



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Agnė Katilevičiūtė**

**ENZIMINIO FOSFOLIPIDŲ SKAIDYMO, VYKDOMO  
GLIUKOZĖS SIRUPO GAMYBOJE IŠ KVIEČIŲ KRAKMOLO,  
TYRIMAI IR OPTIMIZAVIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovas**

dr. Edita Mažonienė

**KAUNAS, 2018**

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

**ENZIMINIO FOSFOLIPIDŲ SKAIDYMO, VYKDOMO  
GLIUKOZĖS SIRUPO GAMYBOJE IŠ KVIEČIŲ KRAKMOLO,  
TYRIMAI IR OPTIMIZAVIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

**Pramoninė biotechnologija (621J70004)**

**Vadovas**

dr. Edita Mažonienė

**Recenzentas**

doc. dr. Joana Bendoraitienė

**Projektą atliko**

Agnė Katilevičiūtė

**KAUNAS, 2018**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

**Agnė Katilevičiūtė**

(Studento vardas, pavardė)

**Pramoninė biotechnologija, 621J70004**

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Enziminio fosfolipidų skaidymo, vykdomo  
gliukozės sirupo gamyboje iš kviečių krakmolo, tyrimai ir optimizavimas“  
**AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

20 \_\_\_\_\_ 18 m. \_\_\_\_\_ 05 \_\_\_\_\_ 29 d.  
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Agnės Katilevičiūtės**, baigiamasis projektas tema „Enziminio fosfolipidų skaidymo, vykdomo gliukozės sirupo gamyboje iš kviečių krakmolo, tyrimai ir optimizavimas“ 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

SANTRAUKA .....	5
SUMMARY .....	6
SANTRUMPOS .....	7
ĮŽANGA.....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	13
1.1 Kviečio grūdo sandara.....	13
1.2 Krakmolas .....	14
1.2.1 Krakmolo sąveika su lipidais .....	14
1.2.2 Kviečio lipidai .....	14
1.3 Fosfolipidų hidrolizė .....	16
1.3.1 Rūgštinė hidrolizė.....	16
1.3.2 Fermentinė hidrolizė.....	16
1.4. Lipazės .....	17
1.4.1 Triacilglicerolio lipazės.....	17
1.4.2 Fosfolipazės.....	18
1.5 Lipidų analizės metodai.....	21
1.5.1 Lipidų ekstrakcija .....	21
1.5.2 Metodai naudojant organinių tirpiklių mišinį.....	22
1.5.3 Soksleto metodas .....	22
1.5.4 Bligh ir Dyer metodas .....	23
1.5.5 Efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC).....	23
1.5.6 Ultra aukšto našumo skysčių chromatografija (UPLC).....	23
1.5.7 Masių spektrometrija (MS) .....	24
1.5.8 Dujų chromatografija (GC) .....	25
1.6 Gliukozės sirupo gamyba .....	26
1.6.1 Skystinimas .....	26
1.6.2 Cukrinimas .....	27
1.6.3 Ultrafiltracija .....	27
1.7. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas .....	27
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI .....	29
2.1 Tiriamojo projekto darbų schema.....	29
2.2 Medžiagos ir tirpikliai .....	29
2.3 Prietaisai .....	31
2.4 Tiriamasis objektas.....	32
2.5 Metodai.....	32
2.5.1 Lipidolizės tyrimai (fermentacijos optimizavimas).....	32
2.5.2 Lipidų ekstrakcija .....	33

2.5.3	Efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC).....	33
2.5.4	Molekulinių sietų chromatografija (SEC) .....	34
2.5.5	Ultrafiltracija .....	35
2.5.6	Putojamumo nustatymas.....	37
2.5.7	Šviesos sugerties nustatymas.....	37
2.5.8	Azoto ir baltymų kiekio nustatymas.....	38
2.5.9	Fosforo kiekio nustatymas.....	39
2.5.10	Centrifuginis testas .....	40
2.5.11	Kapiliarinės difuzijos testas (CST).....	40
2.5.12	Masių spektrometrija (MS / MS).....	40
2.5.13	Rezultatų tikslumo ir patikimumo įvertinimas .....	42
3.	TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	43
3.1	Laboratoriniai fermentacijos bandymai.....	43
3.1.1	Bandymai su gamyboje naudojama lizofosfolipaze .....	43
3.1.2	Bandymai su F1 ir kitomis lipazėmis .....	45
3.2.	Technologiniai bandymai .....	47
3.2.1	Preliminarus sirupo paruošimo filtravimui įvertinimas .....	47
3.2.2	Centrifuginis testas .....	48
3.2.3.	Sacharidų sudėties įvertinimas .....	48
3.2.4	Lipidų sudėties nustatymas .....	49
3.3	Technologiniai ultrafiltracijos bandymai .....	50
3.3.1	Filtracijos produktų tyrimai .....	52
3.3.1.1	Spektrofotometriniai tyrimai ir elementinė analizė .....	52
3.3.1.2	Masių spektrometrija.....	53
3.3.1.3	Produkto putojimo tyrimai .....	54
4.	REKOMENDACIJOS.....	56
	IŠVADOS.....	58
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	59
	PUBLIKACIJOS MAGISTRO TEZIŲ TEMA .....	64
	PADĖKOS .....	65
	PRIEDAI .....	66
	1. priedas .....	66
	2. priedas .....	67
	3. priedas .....	69

Katilevičiūtė Agnė. Enziminio fosfolipidų skaidymo, vykdomo gliukozės sirupo gamyboje iš kviečių krakmolo, tyrimai ir optimizavimas. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas dr. Edita Mažonienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: technologijų mokslai, biotechnologijos.

Reikšminiai žodžiai: *gliukozės sirupas, kviečiai, krakmolai, ultrafiltracija, fermentai, lipidai, fermentinė hidrolizė.*

Kaunas, 2018. 68 p.

## SANTRAUKA

Gliukozės sirupas yra gaminamas iš skirtingos botaninės kilmės žaliavų, tarp jų – kukurūzų, kviečių ir bulvių krakmolo. Lietuvos geografinė padėtis tokia, kad joje geriausiai auga kviečiai, todėl gliukozės sirupo gamybai ši žaliava yra praktiškiausia. Kviečių krakmolai – taip pat ir viena iš sudėtingiausių žaliavų. Jame yra didelis kiekis nekrakmolinių priemaišų, tokių kaip baltymai ir lipidai. Dauguma kviečių krakmolo lipidų vadinamieji lizofosfolipidai, kurie labai gerai tirpsta vandenyje ir yra stiprūs emulsikliai. Norint pašalinti iš produkto, reikia juos paversti į mažiau tirpius junginius, tokius kaip laisvosios riebalų rūgštys, todėl drauge su fermentine krakmolo hidrolize atliekamas ir fermentinis lizofosfolipidų skaidymas. Pastebėta, kad pramonėje taikomas lipidų skaidymas nėra optimalus ir net po ultrafiltracijos tolimesniuose sirupo rafinavimo etapuose produktas intensyviai putoja. Pagrindinis šio projekto tikslas buvo parinkti efektyvesnį lipazių mišinį gliukozės sirupo gamybai iš kviečių krakmolo, kuris užtikrintų grynesnį filtracijos produktą.

