šiaudų terpės drumstumo (kairėje) ir pH verčių (dešinėje) priklausomybė nuo PRB auginimo trukmės: *P. pentosaceus* KTU05-10 (—●—), *L. sanfranciscensis* MR24 (—■—), *P. pentosaceus* KTU05-9 (—▲—), *P. acidilactici* KTU05-7 (—◆—) bei *P. pentosaceus* KTU05-8 (—■—)

Įvertinus augimo galimybes ir sužinojus, jog hidrolizuoti šiaudai yra tinkama terpė bakterijoms augti, sekančio tyrimų etapo metu buvo atliktas tyrimas, kurio metu buvo įtraukta

daugiau PRB padermių (iš KTU kolekcijos) augimo šiaudų terpėje tyrimams. Įvairių PRB augimo galimybės šiaudų terpėje pateiktos 3.8 paveiksle.



**3.8 pav.** Fermentuotos šiaudų terpės su įvairiomis PRB drumstumas po 72 val.

Po 72 val. fermentacijos su atrinktomis PRB, didžiausias drumstumo padidėjimas, išmatavus drumstumo pokytį tarp terpės be bakterijų ir su jomis (3.8 pav.), pastebėtas šiaudų terpėje fermentuotoje su *L. acidophilus* DSM 20079 (1,917 OV) ir *L. crustorum* W19 (1,694 OV), mažiausias drumstumas išmatuotas – *L. frumenti* H10, *L. rossiae* M2 ir *L. rossiae* L14 (atitinkamai 0,544, 0,727 ir 0,707 OV).

Išanalizavus rezultatus, prieita išvados, jog kai kurių *Lactobacillus* genties PRB padermių šiaudų terpėje augimas buvo nepastovus ir skirtingoms *L. rossiae* bei *L. frumenti* rūšies bakterijoms šiaudų terpė yra nepalanki daugintis.

### 3.3 Pieno rūgšties susidarymas po PRB fermentacijos šiaudų terpėje

Išmatuoti D(-) ir L(+) pieno rūgšties izomerų ir bendras jos kiekis, rezultatai pateikiami 3.1 lentelėje.

Didžiausia koncentracija D-pieno rūgšties fermentuotoje šiaudų terpėje nustatyta su PRB *P. acidilactici* KTU05-7 buvo 1,12 g/L terpės (22,4 g/kg žaliavos) ir su *P. pentosaceus* KTU05-9 – 0,76 g/L (15 g/kg žaliavos), mažiausia koncentracija pieno rūgšties gauta šiaudų terpėje fermentuojant su *L. rossiae* GL14 – 0,03 g/L (6 g/kg žaliavos), o PRB, kurios visiškai nepagamino

šio izomero pieno rūgštis buvo *L. sanfranciscensis* MR29, *L. crustorum* W19, *L. sakei* KTU05-6, *L. acidophilus* ATCC-53103 bei *L. acidophilus* DSM 20079.

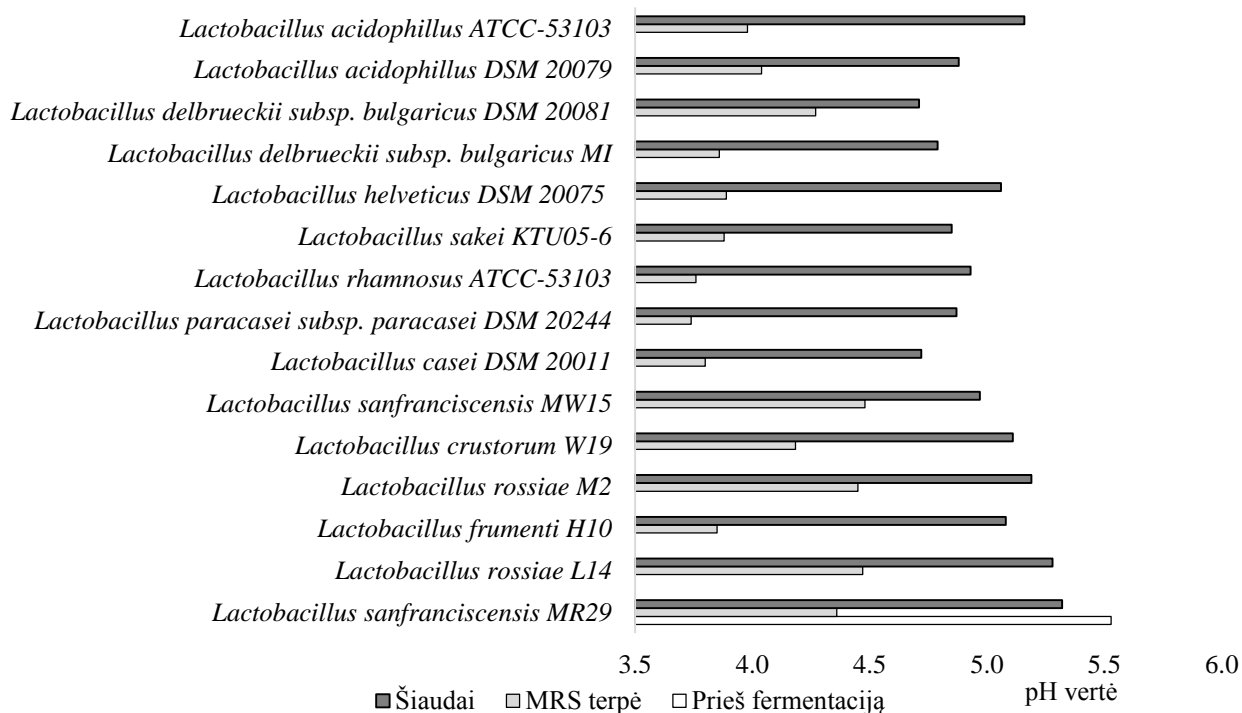
**3.1 lentelė.** Pagaminti D(-) ir L(+) izomerų ir bendro pieno rūgštis kiekiai fermentuotoje šiaudų ir MRS terpėse po 72 val.

PRB pavadinimas	D-pieno rūgštis kiekis, g/L		L-pieno rūgštis kiekis, g/L		Bendras pieno rūgštis kiekis, g/L	
	MRS terpė	Šiaudų terpė	MRS terpė	Šiaudų terpė	MRS terpė	Šiaudų terpė
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> MR29	3,04	0	8,01	3,01	11,05	3,01
<i>Lactobacillus rossiae</i> GL14	3,84	0,03	6,39	0,93	10,23	0,96
<i>Lactobacillus frumenti</i> H10	1,69	0,45	16,25	1,45	17,94	1,90
<i>Lactobacillus rossiae</i> M2	4,00	0,41	7,24	1,13	11,24	1,54
<i>Lactobacillus crustorum</i> W19	3,90	0	12,12	2,94	16,02	2,94
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> MW15	3,33	0,19	10,05	4,91	13,38	5,10
<i>Lactobacillus casei</i> DSM 20011	1,79	0,41	15,48	0,09	17,27	0,50
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DSM 20244	1,12	0,19	14,44	1,08	15,56	1,27
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC-53103	1,08	0,57	13,80	0	14,88	0,57
<i>Pediococcus acidilactici</i> KTU05-7	7,65	1,12	6,69	0	14,34	1,12
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KTU05-10	8,13	0,25	8,24	0,81	16,37	1,06
<i>Lactobacillus sakei</i> KTU05-6	2,33	0	13,25	0,67	15,58	0,67
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KTU05-8	0,73	0,76	9,21	0,04	9,94	0,80
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KTU05-9	7,59	0,77	8,46	0,93	16,05	1,70
<i>Lactobacillus helveticus</i> DSM 20075	6,63	0,19	13,09	1,84	19,72	2,03
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> MI	6,29	0,16	12,24	4,58	18,53	4,74
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DSM 20081	10,70	0,32	0,67	5,97	11,37	6,29
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079	5,54	0	8,66	1,48	14,20	1,48
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC-53103	7,24	0	11,79	0,87	19,03	0,87

L-pieno rūgštis didžiausia koncentracija nustatyta šiaudų terpėje po fermentacijos su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 buvo 5,97 g/L (119,4 g/kg žaliavos), *L. sanfranciscensis* MW15 – 4,91 g/L (98,2 g/kg žaliavos) bei *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI – 4,58 g/L (91,6 g/kg žaliavos). Šio izomero pieno rūgštis visiškai neaptikta panaudojant – *L. rhamnosus* ATCC-53103 bei *P. acidilactici* KTU05-7 bakterijas. Pasak Wang ir kt., [95], naudojant *Lactobacillus casei* rūšies bakterijas ir jomis fermentuojant sojų šiaudus 42 val., didžiausias pieno rūgštis kiekis terpėje siekė – 28 g/L, o pagal Walczak E. ir Walczak P., [103]

panaudojant naujai išrastas skirtingas *Enterococcus faecium* bakterijų atmainas, po 72 val. terpės fermentacijos, kurioje naudotas substratas ksilozė (gaunama iš lignoceliuliozinės žaliavos), pieno rūgštis kiekis terpėje gali siekti 16,8–29,1 g/L (93,8–100 % L(+) izomero).

Išmatuotos MRS ir fermentuotos šiaudų terpės pH reikšmės su 15 skirtingų PRB kultūrų po 72 val. auginimo pateiktos 3.9 paveiksle.



**3.9 pav.** Fermentuotų su skirtingomis PRB šiaudų (■), MRS (□) ir prieš fermentaciją (□) terpių pH vertės po 72 val.

Žemiausios pH vertės MRS terpėje buvo *L. paracasei subsp. paracasei* DSM 20244 (3,74) bei *L. rhamnosus* ATCC-53103 (3,76), o mažiausios pH vertės šiaudų terpėje išmatuotos su *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM 20081 (4,71) ir *L. casei* DSM 20011 (4,72). Palyginus rezultatus, matyti, jog *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM 20081 ir *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MI šiaudų terpėje išmatuotos pH buvo vienos žemiausių ir iš 3.1 lentelės matyti, kad jos pagamino daugiausiai L-pieno rūgštis, tai galime prieiti išvados, jog pieno rūgštis susidarymas turi įtakos fermentuotos šiaudų terpės pH vertei. Tai patvirtina ir Mussatto ir kt. [96], pagal kurį priklausomai nuo gliukozės ir pieno rūgštis hidrolizuotoje grūdų terpėje pH po fermentacijos su PRB *L. delbrueckii* pakito vidutiniškai nuo 6 iki 4,2 pH vertės.