Fermentinės fosfolipidų konversijos gliukozės sirupe tyrimas ir optimizavimas atliktas laboratorijoje išbandžius lizofosfolipazę, naudojamą gamyboje, ir keturis lipazių mišinius su ja. Po ekstrakcijos lipidų sudėtis nustatyta efektyviaja skysčių chromatografija su įkrauto aerolio detektoriumi. Ultrafiltracijos procesas tirtas su „*Micro Pilot Plant*“ sistema ir vamzdelinėmis polimerinėmis membranomis. Filtracijos produktų kokybė įvertinta nustatant sacharidų molekulinį masių pasiskirstymą, fosforo ir azoto kiekius, putojimą, pusiau kiekybinę lipidų analizę ultrafiltracijos permeatuose atlikta su masių spektrometru.

Mažiausio tirpumo lipidų skaidymo produktai gauti su lizofosfolipazės ir fosfolipazės PLA1 fermentų mišiniu. Optimizuotos fermentacijos sąlygos: 60 °C, 5,5 pH, fermentacijos trukmė 24 valandos. Modifikuotos fermentacijos sirupas po ultrafiltracijos proceso buvo švaresnis nei tokiomis pat sąlygomis filtruotas sirupas, gautas su gamyboje naudojamu filtruojamumo fermentų mišiniu. Lyginant modifikuotas ir gamybinės fermentacijos permeatus, modifikuotos fermentacijos permeate nustatytas du kartus mažesnis putojamumas.

Katilevičiūtė Agnė. *Investigation and Optimization of Enzymatic Conversion of Phospholipids in the Production of Glucose Syrup from Wheat Starch* / Master's thesis in industrial biotechnology / supervisor dr. Edita Mažonienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: technology science, biotechnology.

Key words: *glucose syrup, wheat, starch, ultrafiltration, enzymes, lipids, enzymatic hydrolysis.*

Kaunas, 2018. 68 p.

## SUMMARY

The geographical location of Lithuania is such that wheat is best grown there, so for the production of glucose syrup it is the most practical raw material. However, wheat starch is one of the most complex raw materials also. Wheat starch has a high content of non-starch impurities, like proteins and lipid compounds. The majority of the wheat starch lipids are called lysophospholipids, they are highly soluble in water and strong emulsifiers too. In order to remove them from the product, it is necessary to convert them to less soluble compounds like free fatty acids. Starch conversion to sugars is carried out using enzymatic hydrolysis, together with enzymatic degradation of lysophospholipids. However, it has been observed that even after the stage of ultrafiltration the product is intensely foaming in the further stages of the syrup refining. The main task of this investigation was to select a more efficient lipase mixture for the production of glucose syrups from the wheat starch, which will provide a purer filtration product.

Investigation and optimization of enzymatic conversion of phospholipids from glucose syrup was tested with 4 different lipase mixtures. The lipid profile was determined using a modified Blight and Dyer method for the lipid extraction with the following analysis by the high performance liquid chromatography and a charged aerosol detector. Ultrafiltration process was carried out with a pilot plant system and tubular polymeric membranes. The quality of the membrane feed and filtration products was evaluated by determining the molecular masses of saccharides with the size exclusion chromatography, the amount of phosphorous, nitrogen, protein, foaming capacity and stability. Semi-quantitative lipid analysis after ultrafiltration was determined with a mass spectrometer.

The optimal fermentation process was performed by lysophospholipase and phospholipase PLA1, conditions for the least amount of non-degraded phospholipids were found to be 60 °C, pH 5,5 in 24 hours. The quality of the optimized fermentation permeate was better than that of the conventional fermentation. The modified fermentation permeate had two times weaker foaming capacity and foaming stability properties.

## SANTRUMPOS

CAD (*charged aerosol detector*) – įkrauto aerozolio detektorius;  
CIP (*cleaning in place*) – įrenginio (membranų stendo) plovimas;  
DE – dekstrozės ekvivalentas;  
ESI – elektropurkštuvinė jonizacija;  
FAME (*fatty acid methyl esters*) – riebalų rūgščių metilo esteriai;  
FFA (*free fatty acids*) – laisvosios riebalų rūgštys;  
GPC – glicerilfosfocholinas  
HPLC (*high-performance liquid chromatography*) – efektyvioji skysčių chromatografija;  
LPA – lizofosfatidinė rūgštis;  
LPC – lizofosfatidilcholinas;  
LPE – lizofosfatidiletanolaminas;  
LPI – lizofosfatidilinozitolis;  
LPL – lizofosfolipidai (monoacilglicerofosfolipidai);  
MS – masių spektrometrija;  
m/z – jono masės ir krūvio santykis;  
n – lygiagrečių mėginių skaičius;  
PA – fosfatidinė rūgštis;  
PAM – paviršinio aktyvumo medžiaga;  
PC – fosfatidilcholinas;  
PE – fosfatidiletanolaminas;  
PG – fosfatidildglicerolis;  
PI – fosfatidilinozolis;  
PL – fosfolipidai (diacilglicerofosfolipidai)  
PLA1 – fosfolipazė A1;  
PLA2 – fosfolipazė A2;  
PLC – fosfolipazė C;  
PLD – fosfolipazė D;  
PS – fosfatidilserinas;  
RI – lūžio rodiklis;  
SN – standartinis nuokrypis;  
SP – standartinė paklaida;  
SPP – santykinė standartinė paklaida;  
TG – trigliceridai;



TMP – transmembraninis slėgis;

UF – ultrafiltracija;

v/v – tūrinė koncentracija (tūrių santykis).

## IŽANGA

Gliukozės sirupo gamyba iš krakmolo vykdoma jau nuo XIX a. pradžios. Gliukozės sirupas yra gaminamas iš įvairiausių botaninės kilmės žaliavų, tarp jų – kukurūzų, kviečių ir bulvių krakmolo. Lietuvos geografinė padėtis tokia, kad joje geriausiai auga kviečiai, todėl gliukozės sirupo gamybai ši žaliava yra praktiškiausia. Gliukozės sirupas naudojamas ne tik maisto ir gėrimų pramonėje, bet kaip užpildančioji, rišančioji ir antikristalinė medžiaga.

Gliukozės sirupo gamyboje iš kviečių krakmolo ypač svarbus yra rafinavimo etapas, susidedantis iš keleto kitų etapų: ultrafiltracijos, sorbcijos aktyvinta anglimi, filtracijos jonitais ir kt. Visi etapai yra svarbūs ir turi lemiamos įtakos galutinio produkto kokybei. Kviečių krakmolas yra viena iš sudėtingiausių žaliavų gliukozės sirupo gamybai iš krakmolo. Tai lemia jame esantis gana didelis kiekis nekrakmolinių priemaišų – baltymų ir lipidinių junginių.

Didžioji dalis kviečių krakmolo lipidų – vadinamieji lizofosfolipidai: gerai tirpūs vandenyje, stiprūs emulsikliai. Efektyviam šių junginių pašalinimui iš sirupo ultrafiltracijos metu, prieš šį etapą būtina juos kaip įmanoma labiau konvertuoti į mažiau tirpius vandenyje junginius, tai yra į laisvasias riebalų rūgštis. Būtent todėl sirupo gamybos cukrinimo etape yra vykdoma fermentinė lipidų konversija panaudojant lizofosfolipazes. Pramoniniu mastu yra gaminama keletas tokių lipazių, kurios yra skirtos kviečių krakmolo lipidų skaidymui. Visgi pastebėta, kad ir po ultrafiltracijos etapo, tolimesniuose sirupo rafinavimo žingsniuose produktas gana stipriai putoja. Putojimas rodo, kad produkte lieka daug paviršinio aktyvumo medžiagų (PAM).

Šio **projekto tikslas** buvo parinkti efektyvesnį lipazių mišinį gliukozės sirupo gamybai iš kviečių krakmolo, kuris užtikrintų grynesnį filtracijos produktą. Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti tokie **uždaviniai**:

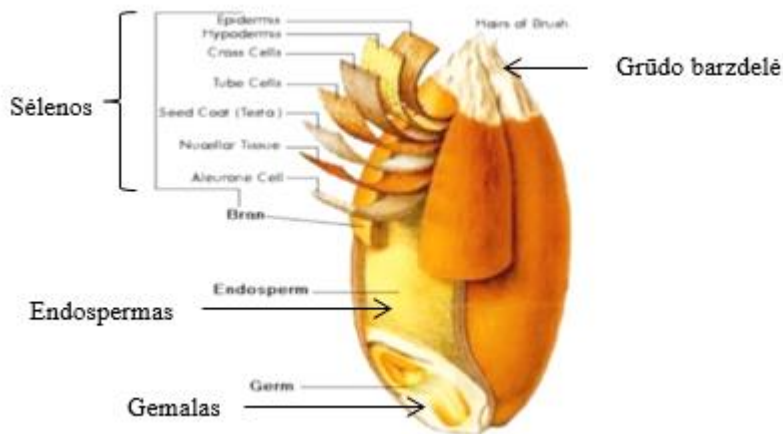
1. Ištirti pramonėje taikomo fermentinio lipidų skaidymo produktus, įvertinant galimą jų įtaką ultrafiltracijos produkto grynumui;
2. Laboratorijos sąlygomis pasiruošti modelinius gliukozės sirupo pavyzdžius, panaudojus 4 skirtingas lipazes ir jų mišinius, parinkti optimalų mišinį ir sąlygas, kuriomis gaunami mažiausio tirpumo lipidų skaidymo produktai;
3. Patikrinti parinktojo lipazių mišinio veikimą ir gaunamo produkto grynumą didesnės apimties lipidolizės ir filtracijos bandymu.

Darbo metu buvo pritaikyta informacija ir praktinė patirtis, įgyta kviečių biorafinavimo įmonėje AB „Amilina“. Analizuojant surinktą informaciją, tyrimo metu buvo konsultuojamasi su mokslinių tyrimų laboratorijos tyrėjais. Darbo rezultatai aktualūs įmonei tobulinant gliukozės sirupų produktų kokybę.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Kviečio grūdo sandara

Kviečio grūdai paprastai būna ovalo formos, tačiau skirtingos rūšies kviečiai gali būti nuo sferinės ir ilgios, siauros ar suplotos formos. Grūdai yra nuo 5 iki 9 mm ilgio, o sveria nuo 35 iki 50 mg. Kviečio grūdo sudedamosios dalys yra 2–3% gemalo, 13–17% sėlenų ir 80–85% endospermo (visos sudedamosios dalys perskaičiuotos į sausąją medžiagą) (žr. 1.1 pav.) [1].



1.1 pav. Kviečio grūdo sandara [1]

Sėlenas sudaro luobelė ir aleurono sluoksnis. Luobelė, susidedanti iš kelių sluoksnių, dengia grūdą ir saugo jo vidų (endospermą) nuo išorės veiksnių – kenkėjų, pelėsių, bakterijų poveikio. Vaisinė luobelė lengvai nusilupa nuo grūdo, o sėklinė luobelė (testa) stipriai suaugusi su aleurono sluoksniu. Aleurono sluoksnis susideda iš vienos eilės stambių storasienių ląstelių, užpildytų smulkiais grūdeliais – baltymais, riebalais, sacharidais, mineralinėmis medžiagomis, fermentais, pentozanais. Sėlenose yra skaidulinių medžiagų (celiuliozės, hemiceliuliozės), B grupės ir kitų vitaminų (E, H, PP, karotino, folinės rūgšties.) bei mineralinių medžiagų, kurios sudaro 7,2% (neorganinių druskų, P, K, Ca, Zn, Mn, Cu, J, Se ir kt.).

Endospermas – tai miltinis grūdo branduolys, sudarytas iš stambių ląstelių, kurios užpildytos krakmolo grūdeliais. Endosperme yra daugiausia maisto atsargos, reikalingos augant sėjinukui. Tarpuose tarp krakmolo grūdelių yra baltymų (13%), riebalų (1,5%). Mineralų (pelenų) ir maistingųjų skaidulų kiekis yra gana mažas (0,5–1,5%). Kuo grūdai didesni, tuo daugiau endospermo juose.

Gemale yra daug baltymų (25%) ir lipidų (8–13%), mineralų kiekis taip pat gana didelis (4,5%). Kviečių gemalas yra svarbus vitamino E šaltinis [1].

## 1.2 Krakmolas

Tai didelės molekulinės masės angliavandenis (polisacharidas), sudarytas iš daugybės D-gliukozės molekulių, tarpusavyje susijungusių  $\alpha$ -1,4 ir  $\alpha$ -1,6 glikozidinėmis jungtimis. Grūdai saugo energiją krakmolo pavidalu. Krakmolo kiekis kviečiuose gali svyruoti nuo 60 % iki 75% viso grūdo sauso svorio. Kvietyje yra dviejų tipų krakmolo granulės: didelės (25-40  $\mu\text{m}$ ), lęšiuko formos, ir mažos, sferinę formą turinčios (5-10  $\mu\text{m}$ ) dalelės. Krakmolą sudaro du angliavandeniai – amilozė (20–30 %) ir amilopektinas (70–80 %). Amilozė turi linijinę struktūrą, kuri dėl savo ilgumo būna susisukusi į spiralę. Amilozės grandinėje gliukozės žiedai būna susijungę  $\alpha$ -1,4 glikozidinėmis jungtimis. Amilopektino struktūra šakota. Amilopektiną sudaro keli milijonai gliukozės žiedų, kurie tiesiojoje grandinės dalyje susijungę  $\alpha$ -1,4 glikozidinėmis jungtimis, o atšakos susijungusios  $\alpha$ -1,6 glikozidinėmis jungtimis. Amilopektinas yra vyraujantis krakmolo granulėse. Gamtoje nebūna atskirai amilozės ar amilopektino, bet jų agregatas kartu ir sudaro krakmolo granulę [1]. Skirtingos botanikos kilmės krakmolo granulės skiriasi viena nuo kitos savo forma, dydžiu ir funkcinėmis savybėmis, tačiau pagrindinė cheminė sudėtis ir molekulinė struktūra yra panaši. Svarbiausias veiksnys kuris diferencijuoja fizikines ir chemines krakmolo savybes, yra amilozės ir amilopektino santykis. Krakmolo granulė susideda iš 3 skirtingų struktūrinių regionų: kristalinio (dvigubas spiralinis), amorfinio (šakotos amilozės grandinės) ir kietojo regiono (susideda iš amilozės-lipidų kompleksų). Nekrekmolingu junginių buvimas trimatėje granuliu struktūroje turi reikšmingos įtakos krakmolo taikymo ar perdirbimo technologiniams procesams.