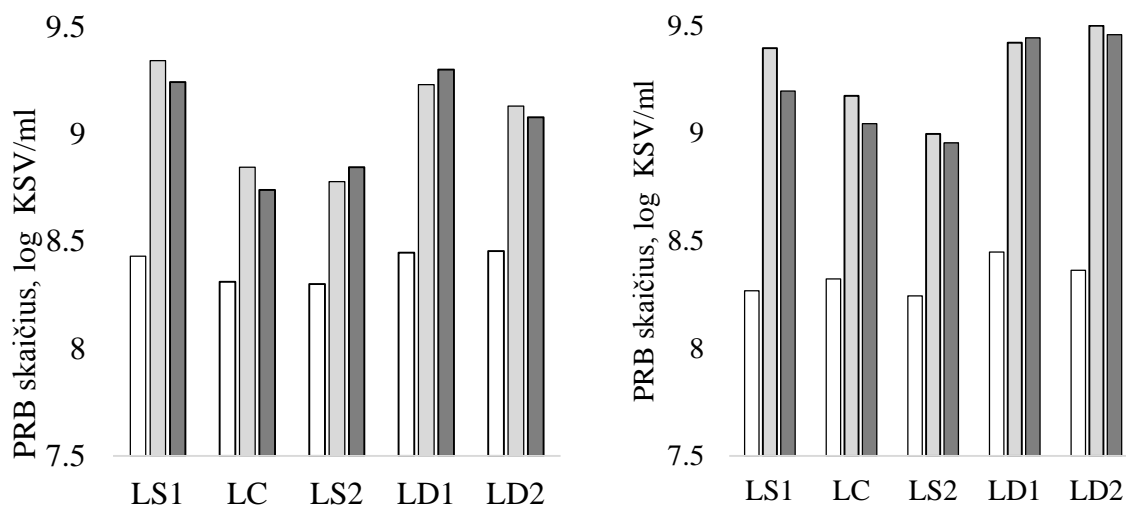
### 3.4 Fermentacijos trukmės įtaka PRB ląstelių augimui, terpės pH, substrato pokyčiams bei pieno rūgštis susidarymui šiaudų ir sėlenų terpėse

Ankstesnių tyrimų metu buvo nustatyta, jog daugiausiai L-pieno rūgštis izomero buvo gauta panaudojus 5 PRB – *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM 20081, *L. sanfranciscensis*

MW15, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI, *L. crustorum* W19 bei *L. sanfranciscensis* MR29, todėl tolimesni tyrimai atlikti su šiomis bakterijomis. Šio etapo metu nustatyta atrinktų PRB augimas ir pieno rūgštis, bei jos izomerų susidarymas šiaudų ir sėlenų terpėse 120 val. fermentacijos laikotarpyje, o taip pat terpės pH pokyčiai fermentacijos metu.

### 3.4.1 Fermentacijos trukmės įtaka PRB ląstelių augimui šiaudų ir sėlenų terpėse

Naudotos žaliavos – šiaudai ir sėlenos, buvo termiškai apdorotos ir hidrolizuotos panaudojant fermentinius preparatus. Į bandinius pasėtos pienarūgštės bakterijos ir augintos 72 val., nustatytas jų skaičius terpėse (3.10 pav.). Po 72 val. nustatytas PRB skaičiaus padidėjimas visose terpėse, o po 120 val. PRB kolonijų sumažėjo, išskyrus *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI, kurios kiekis po 120 val. padidėjo. Didžiausias PRB skaičius po 120 val. fermentacijos užfiksuotas su *L. sanfranciscensis* MW15 – 9,34 log KSV/ml, o sėlenų terpėje su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 – 9,49 log KSV/ml.



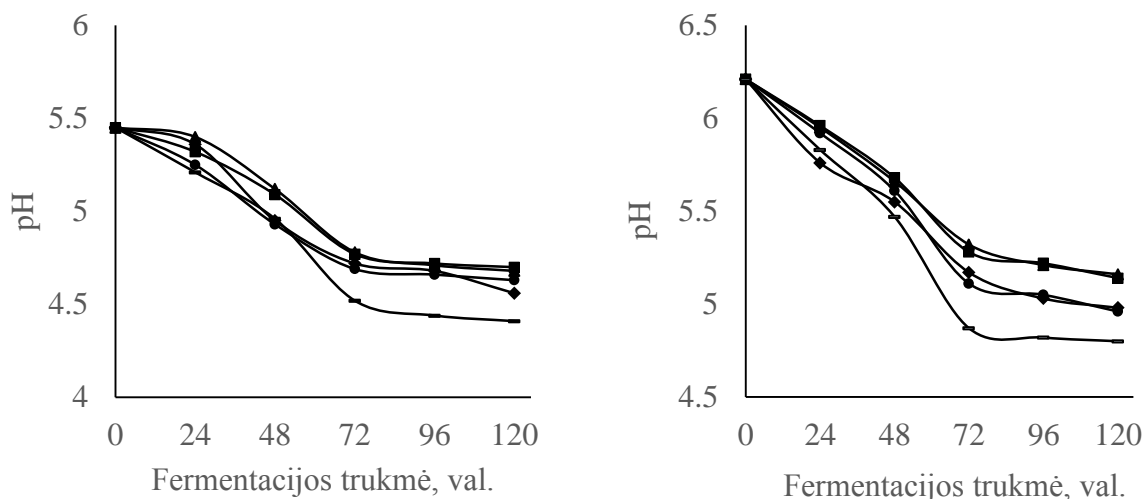
**3.10 pav.** Šiaudų (kairėje) ir sėlenų (dešinėje) terpėse skirtingų PRB: LS1 (*L. sanfranciscensis* MW15), LC (*L. crustorum* W19), LS2 (*L. sanfranciscensis* MR29), LD1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI), LD2 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081) augimas fermentacijos metu po 24 (□), 72(□) ir 120 (■) val.

### 3.4.2 Fermentacijos trukmės įtaka terpės pH pokyčiams pieno rūgštis gamybos metu šiaudų ir sėlenų terpėse

Auginant pienarūgštės bakterijas, kas 24 val., išmatuotos terpės pH vertės, o gauti rezultatai pateikti 3.11 paveiksle.

Prieš pienarūgščių bakterijų užsėjimą, hidrolizuotos šiaudų terpės pH vertė buvo 5,45, sėlenų – 6,2. Palyginus gautus rezultatus, pastebėtas pH verčių mažėjimas. Po 120 val. šiaudų ir sėlenų

terpių pH vertės su *L. sanfranciscensis* MW15 buvo atitinkamai – 4,56 ir 4,98, su *L. crustorum* W19 buvo atitinkamai 4,68 ir 5,16, su *L. sanfranciscensis* MR29 buvo atitinkami 4,70 ir 5,14, su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI buvo atitinkamai 4,63 ir 4,96, o su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 buvo atitinkami 4,41 ir 4,80.



**3.11 pav.** Šiaudų (kairėje) ir sėlenų (dešinėje) terpės pH verčių priklausomybė nuo fermentacijos trukmės ir PRB: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 (—), *L. sanfranciscensis* MW15 (—◆—), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI (—◆—), *L. crustorum* W19 (—◆—) bei *L. sanfranciscensis* MR29 (—◆—)

### 3.4.3 Fermentacijos trukmės įtaka pieno rūgšties susidarymui šiaudų ir sėlenų terpėse

Išmatuoti pieno rūgšties ir jos izomerų kiekiai šiaudų ir sėlenų mėginiuose po 24, 48 ir 72, 96 ir 120 val pateikti 3.2 ir 3.3 lentelėse. Didžiausias kiekis D-pieno rūgšties fermentuotoje šiaudų terpėje po 120 val. buvo su *L. sanfranciscensis* MW15 (0,45 g/L), o mažiausias buvo su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 (0,25 g/L). Fermentuotoje sėlenų terpėje daugiausiai D-pieno rūgšties pagamino *L. sanfranciscensis* MW15 (1,19 g/L), o mažiausiai pieno rūgšties nustatyta su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI (0,10 g/L) po 72 valandų fermentacijos. *L. crustorum* W19 ir *L. sanfranciscensis* MR29 negamino šio pieno rūgšties izomero šiaudų terpėje.

Didžiausias kiekis L-pieno rūgšties fermentuotoje šiaudų terpėje po 120 val. nustatytas su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI buvo 4,72 g/L (94,4 g/kg žaliavos), o mažiausias su sėlenų terpėje su *L. sanfranciscensis* MR29 – 3,21 g/L (64,2 g/kg žaliavos). Sėlenų fermentuotoje terpėje didžiausias kiekis L-pieno rūgšties po 120 val. nustatytas su *L. sanfranciscensis* MW15, o mažiausias su *L. sanfranciscensis* MR29, gauti kiekiai atitinkamai buvo 5,43 g/L (108,6 g/kg žaliavos) ir 3,89 g/L (77,8 g/kg žaliavos). Pagal Juodeikienė ir kt. [97], po 48 val. sėlenų fermentacijos su PRB *P. pentosaceus* KTU05-9, jai optimalioje temperatūroje, L-pieno rūgšties izomero koncentracija gali pasiekti 86 g/kg žaliavos.