### 1.2.1 Krakmolo sąveika su lipidais

Kaip minėta, krakmolo granulėje yra polisacharidų ir lipidų kompleksų. Amilozė su lipidais gali formuoti spiralinius įtarpos kompleksus, kurie gali būti matomi tiek natyviniame, tiek želatinizuotame krakmole. Želatinizacijos metu amilozė suformuoja kairiąją viengubą spiralę, o nepolinė lipido dalis lieka centrinėje ertmėje. Polinių lipidų buvimas krakmolo granulėje stipriai veikia krakmolo retrogradacijos savybes, nes amilozės ir lipidų kompleksai nedalyvauja rekristalizacijos procese [2].

### 1.2.2 Kviečio lipidai

Grūdų krakmolo granulėse, be amilozės ir amilopektino, taip pat yra ir lipidų. Bendrąja prasme lipidai – tai medžiagos, kurios yra netirpios vandenyje, tačiau gerai tirpsta organiniuose tirpikliuose (chloroforme, eteryje, benzene), molekulėse yra ilgos grandinės angliavandenilių grupės [3].

Lipidų kiekis įprastai grūdų krakmole yra apie 1 %, o tipas ir lipidų kiekis priklauso nuo krakmolo botaninės kilmės [4]. Nors kviečių krakmole lipidų tik 1-1,5 %, tačiau jie turi didelę įtaką maisto produktų kokybei ir tekstūrai. Lipidai ir mažos molekulinės masės baltymai, krakmolo granulėse esantys mažomis koncentracijomis, stipriai veikia krakmolo želatinizaciją, klampą ir tirpių angliavandenių išplovimą įvairių technologinių procesų metu. Taip pat gali sukelti krakmolo retrogradaciją, apsunkinti fermentinę hidrolizę ir veikti krakmolo termines ir mechanines savybes.

Krakmolo granulėse randami lipidai gali būti klasifikuojami į tris kategorijas: krakmolo lipidus (amilozės kompleksų monoacilipidus), krakmolo paviršinius lipidus, tai yra nekrakmolinius lipidus (trigliceridai, diacilgliceridai ir laisvosios riebalų rūgštys) ir krakmolo vidinius lipidus [5]. Nagrinėjant dar detaliau, kviečiuje randami šių klasių lipidai: steroliai, tokoliai, tokoferoliai, laisvosios riebalų rūgštys (FFA), paprastieji gliceridai, galaktosildigliceridai ir fosfogliceridai [1]. Grūdų krakmolo paviršiniai lipidai sudaryti iš 50 % polinesočiųjų riebalų rūgščių. Pagrindinės riebalų rūgštys grūdų krakmole: linolo C 18:2, palmitino C 16:0, oleino C 18:1 [5, 6].

**1.1 lentelė.** Pagrindinės lizofosfolipidų ir fosfolipidų klasės, randamos kviečiuje [1, 7, 8]

<b>Lizofosfolipidai (LPL)</b>	<b>Fosfolipidai (PL)</b>
LPA – lizofosfatidinė rūgštis	PA – fosfatidinė rūgštis
LPC – lizofosfatidilcholinas	PC – fosfatidilcholinas
LPE – lizofosfatidiletanolaminas	PE – fosfatidiletanolaminas
LPI – lizofosfatidilinozitolis	PG – fosfatidildglicerolis
	PI – fosfatidilinozolis

**1.2 lentelė.** Fosfolipidų sudėtis kviečio endosperme [9]

<b>Fosfolipidai</b>	<b>% nuo suminio lipidų fosforo endosperme</b>
PE – fosfatidiletanolaminas	0,5
PC – fosfatidilcholinas	3,05
PI – fosfatidilinozolis	0,9
LPE – lizofosfatidiletanolaminas	8,4
LPC – lizofosfatidilcholinas	65,35

Baltų kvietinių miltų sudėtyje, iš kurių išgaunamas krakmolas, naudojamas gliukozės gamyboje, yra daug skirtingų lipidų (žr. 1.1 lentelė), įskaitant PL (daugiausia fosfatidilcholino (PC) 67 % nuo PL), galaktolipidų (daugiausia monogalaktozidigliceridai ir digalaktozidigliceridai) ir lizofosfolipidų (lizofosfatidilcholinas (LPC) 89 % nuo LPL) (žr. 1.2 lentelė).

### 1.3 Fosfolipidų hidrolizė

Krakmolo konvertavimo į gliukozės sirupą procesas pradedamas nuo hidrolizės. Drauge su polisacharidų skaidymu vykdoma ir fosfolipidų hidrolizė, kuri palengvina šių junginių atskyrimą nuo sirupo ir taip gerina produkto kokybę. Fosfolipidų visišką hidrolizę galima pasiekti naudojant tiek rūgštinės, tiek fermentinės hidrolizės metodus. Hidrolizės metu lipidai yra suskaidomi į GPC ir FFA. Kiekvienas metodas turi savų privalumų ir trūkumų, todėl prieš pradėdant vykdyti hidrolizę reikia išsiaiškinti, kuris metodas yra priimtinausias.

#### 1.3.1 Rūgštinė hidrolizė

Rūgštinė hidrolizė buvo pradėta naudoti anksčiau nei fermentinė, nes rūgštys pramoniniu mastu yra pigesnis ir lengviau įsigijamas produktas nei fermentai. Švelni, rūgštinė hidrolizė vykdoma su trichloracto, acto, druskos rūgštimi, šiek į juos tiek pridėjus sidabro chlorido. Stipri rūgštinė hidrolizė yra vykdoma metanolio tirpale su druskos ir sieros rūgštimi, koncentracija svyruoja nuo 5 iki 10 % [2]. Rūgštinės hidrolizės metu yra naudojami agresyvūs reagentai (dažniausiai visiškai netinkami maisto produktų gamybai), bet taip pat yra reikalinga aukšta temperatūra ir žemas pH (žr. 1.3 lentelė). Jei pasirenkamas rūgštinės hidrolizės metodas, po hidrolizės hidrolizatus būtina neutralizuoti.

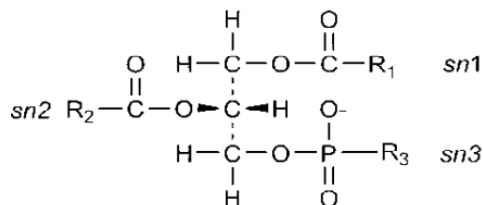
**1.3 lentelė.** Rūgštinės ir fermentinės hidrolizės parametrai [2]

Hidrolizės tipas	Temperatūra, °C	pH
Rūgštinė	135–143, konversijos metu; 65 spalvos šalinimo procese	1,65 dozuojant rūgštį; 4,5 vykdant neutralizaciją
Fermentinė	60, fermentacijos metu;	5,5 dozuojant fermentą;

#### 1.3.2 Fermentinė hidrolizė

Nors prieš tai aptarti rūgštinės hidrolizės procesai yra pigesni, dabar vis populiariau tampa naudoti fermentinę hidrolizę, nes fermentai yra daug specifiskesni nei rūgštys. Šiais laikais vis daugėja fermentų, kurių galima įsigyti ir pramoniniu mastu.

Selektyvi glicerofosfolipidų hidrolizė gali būti pasiekta taikant fosfolipazes. Skirtingos fosfolipazės atakuoja skirtingose lipido molekulės vietose. Esterio jungtis tarp glicerolio pagrindo ir fosforilo grupės yra hidrolizuojama fosfolipazės C (PLC), o esterio jungtis kitoje fosforilo grupės pusėje hidrolizuojama fosfolipazės D (PLD). Acilogrupių hidrolizė sn-1 ir sn-2 padėtyse (žr. 1.2 pav.) yra atitinkamai veikiama fosfolipazių A1 ir A2 (PLA1 ir PLA2) [2].



1.2 pav. Fosfolipidų struktūra ir jų padėtys [2]

## 1.4. Lipazės

Lipidų metabolizmo fermentai, išskirti iš mikroorganizmų, augalų ir gyvūnų audinių, yra labai tinkami riebalų ir kitų lipidų biotransformacijai, nes daugelis šių fermentinių reakcijų nereikalauja papildomų kofaktorių ir daugelis fermentų yra lengvai įsigijami komerciškai. Lipazės katalizuoja trijų tipų reakcijas. Hidrolizės reakcijoje, kuri vyksta vandeninėje terpėje esant dideliame vandens kiekiui, dominuoja esterio hidrolizė. Esterifikacijos reakcijos, vykdomos esant mažam vandens kiekiui, beveik bevandeniuose tirpaluose, išeiga gali būti pagerinta, jei proceso metu yra kontroliuojamas vandens kiekis terpėje. Šiose reakcijose daugelis lipazių selektyvesnės ilgoms ir vidutinio ilgio grandinės riebalų rūgštims nei trumpoms ar šakotos grandinės riebalų rūgštims. Tačiau tiksliai nusakyti grandinės ilgio įtaką esterifikacijai sunku, nes ji taip pat priklauso nuo atskirų lipazių preparatų ir fermento specifškumo.

Transesterifikacijos reakcija vadinama tokia reakcija, kai rūgšties fragmento esteris yra keičiamas vienas su kitu (jei acilodonoras yra laisvoji rūgštis, tai reakcija bus vadinama acidolize, o jei acilodonoras yra esteris, reakcija bus vadinama interesterifikacijos reakcija) [10].

### 1.4.1 Triacilglicerolio lipazės

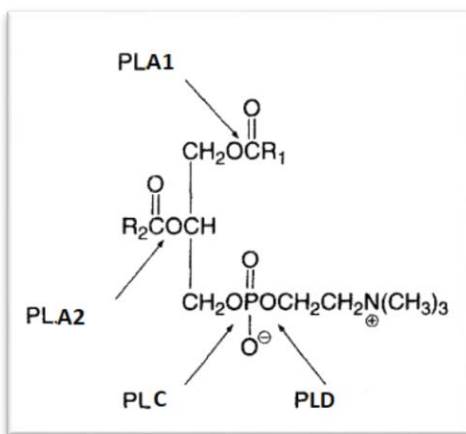
Triacilglicerolio lipazės (triacilglicerolio acilhidrolazės EC 3.1.1.3) – tai fermentai, katalizuojantys trigliceridų (TG) hidrolizę aliejaus / vandens sąsajoje, gebantys formuoti esterio jungtis atvirkštinėmis hidrolitinėmis sąlygomis. Šie fermentai gali katalizuoti ir kitas įvairias reakcijas, tokias kaip: esterifikacija, transesterifikacija, polimerizacija ir laktonizacija. Ši fermentų klasė ne tik katalizuoja



hidrolizę, bet esant reakcijos terpėje nedideliame kiekiui vandens ar mažai poliškam organiniam tirpikliui ji taip pat katalizuoja lipolizės atvirkštinę reakciją, tai yra riebalų rūgščių esterizavimą su alkoholiu. Esant mažam vandens kiekiui lipazės katalizuoja įvairias interestifikacijos ir transesterifikacijos reakcijas. Šios lipazės yra naudojamos siekiant gauti polinesočiųsias riebalų rūgštis, kurios vėliau gali būti naudojamos kartu su mono- ir digliceridais vaistų ir priešuždegiminių vaistų gamyboje [10].

### 1.4.2 Fosfolipazės

Fosfolipazės yra fermentai, hidrolizuojantys specifines esterio jungtis glicerofosfolipiduose ir skaidantys juos į riebalų rūgštis ir kitas lipolitinės medžiagas. Yra keturios pagrindinės fosfolipazių klasės, kurios skiriasi pagal padėtį, kurią atakuoja grandinėje: A, B, C ir D (žr. 1.3 pav.). Fermentai, pažymėti fosfolipazė A1 ir fosfolipazė A2, klasifikuojami kaip acilhidrolazės, o fosfolipazė C ir fosfolipazė D (žr. 1.3 pav.) klasifikuojamos kaip fosfodiesterazės [11].

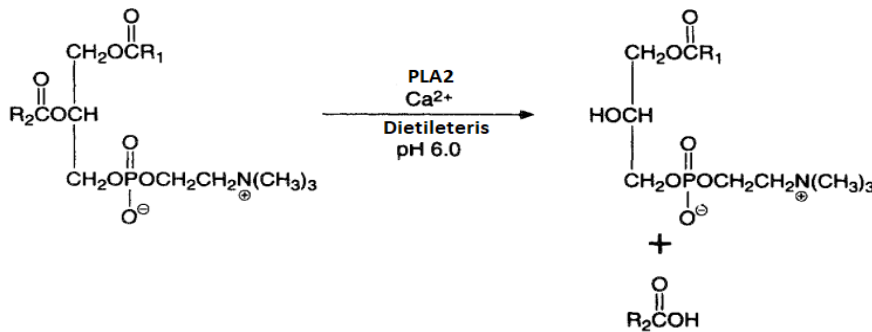


**1.3 pav.** Bendras fosfolipazių veikimo būdas, kai substratas yra fosfatidilcholinai (PC) [11]

PLA1 – tai fermentas, hidrolizuojantis fosfolipidų esterines jungtis 1 padėtyje, taip susidarant 2-acil-lizofosfolipidams ir riebalų rūgštims. Tiek PLA1, tiek PLA2 suskaido glicerofosfolipidus į LPC ir FFA. Jie klasifikuojami kaip PLA1 ir PLA2 priklausomai nuo to, ar skelia fosfolipidų sn-1, ar sn-2 padėtį. PLA1 veikla nustatyta daugelyje įvairių organizmų ląstelių ir audinių: žiurkių trombocituose, galvijų smegenyse, sėklidėse ir grybuose. Šiuo metu žinduoliams yra žinomi devyni PLA1 fermentai, šeši iš jų yra ekstraląsteliniai, o likę trys ląsteliniai. Ląstelinė ir ekstraląstelinė PLA1 dalis neturi sekos homologų ir akivaizdžių funkcijų. Kai kurie PLA1 turi platų substrato specifiškumą ir hidrolizuoja PL, TG ir galaktolipidus. Visos ekstraląstelinės PLA1 molekulės priklauso kasos lipazės genų šeimai. PLA1 plačiai naudojama medicinoje, farmacijoje ir maisto pramonėje. PLA1 gerina lieso pieno ir

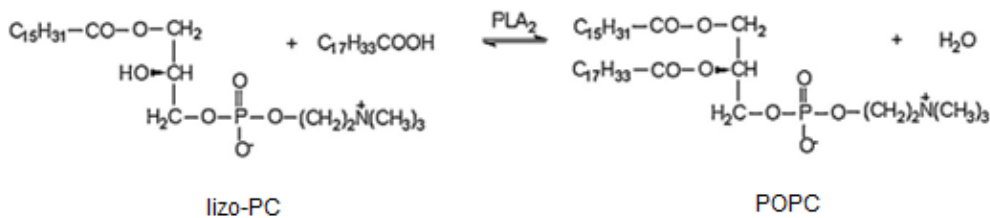
išrūgų stabilumą ir savybes, todėl PLA1 gali būti naudinga priemonė pieno produktų ir ingredientų funkcionalumo modifikacijai [11, 12].