**3.2 lentelė.** D(-) ir L(+) pieno rūgšties izomerų kiekio priklausomybė nuo fermentacijos trukmės šiaudų terpėje

Trukmė, val.	24		48		72		96		120	
PRB	D-pieno rūgšties kiekis, g/L	L-pieno rūgšties kiekis, g/L	D-pieno rūgšties kiekis, g/L	L-pieno rūgšties kiekis, g/L	D-pieno rūgšties kiekis, g/L	L-pieno rūgšties kiekis, g/L	D-pieno rūgšties kiekis, g/L	L-pieno rūgšties kiekis, g/L	D-pieno rūgšties kiekis, g/L	L-pieno rūgšties kiekis, g/L
<i>L. sanfranciscensis</i> MW15	0,15	1,55	0,22	3,84	0,38	4,56	0,42	0,46	0,45	4,65
<i>L. crustorum</i> W19	0	0,88	0	1,54	0	2,92	0	3,23	0	3,32
<i>L. sanfranciscensis</i> MR29	0	0,76	0	1,36	0	2,85	0	3,15	0	3,21
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> MI	0	2,23	0,06	4,01	0,15	4,59	0,19	4,65	0,25	4,72
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DSM 20081	0,13	1,91	0,22	3,41	0,32	4,49	0,26	4,46	0,29	4,59

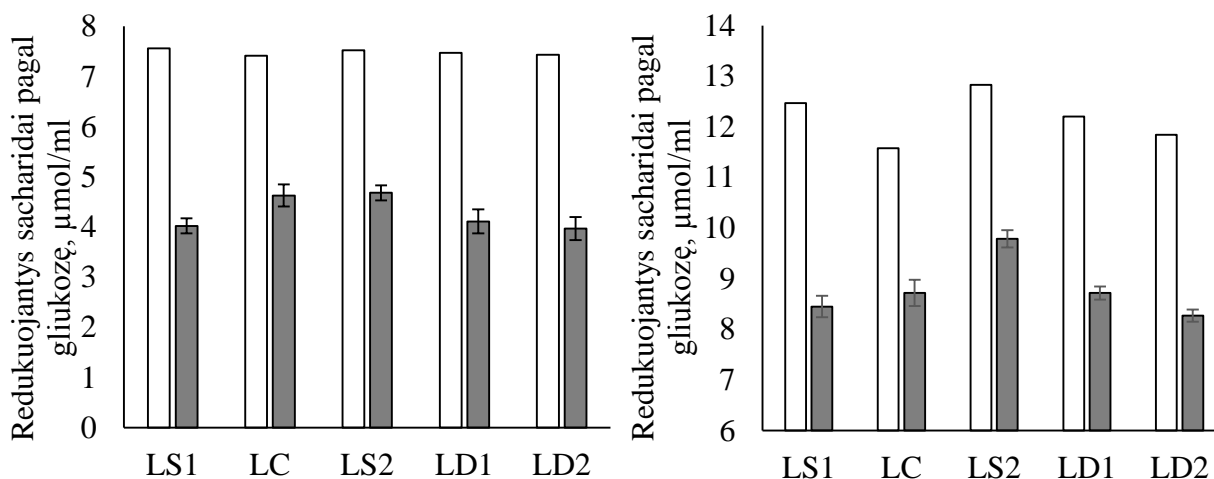
**3.3 lentelė.** D(-) ir L(+) pieno rūgšties izomerų kiekio priklausomybė nuo fermentacijos trukmės sėlenų terpėje

Trukmė, val.	24		48		72		96		120	
PRB	D-pieno rūgšties kiekis, g/L	L-pieno rūgšties kiekis, g/L	D-pieno rūgšties kiekis, g/L	L-pieno rūgšties kiekis, g/L	D-pieno rūgšties kiekis, g/L	L-pieno rūgšties kiekis, g/L	D-pieno rūgšties kiekis, g/L	L-pieno rūgšties kiekis, g/L	D-pieno rūgšties kiekis, g/L	L-pieno rūgšties kiekis, g/L
<i>L. sanfranciscensis</i> MW15	0,19	2,24	0,22	3,75	0,32	5,07	0,74	5,37	1,19	5,43
<i>L. crustorum</i> W19	0	0,92	0	2,35	0	3,15	0	3,61	0	4,2
<i>L. sanfranciscensis</i> MR29	0	0,86	0	2,68	0	3,21	0	3,34	0	3,89
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> MI	0	2,39	0	4,14	0	5,24	0,03	5,27	0,11	5,36
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DSM 20081	0,10	2,54	0,13	3,81	0,19	5,27	0,22	5,21	0,38	5,33

### 3.4.4 Substrato iš lignoceliuliozinės žaliavos pokyčiai pieno rūgšties gamybos metu

Išmatuotos PRB bakterijų substrato (redukuojančių sacharidų) suvartojimo priklausomybė prieš ir po fermentacijos su PRB, pateikta 3.12 paveiksle.

Prieš ir po fermentacijos su pienarūgštėmis bakterijomis, šiaudų terpėje išmatuota redukuojančių sacharidų pagal gliukozę vertės su *L. sanfranciscensis* MW15 buvo atitinkamai 7,55 ir 4,02  $\mu\text{mol/ml}$  (13,65 ir 7,26 g/L), su *L. crustorum* W19 buvo atitinkamai 7,41 ir 4,62  $\mu\text{mol/ml}$  (13,39 ir 8,36 g/L), su *L. sanfranciscensis* MR29 buvo atitinkamai 7,52 ir 4,68  $\mu\text{mol/ml}$  (13,58 ir 8,46 g/L), su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI – atitinkamai 7,46 ir 4,11  $\mu\text{mol/ml}$  (13,49 ir 7,42 g/L), o su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 – atitinkamai 7,43 ir 3,96  $\mu\text{mol/ml}$  (13,42 ir 7,17 g/L).



**3.12 pav.** Redukuojančių sacharidų pagal gliukozę, šiaudų (kairėje) ir sėlenų (dešinėje) terpėse kiekio priklausomybė nuo trukmės su skirtingomis PRB: LS1 (*L. sanfranciscensis* MW15), LC (*L. crustorum* W19), LS2 (*L. sanfranciscensis* MR29), LD1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI), LD2 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081), prieš fermentaciją (□) ir po 120 val. (■)

Prieš ir po fermentinės hidrolizės pienarūgštėmis bakterijomis, sėlenų terpėje išmatuoti redukuojančių sacharidų kiekia pagal gliukozę su *L. sanfranciscensis* MW15 buvo atitinkamai 12,47 ir 8,45  $\mu\text{mol/ml}$  (22,52 ir 15,26 g/L), su *L. crustorum* W19 buvo atitinkamai 11,58 ir 8,72  $\mu\text{mol/ml}$  (20,90 ir 15,74 g/L), su *Lactobacillus sanfranciscensis* MR29 – 12,83 ir 9,79  $\mu\text{mol/ml}$  (23,16 ir 17,68 g/L), su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI buvo atitinkamai 12,20 ir 8,72  $\mu\text{mol/ml}$  (22,03 ir 15,74 g/L), o su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 buvo atitinkamai 11,84 ir 8,27  $\mu\text{mol/ml}$  (21,39 ir 14,94 g/L) (3.12 pav.).

Šiaudų terpėje vidutiniškai redukuojančių sacharidų po 120 val. fermentacijos sumažėjo – 42,74 %, sėlenų terpėje – 27,86 %.



### 3.5 Sinergetinis PRB poveikis pieno rūgšties susidarymui

Šio etapo metu vertintas PRB sinergetinis poveikis pieno rūgšties susidarymui. Į hidrolizuotas šiaudų ir sėlenų terpės buvo pasėta PRB mišiniai, parinkti pagal PRB optimalias augimo temperatūras ir atlikta fermentacija. Mišinį I sudarė – *L. sanfranciscensis* MW15, *L. crustorum* W19 bei *L. sanfranciscensis* MR29, mišinį II sudarė – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI, mišinį III sudarė – *L. crustorum* W19 bei *L. sanfranciscensis* MR29. Nustatyta susidariusių pieno rūgšties izomerų kiekiai po 24, 48, 72, 96 ir 120 val. fermentacijos pateikti 3.4 lentelėje.

Panaudojant PRB mišinius gauti didesni pieno rūgšties kiekiai negu su individualiomis PRB. Didžiausias kiekis L-pieno rūgšties išmatuotas naudojant mišinį I ir mišinį II fermentuotoje sėlenų terpėje, atitinkamai 6,36 ir 6,61 g/L (127,2 ir 132,2 g/kg žaliavos). Mažiausias L-pieno rūgšties kiekis gautas su trečiuoju mišiniu, kuris siekė 5,15 g/L (103 g/kg žaliavos) šiaudų terpėje ir 5,95 g/L (119 g/kg žaliavos) sėlenų terpėje. Pasak Plessas ir kt. [98], panaudojus skirtingus mišinius, sudarytus iš PRB: *Kluyveromyces marxianus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ir *L. helveticus* atmainų, galima pasieki pieno rūgšties kiekio padidėjimas po antrinių maisto žaliavų fermentacijos.

Įvertinus turimus rezultatus, galime teigti, jog dėl pasireiškusio teigiamo sinergetinio poveikio su PRB mišiniais I, II ir III buvo gauti didesni L-pieno rūgšties kiekiai sėlenų terpėje, o su mišiniais I ir II gauti didesni L-pieno rūgšties kiekiai šiaudų terpėje, negu fermentacijai panaudojus individualias PRB.

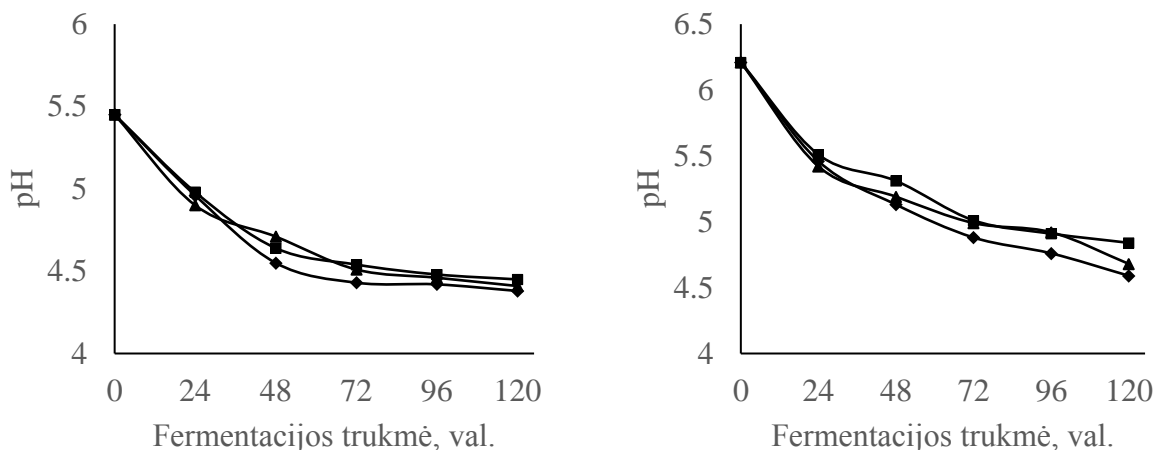
3.4 lentelė. D(-) ir L(+) pieno rūgštis izomerų kiekio priklausomybė nuo fermentacijos trukmės ir parinkto PRB mišinio šiaudų ir sėlenų terpėje

Mišinys*	Trukmė, val.	24		48		72		96		120	
	Terpė	D- pieno rūgštis kiekis, g/L	L- pieno rūgštis kiekis, g/L	D- pieno rūgštis kiekis, g/L	L- pieno rūgštis kiekis, g/L	D- pieno rūgštis kiekis, g/L	L- pieno rūgštis kiekis, g/L	D- pieno rūgštis kiekis, g/L	L- pieno rūgštis kiekis, g/L	D- pieno rūgštis kiekis, g/L	L- pieno rūgštis kiekis, g/L
I	Šiaudai	0,15	3,21	0,26	4,82	0,29	5,64	0,36	6,19	0,42	6,26
	Sėlenos	0,18	3,48	0,31	5,02	0,34	5,84	0,39	6,27	0,43	6,36
II	Šiaudai	0,18	3,54	0,26	4,78	0,31	5,85	0,35	6,22	0,39	6,29
	Sėlenos	0,09	3,66	0,14	4,78	0,22	5,68	0,26	6,45	0,31	6,61
III	Šiaudai	0	3,13	0	4,67	0	4,85	0	4,96	0	5,15
	Sėlenos	0	3,35	0	4,67	0	5,58	0	5,85	0	5,95

\* Mišinys I – *L. sanfranciscensis* MW15, *L. crustorum* W19 bei *L. sanfranciscensis* MR29); mišinys II – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI, mišinys III – *L. crustorum* W19 bei *L. sanfranciscensis* MR29

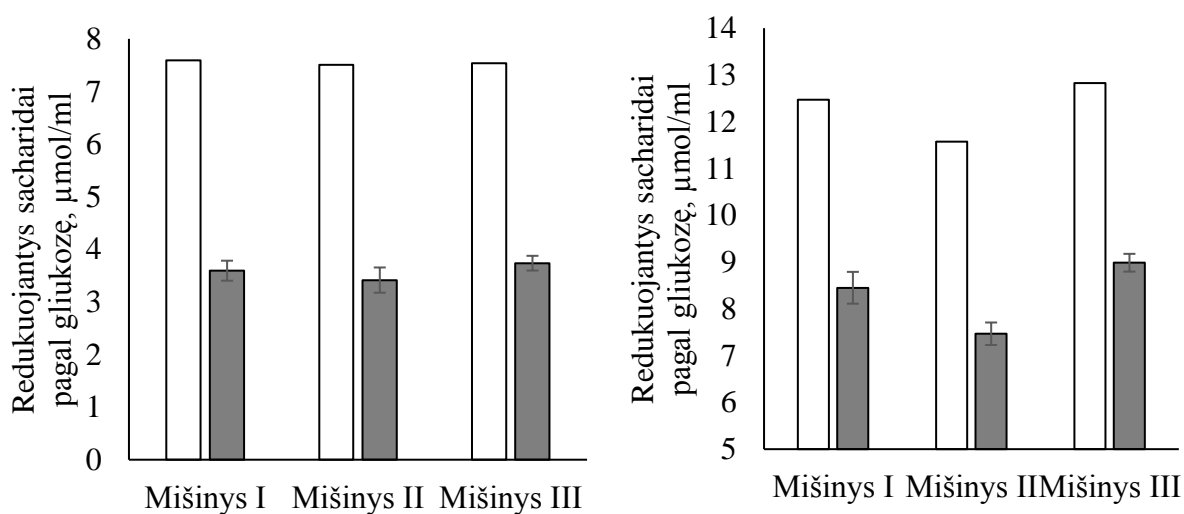
### 3.6 Sinergetinis PRB poveikis terpės pH vertei

Bandymo eigoje kas 24 val. matuotos terpių pH vertės, kurios pateiktos 3.14 paveiksle. Mažiausia pH vertė šiaudų terpėje užfiksuota fermentuojant su mišiniu I – 4,38, sėlenų terpėje taip pat fermentuojant su mišiniu I – 4,59 (3.13 pav.).



**3.13 pav.** Šiaudų (kairėje) ir sėlenų (dešinėje) terpės pH priklausomybė nuo fermentacijos trukmės ir PRB mišinių I (◆), II (▲) ir III (■)

Prieš ir po fermentinės hidrolizės pienarūgštėmis bakterijomis, šiaudų ir sėlenų terpėse išmatuotas redukuojančių sacharidų kiekis su skirtingais PRB mišiniais pateiktas 3.14 paveiksle. Šiaudų terpėje išmatuoti redukuojančių sacharidų kiekiai prieš ir po fermentuojant su PRB mišiniu I buvo atitinkamai 7,59 ir 3,59  $\mu\text{mol/ml}$  (13,71 ir 6,49 g/L); su PRB mišiniu buvo atitinkamai 7,50 ir 3,41  $\mu\text{mol/ml}$  (13,55 ir 6,17 g/L), o fermentuojant su PRB mišiniu III – buvo atitinkamai 7,54 ir 3,74  $\mu\text{mol/ml}$  (13,62 ir 6,75 g/L).



**3.14 pav.** Substrato, išreikšto redukuojančiais sacharidais pagal gliukozę, šiaudų (kairėje) ir sėlenų (dešinėje) terpėse kiekio priklausomybė nuo trukmės su skirtingais PRB mišiniais, prieš fermentaciją (□) ir po 120 val. (■)

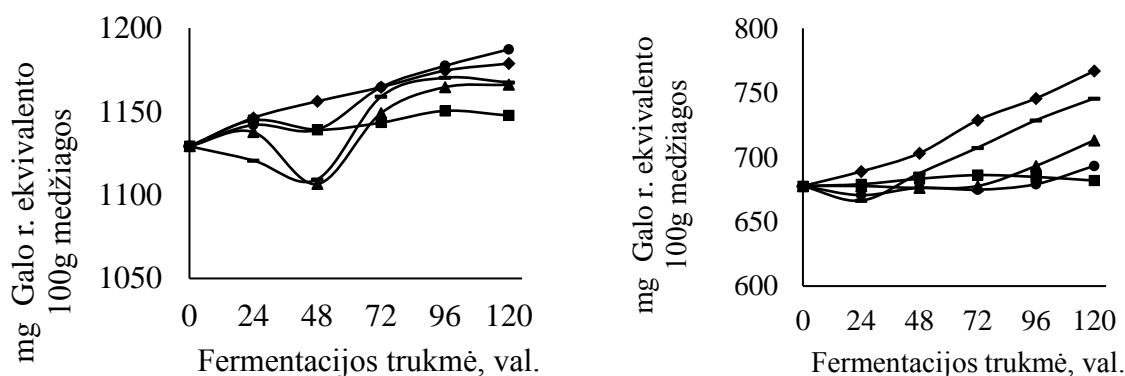
Sėlenų terpėje išmatuoti redukuojančių sacharidų kiekiai pagal gliukozę su PRB mišiniu I – 12,47 ir 8,45  $\mu\text{mol/ml}$  (22,52 ir 15,26 g/L), PRB mišiniu II – 11,58 ir 7,47  $\mu\text{mol/ml}$  (20,90 ir 13,49 g/L) ir su PRB mišiniu III – 12,83 ir 8,99  $\mu\text{mol/ml}$  (23,16 ir 16,22 g/L).

Šiaudų terpėje vidutiniškai redukuojančių sacharidų po 120 val. fermentacijos sumažėjo – 52,53 %, sėlenų terpėje – 32,55 %.

### 3.7 Antioksidacinio aktyvumo ir fenolinių junginių įvertinimas

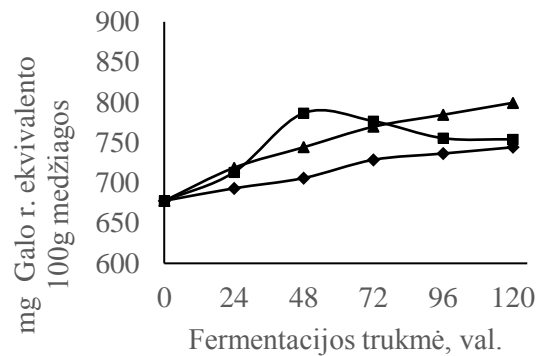
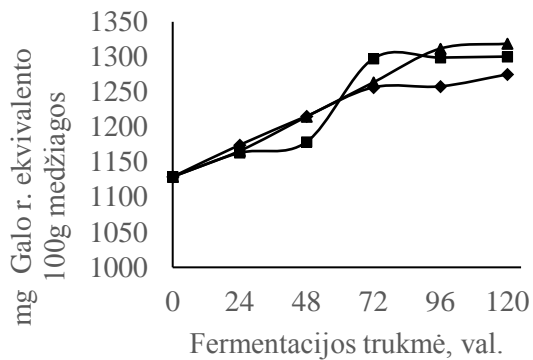
Šio tyrimo tikslas buvo nustatyti ar PRB šiaudų ir sėlenų terpėse gamina fenolinius ar kitus antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčius junginius. Siekiant įvertinti bendrą fenolinių junginių kiekį terpėje bei antioksidacinį aktyvumą buvo atlikti tyrimai prieš ir po fermentacijos. Pasak Martins ir kt. [99], antrinės agro žaliavos yra tinkamos bioaktyviems junginiams gauti mikrobinės fermentacijos metu.

Bendri fenolinių junginių kiekiai išmatuoti penkių skirtingų PRB ir jų mišinių, šiaudų ir sėlenų terpėse po 24, 48, 72, 96 ir 120 val. fermentacijos, gauti rezultatai pateikti 3.15 paveiksle.



**3.15 pav.** Bendro fenolinių junginių kiekio priklausomybė nuo šiaudų (kairėje) ir sėlenų (dešinėje) terpės, fermentacijos trukmės ir PRB: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 (—), *L. sanfranciscensis* MW15 (◆), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI (●), *L. crustorum* W19 (▲) bei *L. sanfranciscensis* MR29 (■)

Po 120 val. fermentacijos su PRB nustatytas bendro fenolinių junginių kiekio padidėjimas šiaudų ir sėlenų terpėse. Didžiausias kiekis fermentuotoje šiaudų terpėje nustatytas su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI kultūra, mažiausias – su *L. sanfranciscensis* MR29, atitinkamai 1187 mg ir 1147 mg (padidėjo atitinkamai 5,14 % ir 1,63 %) pagal Galo rūgšties ekvivalentą iš 100g žaliavos (3.16 pav.).