PLA2 (EC 3.1.1.4) išskiria arachidono rūgštį, prostaglandinų sintezės pirmtaką. Arachidonato ir kitų polinesočiųjų riebalų rūgščių yra daugiausia fosfolipiduose, glicerolio C2 padėtyje [13]. Šis fermentas katalizuoja specifinę riebalų rūgščių esterio hidrolizę sn-3-fosfoglicerido anglies atomų C-2 padėtyje (žr. 1.4 pav.). Fermentą galima išskirti iš gyvatės nuodų *Crotalus adamanteus* (rombinė barškuolė). PLA2, izoliuota iš gyvatės nuodų, vienodai veikia tiek PC, PE ir kitus fosfogliceridus. Optimaliam PLA2 veikimui reikalingas  $\text{Ca}^{+2}$  jonas. Jis glaudžiai susijęs su fermento sujungimu su substratu ir katalitiniu aktyvumu [11].



**1.4 pav.** PLA2 veikimas, kai substratas diacilfosfatidilcholinai [1]

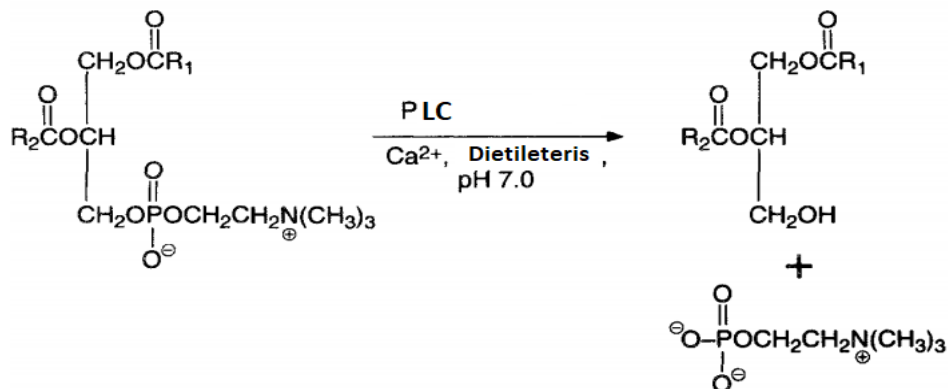
Pastebėta [14], kad naudojant PLA2 vyksta ir atvirkštinė esterifikacijos (acilinimo) reakcija, kurios metu LPL reaguojant su tam tikra FFA susidaro PL (žr. 1.5 pav.). Ši PLA2 savybė naudojama kontroliuojamai fosfolipidų sintezei su reikiama riebalų rūgštimi.



**1.5 pav.** PLA2 katalizuojamas lizo-PC acilinimas su oleino rūgštimi [14]

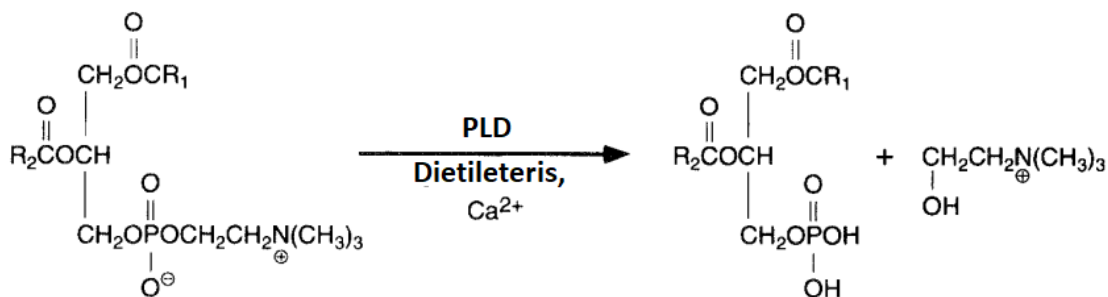
PLB daugiausiai randama *Penicillium* žymenyje. Šis fermentas skelia tiek sn-1, tiek sn-2 esterių jungtis [11].

PLC (E.C. 3.1.4.3) hidrolizuoja diacilglicerofosfolipidus į diacilglicerolius ir vandenyje tirpius fosforilintus produktus (žr. 1.6 pav.). Yra keturios pagrindinės PLC šeimos, išskirtos iš žinduolių: PLC-β, -γ, -δ, -ε. Kiekviena jų skiriasi savo struktūra ir reguliavimo mechanizmu [11, 15].

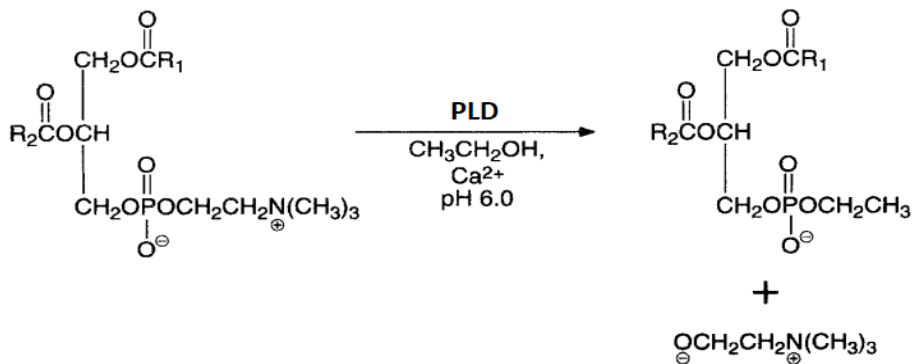


1.6 pav. Fosfolipazės C poveikis diacilofosfatidilcholinui [11]

Fosfolipidų polinių grupių modifikavimui yra naudojama PLD (EC 3.1.4.4). Šis fermentas yra priskiriamas fosfodiesterazei, tačiau jis taip pat turi transfosfatadilinimo (perkėlimo) aktyvumą. Fosfodiesterazė – naudingas reagentas, taikomas diacilfosfatidilcholino ir kitų fosfogliceridų tyrimuose. Reakcijų metu yra reikalingi aktyvatoriai:  $Ca^{+2}$  jonai, kurie sąveikauja su fermento baltymu, ir dietilo eteris, darantis įtaką substrato konformacijai (žr. 1.7, 1.8 pav.) [11].



1.7 pav. PLD fosfodiesterazės aktyvumas fosfatidilcholinui [11]



1.8 pav. PLD transfosfatidilinio reakcijos pavyzdys, kai substratas PC [11]

## 1.5 Lipidų analizės metodai

Vienos analitinės procedūros lipidų analizei nepakanka, kadangi miltuose yra visas kompleksas skirtingų lipidų, todėl toliau bus aptariami įvairūs lipidų nustatymo metodai. Prieš atliekant bet kokią analizę, pirmiausiai reikia paruošti lipidų mėginius, t.y. juos išekstrahuoti.

### 1.5.1 Lipidų ekstrakcija

Lipidai organizmų audiniuose būna įvairių formų dariniuose. Paprastieji lipidai dažniausiai būna atsargų kaupimo audiniuose, didelių agregatų pavidalu, iš kurių yra lengvai išgaunami. Membranų sudedamosios dalys yra kompleksiniai lipidai, kurie glaudžiai susiję baltymais ir polisacharidais, todėl jų išgavimas yra sudėtingesnis. Paprastai lipidai yra susieti su kitais ląsteliniiais komponentais, veikiant silpnai hidrofobinei sąveikai arba *Van der Valso* jėgoms.

Gryni lipidai tirpsta įvairiuose tirpikliuose, jiems sąveikaujant su hidrofobiniais ar hidrofiliniais molekulių regionais. Tirpiklis turi lengvai įsiskverbti į mėginio ląsteles ir lengvai išgaruoti iš mėginio, nepalikdamas jokių likučių [16]. Lipidų izoliavimui dažniausiai naudojami tirpikliai yra chlorinti angliavandeniliai (chloroformas ar dichlormetanas), angliavandeniliai (heksanas, benzenas, cikloheksanas, izooktanai), alkoholiai (metanolis, etanolis, izopropanolis, n-butanolis), acetonas, acetonitrilas, eteriai (dietilo eteris, izopropilo eteris, dioksanai, tetrahidrofuranai) ir jų mišiniai. [16]. Pagal straipsnyje aprašytas metodikas populiariausi tirpikliai yra metanolis, chloroformas, butanolis, heksanas ir propanolis [16, 17, 18, 19, 20]. Lipidai su mažu poliškumo grupėmis, tokie kaip TG ar cholesterolio esteriai, yra labai tirpūs angliavandenilių tirpikliuose (heksane, cikloheksane ir toluene), taip pat didesnio poliškumo tirpikliuose (chloroforme ar eteri). Poliniai lipidai gerai tirpsta metanolio, etanolio ar chloroformo tirpikliuose. Tirpumas poliniame tirpiklyje didėja, mažėjant riebalų rūgščių grandinės ilgiui arba didėjant tirpiklio alkoholio grandinės ilgiui. Norint atlikti lipidų ekstrakciją iš audinių

reikia naudoti tokius tirpiklius, kurie sutrikdys sąveiką tarp lipidų ir audinių matricos. Svarbu paminėti, kad lipidų ekstraktai iš audinių turi daug nelipidinių darinių, tokių kaip sacharidai, aminorūgštys, karbamidas ir druskos. Visus šiuos junginius dažnai būtina pašalinti iš regeneruotų lipidų, prieš atliekant bandinio analizę [16, 21].

### **1.5.2 Metodai naudojant organinių tirpiklių mišinį**

Dažniausiai nepakanka vieno tirpiklio visiškai lipidų ekstrakcijai, nes naudojant tik polinį tirpiklį galutinai neįvyksta nepolinių lipidų išgavimas. Siekiant užtikrinti visišką lipidų išgavimą iš mėginių yra naudojama kelių tirpiklių sistema, sudaryta iš skirtingų polinių ir nepolinių komponentų proporcijų.

Dar 1928 metais plačiausiai naudoti tirpikliai buvo etanolis ir dietilo eteris (3:1), esant 55–60 °C temperatūrai, ekstrakcija trukdavo kelias valandas. Tačiau vėliau pastebėta, jog šis tirpiklių mišinys sukelia lipidų peroksidaciją gyvūninės kilmės mėginiuose, o augalinės kilmės mėginiuose fermentinių reakcijų padidėjimą, todėl pradėta ieškoti kitų tirpiklių. Efektyviai fosfolipidų ekstrakcijai reikia polinio ir nepolinio tirpiklių mišinio [22]. Lipidų ekstrahavimui iš augalų ar gyvūnų audinių ir mikroorganizmų dažniausiai yra naudojamas chloroformo ir metanolio mišinys, santykiu 2:1 (v/v). Viršutiniame (vandeniniame) sluoksnyje lieka lipidų priemaišos, tai yra nelipidiniai dariniai, o apatiniame (chloroforminiame) sluoksnyje lieka analizei reikalingi lipidiniai dariniai [23]. Ši ekstrahavimo procedūra labai veiksminga, greita ir gali būti vykdoma kambario ir net žemesnėje temperatūroje. Metodas plačiai naudojamas ir iki šiol [22]. Šis tirpiklių mišinys panaudotas lipidų išgavimui iš pieno [24]. Lipidų kiekiui žuvies ir sūrio mėginiuose įvertinti buvo naudotas etilacetato / cikloheksano 54:46 (v/v) ir metanolio / etilacetato 1:1 (v/v) mišinys [25]. Analizuojant lipidų kiekį pieno mėginiuose bei vykdant metodo optimizaciją išbandyti butanolio / metanolio 3:1 ir 1:1 (v/v) santykiai, taip pat butanolio / metanolio / chloroformo tirpiklių mišiniai santykiu 3:5:4 [24].

### **1.5.3 Soksleto metodas**

Tai standartinis neapdorotų riebalų analizės metodas. Riebalai ekstrahuojami pakartotiniu plovimu ar perkoliavimu, naudojant organinį tirpiklį. Lipidų ekstrakcija naudojant soksleto metodą dažniausiai atliekama su poliniais tirpikliais, heksanu, etilo acetatu ar petroleteriu [21]. Šis metodas pritaikytas lipidų ekstrakcijai iš dumblių biomasės. Metodo pasirinkimą lėmė jo paprastumas ir saugumas. Eksperimento metu išbandyta net 13 skirtingų tirpiklių, bandymo rezultatai parodė, kad etanolis, heksanas ir chloroformas efektyvesni už kitus tirpiklius. Optimalus ekstrakcijos laikas 3 valandos, o efektyviausias tirpiklių mišinys chloroformo ir etanolio mišinys, santykiu 1:1 [25].

#### 1.5.4 Bligh ir Dyer metodas

Šis metodas buvo sukurtas lipidų ekstrakcijai iš žuvų raumenų mėginių. Metodas patogus audinių analizei, kuriuose yra didelis procentas vandens [22]. Riebalai iš mėginio ekstrahuojami naudojant polinių tirpiklių mišinį, kurį sudaro chloroformas, metanolis ir vanduo (1:2:0,8). Mišinys sudaro vienfazę sistemą [21, 22]. Po ekstrakcijos, vienos fazės sistema atsiskiria į chloroformo ir metanolio / vandens fazes, o įpilus daugiau chloroformo – ir vandens. Lipidai lieka chloroforminėje fazėje. Riebalų kiekis įvertinamas svėrimo būdu, prieš tai išgarinus tirpiklį. Metodas tinkamas neutralių ir polinių lipidų ekstrakcijai [12]. Pritaikius modifikacijas metodas panaudotas įvairiuose tyrimuose su dumbliais ir kitais mikroorganizmais [26, 27, 28], taip pat kiaušinio trynio fosfolipidų nustatymui [29]. Šis metodas taip pat tinkamas didžiųjų glicerofosfolipidų lipidų nustatymui (fosfatidinės rūgšties, PC, PE, glicerofosfatidilinozitoliumi, PI, ir PS) [22].