**3.16 pav.** Bendro fenolinių junginių kiekio priklausomybė nuo šiaudų (kairėje) ir sėlenų (dešinėje) terpės, fermentacijos trukmės ir PRB mišinių I (◆), II (■) ir III (▲)

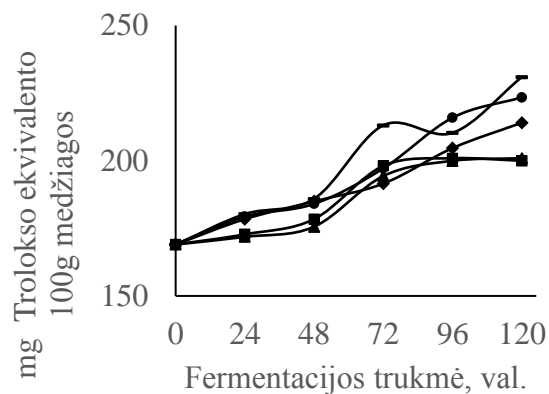
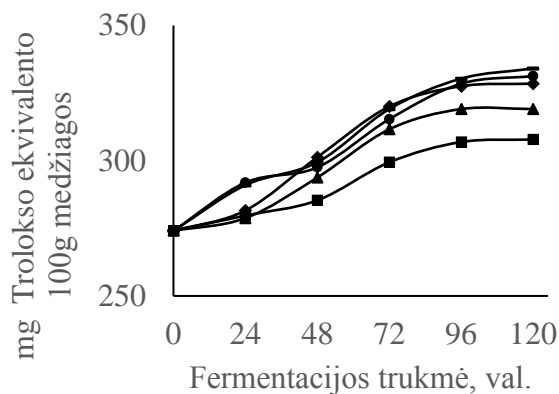
Sėlenų terpėje didžiausias kiekis su *L. sanfranciscensis* MW15, o mažiausias *L. sanfranciscensis* MR29, buvo atitinkamai 766 mg ir 681 mg (padidėjo atitinkamai 13,16 % ir 0,63 %) pagal GE iš 100 g žaliavos (3.16 pav.).

Pagal Bhanja ir kt. [100] javų žaliavos kietos fazės fermentacijos metu buvo aptiktas fenolinių junginių padidėjimas, o Randhir ir Shetty [101] nustatė kai kuriuose maisto produktuose, tokiuose kaip pupelės, antioksidacinio aktyvumo padidėjimą terpėje po fermentacijos mikroorganizmais.

Naudojant PRB mišinius fermentuotuose šiaudų ir sėlenų terpėje didžiausias fenolinių kiekis po 120 val. buvo naudojant mišinį II (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI), atitinkamai 1318 mg ir 799 mg (padidėjo atitinkamai 16,79 % ir 17,97 %) pagal GE iš 100g žaliavos, mažiausias pokytis su mišiniu I (*L. sanfranciscensis* MW15, *L. crustorum* W19 bei *L. sanfranciscensis* MR29) (3.17 pav.) atitinkamai 1274 mg ir 744 mg (padidėjo atitinkamai 12,91 % ir 9,81 %).

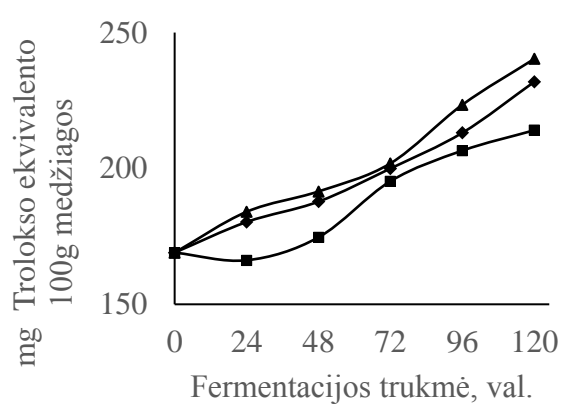
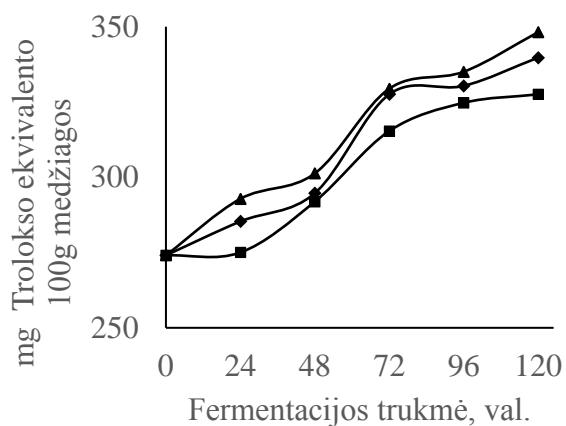
Atlikus fermentaciją pastebėtas antioksidacinio aktyvumo padidėjimas fermentuotose terpėse. Tai lėmė antrinių metabolitų, tokių kaip fenolinės rūgštys, flavonoidai, su laisvomis hidroksilo grupėmis, išsiskyrimas fermentacijos PRB metu. Pagal Juodeikienė ir kt. [102], panaudojant PRB – *Pediococcus acidilactici* KTU-05-7; *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10, po antrinių maisto produktų 72 val. fermentacijos, nustatytas antioksidacinio aktyvumo terpėje padidėjimas.

Šiaudų terpėje didžiausias antioksidacinis aktyvumas užfiksuotas po 120 val. su PRB *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, mažiausias su *L. sanfranciscensis* MR29, atitinkamai 334 mg ir 308 mg (padidėjo atitinkamai 21,90 % ir 12,32 %) pagal Trolokso ekvivalentą iš 100g medžiagos. Sėlenose didžiausia reikšmė gauta su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI, mažiausia su *L. sanfranciscensis* MR29, atitinkamai 231 mg ir 200 mg (padidėjo atitinkamai 36,63 % ir 18,31 %) pagal TE iš 100g medžiagos (3.17 pav.).



**3.17 pav.** Antioksidacinio aktyvumo priklausomybė nuo šiaudų (kairėje) ir sėlenų (dešinėje) terpės, fermentacijos trukmės ir PRB, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 (—), *L. sanfranciscensis* MW15 (◄—), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI (◄—), *L. crustorum* W19 (◄—) bei *L. sanfranciscensis* MR29 (◄—)

Panaudojant skirtingus mišinius, didžiausi antioksidaciniai aktyvumai šiaudų ir sėlenų terpėje išmatuoti su mišiniu II – atitinkamai 348 mg ir 240 mg (padidėjo atitinkamai 27,04 % ir 42,18 %) ir mažiausi su mišiniu III – 328 mg ir 214 mg (padidėjo atitinkamai 19,51 % ir 26,64 %) pagal TE iš 100g medžiagos (3.18 pav.).

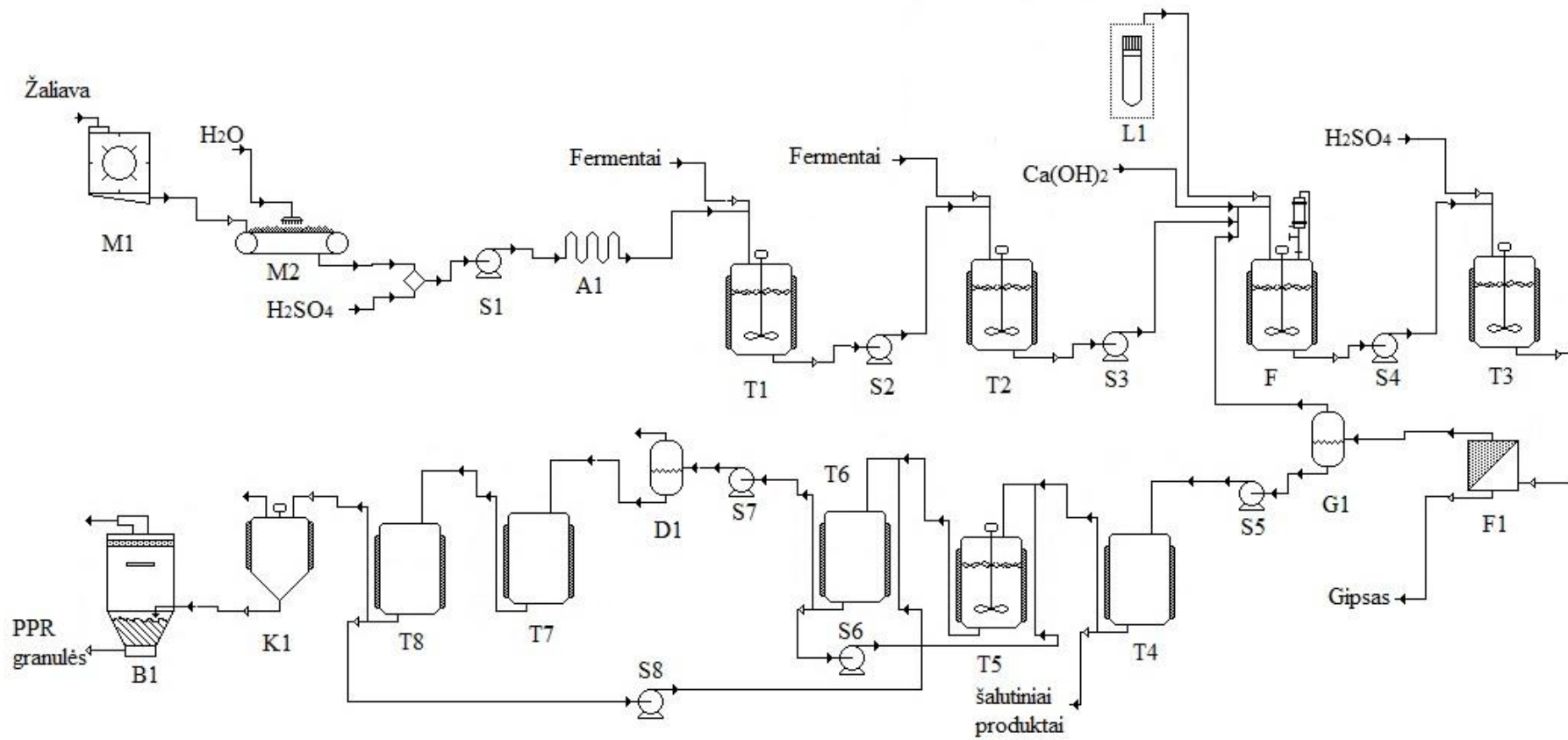


**3.18 pav.** Antioksidacinio aktyvumo priklausomybė nuo šiaudų (kairėje) ir sėlenų (dešinėje) terpės, fermentacijos trukmės ir PRB mišinių I (◄—), II (◄—) ir III (◄—)

## REKOMENDACIJOS

Atlikus tyrimus, prieita išvados, jog mikrobinės fermentacijos metu, su atrankiomis PRB gauta optiškai švari pieno rūgštis gali būti panaudota poli-pieno rūgšties gamybai. Remiantis naujausiais tyrimais ir mokslinėmis žiniomis nubraižyta principinė polimero gamybos schema (4.1 pav.). Technologinės linijos įrenginių sąrašas pateiktas 4.1 lentelėje.

Neapdorota lignoceliuliozinė arba krakmolinga žaliava patenka į malūną, M1 ir yra susmulkinama iki atitinkamo dydžio dalelių. Susmulkinta žaliava sudrėkinama distiliuotu vandeniu, pridedama praskiestos sieros rūgšties, toliau šlapia masė yra tiekiamą į autoklavą A1. Jame suardoma biomasės ląstelių struktūra ir dalinai degraduojama hemiceliuliozė (lignoceliuliozinė žaliava). Apdorota žaliava patenka į reaktorių T1 kuriame vykdoma fermentinė hidrolizė. Panaudojami atitinkami fermentai (pagal temperatūrą, savybes, pvz. hemiceliulazės). Atlikus pirminę hidrolizę, toliau reakcijos mišinys yra tiekiamas į antrąjį reaktorių T2, kuriame biomasė yra veikiama kitais fermentais (pvz. celiulazės). Atlikus fermentinę hidrolizę į fermentatorių F patenka 5 ir 6 anglies atomų, atitinkamai ksilozės ir gliukozės monomerais gausus reakcijos mišinys ir pradedamas fermentuoti atrankiais mikroorganizmais, kurie tiekiami iš kultivavimo terpės talpyklos L1. Esant poreikiui, galimas papildomų medžiagų tiekimas bakterijų gyvybingumui ir pastoviai koncentracijai reakcijos mišinyje palaikyti. Terpės pH yra reguliuojamas pridedant kalcio hidroksido. Mikrobinės fermentacijos pabaigoje mišinys, kuriame yra pieno rūgštis patenka į rūgštinimo talpą T3, kurioje tiekiant sieros rūgštį gaunamas gipsas. Toliau gipsas yra atskiriamas nuo skysčio per filtrą F1. Skystis patenka į garintuvą G1, dalis išgarinto vandens yra sukondensuojama ir grąžinama į fermentatorių F. Koncentruotas mišinys yra gryninamas – reaktoriuje T4, pašalinus šalutinius produktus, toliau tiekiamas į reaktorių T5, kuriame depolimerizuojami laktidai į monomeras ir T6 reaktoriuje yra pagaminamas laktido ciklinis dimeras. Likęs mišinys yra garinamas – distiliatoriuje D1. Į polimerizacijos reaktorių T7 patekę cikliniai dimerai yra sujungiami į poli-laktidą. Toliau polimeras yra atskiriamas (gryninimas) nuo susidariusių šalutinių produktų – talpoje T8, sukritalizuojamas kristalizeriuje K1. Toliau kristalinės formos polimeras patenka į granuliatorių, kuriame yra išdžiovinami kristalai ir suformuojamos granulės. Apdorota poli-pieno rūgštis yra pakuojama ir sandėliuojama.



4.1 pav. Poli-pieno rūgšties gamybos technologinės linijos principinė schema



**4.1 lentelė.** Technologinės linijos įrenginių žymėjimas

<b>Žymėjimas</b>	<b>Įrenginys</b>
M1	Malūnas
M2	Drėkintuvas
A1	Autoklavas
T1-T8	Talpos/Reaktoriai
F	Fermentatorius
L1	Bakterijų kultūra
G1	Garintuvas
F1	Filtrai
D1	Distiliatorius
K1	Kristalizatorius
B1	Džiovinuvas
S1-S8	Išcentriniai siurbiai

## IŠVADOS

1. Didžiausias fermentinės hidrolizės poveikis šalutinei agro-produktų žaliavai – šiaudams, nustatytas panaudojant fermentinį preparatą (Celustar XL); tinkamiausia hidrolizės trukmė parinkta 2 val. Optimali temperatūra, prie kurios fermentai buvo aktyviausi buvo 55 °C. Sėlenų hidrolizei parinktas optimalus fermentinio preparato AlphaStar Plus kiekis buvo 100 g/t žaliavos.
2. Nustatyta, jog šiaudų fermentinei hidrolizei įtakos turėjo pridėtinės medžiagos – druskos. Atitinkamų koncentracijų 50 mg/L CaCl<sub>2</sub> ir 100 mg/L of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O druskų koncentracijos padidino hidrolazių aktyvumą ir po hidrolizės nustatyti didesni susidariusių redukuotųjų sacharidų kiekiai, o NaCl druskos koncentracija 50–175 mg/L ribose hidrolazių aktyvumą sumažino.
3. Didžiausias PRB skaičius po 120 val. fermentacijos užfiksuotas su *Lactobacillus sanfranciscensis* MW15 – 9,34 log KSM/ml, o sėlenų terpėje su *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM 20081 – 9,49 log KSM/ml.
4. Didžiausias kiekis L-pieno rūgšties fermentuotoje šiaudų terpėje po 120 val. buvo su *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MI – 4,72 g/L (94,4 g/kg žaliavos), o mažiausias su *Lactobacillus sanfranciscensis* MR29 – 3,21 g/L (64,2 g/kg žaliavos). Sėlenų fermentuotoje terpėje didžiausias kiekis L-pieno rūgšties po 120 val. buvo su *Lactobacillus sanfranciscensis* MW15, o mažiausiai su *Lactobacillus sanfranciscensis* MR29, gautos reikšmės atitinkamai 5,43 g/L (108,6 g/kg žaliavos) ir 3,89 g/L (77,8 g/kg žaliavos). Šiaudų terpėje vidutiniškai redukuojančių sacharidų po 120 val. fermentacijos sumažėjo – 42,74 %, sėlenų terpėje – 27,86 %.
5. Nustatytas teigiamas sinergetinis PRB poveikis, didžiausias kiekis L-pieno rūgšties susidarė naudojant mišinį I (*L. sanfranciscensis* MW15, *L. crustorum* W19 bei *L. sanfranciscensis* MR29) ir mišinį II (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM 20081, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MI) fermentuotoje sėlenų terpėje buvo atitinkamai 6,36 ir 6,61 g/L (127,2 ir 132,2 g/kg žaliavos). Mažiausias L-pieno rūgšties kiekis gautas su trečiuoju mišiniu, kuris buvo 5,15 g/L (103 g/kg žaliavos) šiaudų terpėje ir 5,95 g/L (119 g/kg žaliavos) sėlenų terpėje. Šiaudų terpėje vidutiniškai redukuojančių sacharidų po 120 val. fermentacijos sumažėjo – 52,53 %, sėlenų terpėje – 32,55 %.

6. Po fermentacijos su PRB pastebėtas bendro fenolinių junginių padidėjimas šiaudų ir sėlenų terpėse. Didžiausias kiekis fermentuotoje šiaudų terpėje pastebėtas su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI kultūra, o mažiausias su *L. sanfranciscensis* MR29, atitinkamai 1187 mg ir 1147 mg pagal Galo rūgštį 100 g žaliavos. Sėlenų terpėje didžiausias kiekis su *L. sanfranciscensis* MW15, o mažiausias *L. sanfranciscensis* MR29, atitinkamai 766 mg ir 681 mg (pagal Galo rūgšties ekvivalentą iš 100g žaliavos).
7. Šiaudų terpėje didžiausias antioksidacinis aktyvumas užfiksuotas po 120 val. fermentacijos su PRB *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, mažiausias su *L. sanfranciscensis* MR29, atitinkamai 334 mg ir 308 mg (pagal Trolokso ekvivalentą 100g medžiagos). Sėlenose didžiausias *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI, mažiausia reikšmė gauta su *L. sanfranciscensis* MR29, atitinkamai 231 mg ir 200 mg (pagal Trolokso ekvivalentą iš 100g medžiagos).
8. Naudojant PRB mišinius fermentuotose šiaudų ir sėlenų terpėje didžiausias fenolinių junginių kiekis aptiktas naudojant mišinį II (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI), atitinkamai 1318 mg ir 799 mg (pagal Galo rūgšties ekvivalentą iš 100g žaliavos), mažiausias kiekis su mišiniu I (*L. sanfranciscensis* MW15, *L. crustorum* W19 bei *L. sanfranciscensis* MR29), atitinkamai 1274 mg ir 744 mg.
9. Panaudojant skirtingus PRB mišinius, didžiausi antioksidaciniai aktyvumai šiaudų ir sėlenų terpėje išmatuoti su mišiniu II (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MI) – atitinkamai 348 mg ir 240 mg ir mažiausi su mišiniu III (*L. crustorum* W19, *L. sanfranciscensis* MR29) – 328 mg ir 214 mg (pagal Trolokso ekvivalentą iš 100g medžiagos).

## LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. ERICKSON B., NELSON, J. E., WINTERS, P Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnology Journal*. 2012, 7(2), p. 176–185. [Žiūrėta 2015-05-06] Prieiga per doi:10.1002/biot.201100069
2. MICKEVIČIUS V. Biokatalizatoriai organinėje sintezėje. 2008, p. 86-87. Prieiga per: KTU Ebooks.
3. BAKARAT A., de VRIES H., ROUAU X. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review *Bioresour. Technol.*, 2013, 134, 362-373. [Žiūrėta 2015-05-06]. Prieiga per doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.169
4. AGBOR V. B., CICEK N., SPARLING R., et al. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Biotechnol. Adv.* 2011, 29, pp. 675-685. [Žiūrėta 2015-05-06]. Prieiga per doi:10.1186/s13568-017-0375-4
5. MORAIS S., MORAG E., BARAK Y., et al. Deconstruction of Lignocellulose into Soluble Sugars by Native and Designer Cellulosomes. *mBio*. 2012, 3. [Žiūrėta 2015-05-06]. Prieiga per doi: 10.1128/mBio.00508-12
6. ZHOU C. H., XIA X., C. X. LIN, et al. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 5588-5617. [Žiūrėta 2015-05-10]. Prieiga per doi: doi: 10.1039/c1cs15124j
7. SOMERVILLE C., YOUNGS H., TAYLOR C., et al. Sustainable bioenergy production from marginal lands in the US Midwest. *Long, Science*. 2010, 329, pp. 790-792. [Žiūrėta 2015-05-10]. Prieiga per doi:10.1038/nature11811
8. TAARNING E., OSMUNDSER C. M., YANG X., et al. Zeolite-catalyzed biomass conversion to fuels and chemicals. *Energy Environ. Sci.* 2011, 4, 793-804. [Žiūrėta 2015-05-10]. Prieiga per doi:10.1039/c004518g. ISBN 1754-5692
9. HARMSSEN P.F.H., HUIJGEN W.J.J., BAKKER R.C.C. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. *Food & Biobased Research*. 2010, 54 p. ISBN 9789085857570
10. CARVALHEIRO F., DUARTE L.C., GIRIO F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2008, vol. 67, pp. 849-864. [žiūrėta 2017-05-10] Prieiga per: doi:10.1.1.461.8516
11. Paveikslas. Prieiga per internetą: <https://www.google.com/patents/WO2010090591A1> [Žiūrėta 2017-05-05]

12. O'CONNOR R.P., WOODLEY R., KOLSTAD J.J., et al. Process for fraction-ating lignocellulosic biomass into liquid and solid products. Assignee U. S. A. Nature-works LLC, patent number. 2007, WO 2007120210. ISBN:1791-2377
13. FURKAN H., REMZI C. B., et al. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. School of Engineering and Materials Science. 2015, 63 p. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1039/C5PY00263J
14. CHERUBINI F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 2010, 51, 1412-1421. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.enconman.2010.01.015
15. MENON V., RAO M. Trends in bioconversions of lignocellulose: biofuels platform chemicals and biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 2012, 38, 522-550. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.pecs.2012.02.002
16. NIGAM P.S. Production of bioactive secondary metabolites, In: *Biotechnology for AgroIndustrial Residues Utilization*, Nigam, P.S., & Pandey, A. (Eds.). 2009, pp. 129-145, ISBN: 9781402099427
17. DZENAVIČIENĖ E.F., PEDIŠIUS N., ŠKĖMA R. Darni bioenergetika. Lietuvos energetikos institutas. 2011, p. 28-29.
18. STANKŪNAVIČIUS A. Zootechniko žinynas. LVA Gyvulininkystės institutas. 2011, p. 15.
19. AGNIHOTRY H., HIMANSHU S., KAUR R. Pre-treatment of Wheat Straw: A Review. Department of Biotechnology. 6(2), 2015, pp. 1536. [Žiūrėta 2017-05-10]. Prieiga per internetą: [http://www.rjpbcs.com/pdf/2015\\_6\(2\)/%5B228%5D.pdf](http://www.rjpbcs.com/pdf/2015_6(2)/%5B228%5D.pdf)
20. ZHANG R., JENKINS B. M. Commercial uses of Straw. *Agricultural Mechanization and Automation*. 2004, Vol 1.
21. STEVENSON L., PHILLIPS F., O' SULLIVAN K. Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2012, 63(8), pp. 1001–1013. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.3109/09637486.2012.687366
22. MERALI Z., HO J.D., COLLINS S.R., et al. Characterization of cell wall components of wheat straw following hydrothermal pretreatment and fractionation. The Biorefinery Centre, Institute of Food Research. 2013, 31:226-34. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1186/s13068-015-0207-1
23. SHEWRY P. The Healthgrain programme opens new opportunities for improving wheat for nutrition and health. *Nutr Bull*. 2009, 34, 225–231.

24. ALVIRA P., TOMAS-PEJO E., et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology Article in press*. 2009, 101(13), 4851-4861, [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.093
25. CARVALHEIRO F., DUARTE L.C., et al. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2008, 67(11) pp. 849-864.
26. HENDRIKS A.T., ZEEMAN G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2008, 100(1), p. 10-18. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.biortech
27. TAHERZADEH M.J., KARIMI K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, 9(9), pp. 1621- 1651. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms9091621
28. IMAI M., IKARI K., et al. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*. 2004, 17(2), pp. 79-83.
29. MOSIER N., WYMAM C., et al. (2005): Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2005, 96(6), pp. 673-686 [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025
30. KOOTSTRA A.M.J., BEEFTINK H.H., SCOTT E.L., et al. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, 46 (2), p. 126-131.
31. BlueFire Ethanol (2010). [Žiūrėta 2017-05-05] Prieiga per internetą: <http://bluefireethanol.com>
32. DEVENDRA P. S., RAKESH K. T. Acid And Alkaline Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass To Produce Ethanol As Biofuel. *International Journal of ChemTech Research*. 2013, Vol.5, No.2, p. 727-734. ISSN:0974-4290
33. CARA C., RUIZ E., et al. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*. 2008, 87(6), pp. 692-700. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.fuel.2007.05.008
34. ZIMBARDI F., VIOLA E. et al. Acid impregnation and steam explosion of corn stover in batch processes. *Industrial Crops and Products*. 2007, 26(2), pp. 195-206. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.indcrop.2007.03.005 ISSN:0926-6690

35. BALS B., ROGERS C., JIN M., et al. Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3:1. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1186/1754-6834-3-1
36. CHA Y., YANG J., AHN J.W., et al. The optimized CO<sub>2</sub>-added ammonia explosion pretreatment for bioethanol production from rice straw. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2014, 37(9), pp.1907–1915. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1007/s00449-014-1165-x
37. ZHU J.Y; PAN X.J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology*. 2010, Vol.101, No.13, pp.4992-5002. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.007
38. KUMAR P., MARRET D.M., DELWICHE M.J., et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & engineering chemistry research*. 2009, vol. 48, No.8, pp. 3713-3729. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1021/ie801542g
39. VERARDI A., De BARI I., RICCA E., et al. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. *Energy and the Sustainable Economical Development*. 2012, p. 96-115. ISBN 978-953-51-0008-9
40. KOSTYLEV M., WILSON D. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Biofuels*. 2012, 3(1), p.61-70. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi:10.5155/BFS.11.150 ISSN:1759-7269
41. MAITAN-ALFENAS G.P., VISSER E., GUIMARARAES V., Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. *Food Bioprocessing*. 2015, p. 44-49.
42. VAN DYK J.S., PLETSHCHKE B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol Adv*. 2012, 30, pp.1458-1480. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.002
43. KUMAR D., MURTHY G.S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. *Biotechnol Biofuels*. 2013, 6:63. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1186/1754-6834-6-63

44. BHAUMIK P. DHEPE P. L. Conversion of Biomass into Sugars, in *Biomass Sugars for Non-Fuel Applications*. 2015, p. 1-53. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1039/9781782622079-00001 ISBN:978-1-78262-207-9
45. VIKTOR M. J., ROSE S. H., van ZYL W. H., et al. Raw starch conversion by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Aspergillus tubingensis* amylases. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6, 167. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1186/1754-6834-6-167
46. PAVEZZI F. C., GOMES E., DA SILVA R. Production and characterization of glucoamylase from fungus *Aspergillus awamori* expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using different carbon sources. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008, 39(1), pp. 108–114. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1590/S1517-83822008000100024
47. BOZELL J.J., HOLLADAY J.E., JOHNSON D., et al. *Top Value Added Chemicals from Biomass Volume II: Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin* Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2007, 87 p.
48. SINGH R. Facts, growth, and opportunities in industrial biotechnology. *Org. Process Res. Dev.* 2011, 15, pp. 175–179. [Žiūrėta 2015-05-01]. Prieiga per doi: 10.1021/op100312a
49. [Žiūrėta 2017-05-10]. Prieiga per internetą: <http://www.duponttateandlyle.com/zemea>.
50. [Žiūrėta 2017-05-10]. Prieiga per internetą: <http://www.natureworksllc.com/>.
51. [Žiūrėta 2017-05-10]. Prieiga per internetą: <http://www.mirelplastics.com/>.
52. [Žiūrėta 2017-05-10]. Prieiga per internetą: <http://www.synthezyme.com/>.
53. MARTINEZ F. A. C., BALCIUNAS E. N., SALGADO J. M., et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2013, 30(1), p. 70–83. [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi:10.1016/j.tifs.2012.11.007
54. TSUJI H., SAEKI T., TSUKEGI T., et al. Comparative study on hydrolytic degradation and monomer recovery of poly(L-lactic acid) in the solid and in the melt. *Polymer Degradation and Stability*. 2008, 93(10), p. 1956-1963. [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2008.06.009
55. KHALID K. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*. 2011, vol. 1, no. 3, p. 1-13.
56. GAO C., MA C., XU P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnol Adv.* 2011, 29(6):930-9. [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.022



57. ROBERTO I., MUSSATTO S., MANCILHA I., et al. The effects of pH and nutrient supplementation of brewer's spent grain cellulosic hydrolysate for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Biotechnology*. 2007, 131(2). [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.07.920
58. CUI F., LI Y., WAN C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(2). [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.biortech.2010.09.063
59. WEE Y.J., KIM J.N., RYU H.W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2006; 44(2), pp. 163–172.
60. EITEMAN M. Microbial production of lactic acid. *Biotechnology letters*. 2015, 37(5).
61. ROMANI A., YANEZ, R., GARROTE G., et al. SSF ~ production of lactic acid from cellulosic biosludges. *Bioresource Technology*. 2008, 99(10), pp. 4247-4254.
62. MASTEIKIENĖ R. R. Maisto produktų mikrobiologija. I knyga. KTU leidykla "Technologija". 2010, p. 187. Prieiga per: KTU Ebooks. ISBN 9955-09-243-2
63. CAROL A.R., LEON M.T.D. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology*. 2010, 193(3), 157-168. [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi: 10.1007/s00203-010-0668-3
64. PILAR C.M., SAMUEL A., KAROLA B., et al. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food and Bioprocess Technology*. 2008, 1(1), pp. 43- 63.
65. JIN Y.L., AI H.L., CHENG J., et al. First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary Microbiology*. 2009, 136(3-4), pp. 314-320. [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.vetmic.2008.11.027
66. DELPHINE L., BENEDICTE C., ANNABELLE F., et al. Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, 22(2), pp. 143-149. [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi:10.1016/j.copbio.2010.12.001
67. MAYO B., PIEKARCZYK T. A., PABLO A. et al. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria novel applications*. Massachusetts: WileyBlackwell. 2010.
68. BUDDHIMAN T., JYOTI P.T., ULRICH S., et al. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented bamboo tender shoots of North East India.

- International Journal of Food Microbiology*. 2008, 121(1), pp. 35-40. [Žiūrėta 2017-05-01].  
Prieiga per doi:10.1007/s13197-014-1456-x
69. LATEEF A., OLOKE J.K., OYENIYI S.O., et al. Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 24, pp. 2369-2374. [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi:10.1007/s11274-008-9749-8
70. LI L., SHEWRY P.R., WARD J.L. Phenolic acids in wheat varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, pp. 9732–9739. [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi:10.1021/jf801069s
71. KIM K.H.; TSAO R.; YANG R., et al. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem.* 2006, 95, pp. 466–473. [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi:10.1016/j.jcs.2012.07.006
72. BETA T., NAM S., DEXTER J.E., et al. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-mill fractions. *Cereal Chem.* 2005, 82, pp.390–393. [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi:10.1094/CC-82-0390
73. LADDOMADA B., CARETTO S., MITA G. Wheat Bran Phenolic Acids: Bioavailability and Stability in Whole Wheat-Based Foods. *Molecules.* 2015, 20, pp. 15666-15685. [Žiūrėta 2017-05-02]. Prieiga per doi:10.3390/molecules200915666
74. DUHAN J. S., MEHTA K., SADH P. K., et al. Bio-enrichment of phenolics and free radicals scavenging activity of wheat (WH-711) fractions by solid state fermentation with *Aspergillus oryzae*. *African Journal of Biochemistry Research.* 2016, 10(2), pp. 12-19. [Žiūrėta 2017-05-01]. Prieiga per doi:10.5897/AJBR2015.0854, ISSN 1996-0778
75. WOJDY OA., OSZMAI S.J. Comparison of the content phenolic acid, atochopherol and the antioxidant activity in oat naked and weeded. *Elec. J. Env. Agric. Food Chem.* 2007, 6, pp. 1980-1988.
76. STRATIL P., KLEJDUS B., KUBAN V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta.* 2007, 71, p. 1741-1751. [Žiūrėta 2017-05-10]. Prieiga per doi:10.1016/j.talanta.2006.08.012
77. DUJAN J.S., BHARDWAJ M., SUREKHA. Free radical-scavenging and antimutagenic potential of acetone, chloroform and methanol extracts of leaf of *Argemone mexicana*. *Int. J. Pharma. Bio. Sci.* 2011a, 2(1), pp. 455- 464.

78. DUJAN J.S., BHARDWAJ M., SUREKHA. Free radical-scavenging and antimutagenic potential of acetone, chloroform and methanol extracts of fruit of *Argemone maxicana*. *Afr. J. Biotechnol.* 2011b, 10(43), pp. 8654-8661.
79. DUJAN J.S., RANA A., SUREKHA. Antimicrobial and free radical scavenging activity of selective medicinal plants combination. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015, 4(3), pp. 1202-1216.
80. RANA A., SAHARAN P., SADH P.K., et al. Free radical scavenging and antimicrobial potential of mixture of selective medicinal plants. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2014, 7(4), pp. 27-32. ISSN: 09742441
81. SAHARAN P., DUHAN J.S. Studies on antioxidant activity, total phenolic and flavanoid contents of leaf extracts of *Thuja orientalis*. In: Khanna DR, Chopra AK, Matta G, Singh V, and Bhutiani R. (Eds). *Impact of Global Climate Change on Earth Ecosystem*. 2013, pp. 193-203.
82. SAHARAN P., DUHAN J.S, GAHLAWA S.K., et al. Antioxidant potential of various extracts of stem of *Thuja orientalis*: In vitro study. *Int. J. Applied Biol. Pharm. Technol.* 2012, 3(4), pp. 264-271.
83. BAILEY M. J., BIELY P., POUTANEN K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology.* 1992, 23, p. 257-270.
84. MILLER G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry.* 1959, 31 (3), p. 426-428.
85. MEGAZYME. D-lactic acid (Rapid) and L-lactic acid (L-Lactate) Assay procedures. K-Dlate 07/14, p. 1-21.
86. NOLL F. L-(+)-Lactate. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H. U., ed.), 3rd ed. VCH Publishers (UK) Ltd.1988, vol. 6, pp.582-588.
87. GAWEHN K. D-(-)-Lactate. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H. U., ed.), 3rd ed. VCH Publishers (UK) Ltd.1988, vol. 6, pp.588-592.
88. BLOIS M.S. Antioxidant determinations by the use of a stablefree radical, *Nature*, 181. 1958, p. 1199–1200.
89. SINGLETON V.L., ROSSI J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphofungistic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* 16. 1965, p. 144–158.

90. MYERS J. A., CURTIS B.S., CURTIS W. R. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics* 2013 [Žiūrėta 2017-05-10]. Prieiga per doi:10.1186/2046-1682-6-4
91. FENILLA F., YOGENDRA S. Optimal control of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Resource-Efficient Technologies*. 2016, Vol.1(1), pp. 96-104. [Žiūrėta 2017-05-15]. Prieiga per doi:10.1016/j.reffit.2016.11.006
92. BARRET D. M., KUMAR P., DELWICHE M.J., et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2009. Prieiga per doi: 10.1021/ie801542g.
93. PEIJIN J. D., MOJOLOVIC L.V., PEIJIN D.J., et al. Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition. *Fuel*. 2015, Vol. 142, pp. 58-64. [Žiūrėta 2017-05-10]. Prieiga per doi: 10.1016/j.fuel.2014.10.077
94. HOMAYOUNI A., EHSANI M. R., AZIZI A., et al. Spectrophotometrically Evaluation of Probiotic Growth in Liquid Media. *Asian Journal of Chemistry*. 2008, Vol. 20, No. 3, pp. 2414-2420.
95. WANG J., WANG Q., XU Z., et al. Effect of fermentation conditions on L-lactic acid production from soybean straw hydrolysate. *Journal in Microbiology Biotechnology*. 2015, 25(1), pp. 26-32. [Žiūrėta 2017-05-10]. Prieiga per doi: 10.4014/jmb.1405.05025
96. MUSSATO S. I., FERNANDES M., MANCILHA I. M., et al. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *Biochemical Engineering Journal*. 2008, Vol. 40, 3, pp. 437–444. [Žiūrėta 2017-05-13]. Prieiga per doi: 10.1016/j.bej.2008.01.013
97. JUODEIKIENE G., ŽADEIKE D., CIZEIKIENE D., et al. Bioconversion of agro-industrial by-products to lactic acid using *Lactobacillus sakei* and two *Pediococcus* spp. strains. *Int. J. Food Sci. Technol*. 2016a, 51, 2682–2691. [Žiūrėta 2017-05-10]. Prieiga per doi: doi:10.1111/ijfs.13258
98. PLESSAS S., BOSNEA L., PSARIANOS C., et al. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresour. Technology*. 2008, 99(13), pp. 5951-5955. Prieiga per doi: 10.1016/j.biortech.2007.10.039

99. MARTINS S., MUSSATTO S. I., MARTINEZ-AVILA G. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*. 2011, 29, 365-373. [Žiūrēta 2017-05-10]. Prieiga per doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.008
100. BHANJA T., KUMARI A., BANERJEE R. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. *Bioresource Technology*. 2009, 100, pp.2861–2866.
101. RANDHIR R., SHETTY K. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovations Food Sci Emerg Technol*. 2007, 8, pp. 197–204.
102. JUODEIKIENE G., CIZEIKIENE G., CESKEVICIUTE V., et al. Solid-State Fermentation of *Silybum marianum* L. Seeds Used as Additive to Increase the Nutritional Value of Wheat Bread. *Food Technol. Biotechnol*. 2013, 51 (4), pp.528–538. ISSN 1330-9862
103. WALCZAK E. O., WALCZAK P. Production of L-Lactic Acid from D-Xylose for the Synthesis of Biopolymers. *Environmental and Biological Sciences*. 2015, 18-19. [Žiūrēta 2017-05-14]. Prieiga per doi:10.15242/IICBE.C0315098

## MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DARBO TEMA SĄRAŠAS

1. Čižeikienė, Dalia; Rimkevičius, Rokas; Damašius, Jonas; Juodeikienė, Gražina. Lactic acid production from agro-industrial by-products applying by enzymatic hydrolysis and lactic acid bacteria fermentation // Chemistry and chemical technology 2017 : proceedings of the international conference, April 28th, 2017, Kaunas. Kaunas: Kauno technologijos universitetas. ISSN 2538-7359. 2017, p. 98.
2. Rimkevičius, Rokas; Čižeikienė, Dalia; Juodeikienė, Gražina; Damašius, Jonas; Bartkienė, Elena. Bioconversion of agro-industrial by-products to lactic acid applying by enzymatic hydrolysis and lactic acid bacteria fermentation // Foodbalt 2017 : 11th Baltic Conference on Food Science and Technology "Food science and technology in a changing world", Jelgava, April 27-28, 2017 : abstract book / Latvia University of Agriculture Faculty of Food Technology. [S.l.: s.n, 2017]. ISSN 2501-0190. 2017, p. 124.
3. Rezultatai planuojami pristatyti konferencijoje ATHENS2017 5th International Conference On Sustainable Solid Waste Management 21–24 June 2017. D. Cizeikiene, J. Damasius, R. Rimkevicius, G. Juodeikiene. Bioconversion of lignocellulosic agro-industrial by-products to lactic acid applying by lactic acid bacteria.