#### 1.5.5 Efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC)

HPLC yra puikus metodas lipidų mišinio sudėties nustatymui. Tipinės HPLC kolonėlės yra 2,1–4,6 mm diametro, o kolonėlės ilgis siekia 30–250 mm. Įprastuose HPLC metoduose naudojami UV ir fluorescenciniai detektoriai, tačiau tiesioginei fosfolipidų analizei šie detekcijos būdai yra netinkami, nes šioms molekulėms trūksta tinkamų chromoforų. Fosfolipidų kokybinei ir kiekybinei analizei pritaikyti nuo chromoforų nepriklausomi aptikimo metodai: lūžio rodiklio, šviesos sklaidos detektorius, masių spektrometrinis (MS) detektorius ir įkrauto aerozolio detektorius (CAD). Jei analizei yra naudojamas šviesos sklaidos detektorius, tuomet fosfolipidų derivatizacija nebūtina. Detektorius matuoja šviesos sklaidos intensyvumą po to, kai išgarinamas tirpiklis. Šis metodas patogus tuo, jog galima naudoti gradientinę eliuciją ir jis nėra jautrus tirpiklio srautui. Kitas privalumas yra tas, jog šie detektoriai yra pigesni nei MS detektoriai [28]. Toks HPLC metodas buvo pritaikytas monogalaktozildiacilgliceroliams, digalaktosildiacilgliceroliams, PE, PG ir PC nustatymui kviečių miltų ekstraktuose [30]. Poliniai lipidai, įskaitant GL, LPL ir PL, esantys *Camelina sativa* sėklų lecitine, irgi buvo analizuojami pritaikius HPLC metodą [31].

#### 1.5.6 Ultra aukšto našumo skysčių chromatografija (UPLC)

Lipidų tyrimams UPLC metodu tinka tie patys dėsniumai, kaip ir HPLC analizei, tik dažniausiai kaip detektorius čia naudojamas masių spektrometras. Toks metodas buvo specialiai sukurtas bakterijų biomasėje esančių riebalų rūgščių kiekio įvertinimui, pritaikius UPLC kartu su elektropurkštuvinės jonizacijos masių spektrometru. Metodas taikytas tiriant konkretaus augimo greičio ir pH terpės įtaką dviejų riebalų rūgščių profiliui biotechnologiškai svarbiuose mikroorganizmuose: granteigia-

mose bakterijose *Lactococcus lactis* ir gramneigiamose bakterijose *Escherichia col.* Fiziologinės sąlygos buvo kontroliuojamos bakterijų augimo metu [32]. UPLC metodas su įprastais normalių fazių tirpikliais, silicio kolonėle ir šviesos sklaidos detektoriumi panaudotas nustatant neutralius ir polinius lipidus, esančius gyvūnų plazmos audiniuose. Skirtingos lipidų klasės yra nagrinėjamos esant normalioms fazių sąlygoms, nes šiomis sąlygomis yra gaunama viena simetriška smailė kiekvienai skirtingai lipidų klasei. Kad UHPLC-MS metodas būtų tinkamas kiekybiniam skirtingų lipidų klasių įvertinimui, PC aptikimui reikia naudoti teigiamą jonizaciją, o FFA jonizuojasi esant neigiamam jonų režimui [33].

### 1.5.7 Masių spektrometrija (MS)

MS remiasi jonų atskyrimu pagal jų elektros krūvį ir bendrą molekulinę masę elektromagnetiniame lauke. Junginiai apibūdinami vadinamuoju jonų masės ir krūvio santykiu ( $m/z$ ). Antrinių jonų masių spektrometrijos metodu (MS / MS) nustatomas lipidų tipas ir gaunama informacija apie molekulės struktūrą (acilo grandinę ir polinę „galvą“). MS analizei gali būti naudojama ir tiesioginė injekcija, ir skystinė normalių arba atvirkštinių fazių chromatografija.

MS įranga susideda iš įleidimo angos, jonizacijos šaltinio, masės analizatoriaus ir jonų detektoriaus. Dažniausiai glicerolipidų identifikavimas ir kiekybinis įvertinimas MS metodu atliekamas panaudojus elektropurkštuvinę jonizaciją (ESI). Tokios jonizacijos privalumai: mažesnis molekulių jonų ardymas, geresnis atsikartojamumas ir žemesnės aptikimo ribos lyginat su bombardavimo jonų branduoliais masių spektrometrija. Toks jonizacijos metodas gali būti taikomas PL nustatymui ir be išankstinės derivatizacijos, nes skirtingų klasių lipidai išpurškiant tirpale įgauna teigiamą arba neigiamą krūvį. [22].

Naudojant teigiamą ESI nustatomos 3 pagrindinės glicerofosfolipidų klasės: PC, PS ir PE. PC fragmentacija vyksta susidarant būdingai 184  $m/z$  PC grupės smailei ir  $[M+H-59]^+$  smailei, kuri būdinga  $(CH_3)_3N$  neutralios masės praradimui. Taip pat matomos santykinai nedidelės smailės, rodančios ilgagrandinio acilo pakaitų  $[M-R_2CH=C=]^+$  (PC) ir lizo-PC-H<sub>2</sub>O praradimus. PS fragmentacija teigiamajame režime duoda jonus, vykstant fosfoserino polinių grupių neutralios masės praradimui  $[M^+H-185]$ . Teigiama ESI vykdant PE ir lizo-PE fragmentaciją rodo vieną smailę  $[M^+H-141]^+$ , kuri būdinga PE grupės neutralios masės praradimui [22].

Neigiamas ESI režimas aptinka 6 pagrindines glicerofosfolipidų klases: PI, PS, PG, PA, PE ir PC chloridiniai aduktai (chloridas susidaro skylant  $CHCl_3$ ). Šiuo režimu taip pat gali būti nustatomi

šių šešių klasių fosfolipidų monoacilgliceridų variantai [22]. Dar neigiamu režimu detektuojamos laisvosios riebalų rūgštys, nes teigiamasis ESI be išankstinės derivatizacijos negeneruoja aiškių smailių [34].

### 1.5.8 Dujų chromatografija (GC)

Riebalų rūgštys yra pagrindinis lipidų komponentas, o lipidų fizikinės, cheminės ir fiziologinės savybės priklauso būtent nuo riebalų rūgščių. Riebalų rūgščių sudėtis nustatoma kaip riebalų rūgščių metilo esteriai (FAME) GC metodu [35]. Taikant GC metodą būtina atlikti riebalų rūgščių derivatizaciją, jos paskirtis riebalų rūgščių lakumo padidinimas. FAME gaunami įvairiais transmetilinimo būdais, po to išskiriami GC kolonėlese ir aptinkami panaudojus liepsnos jonizacijos detektorius (FID) [33]. FAME susidaro riebalų rūgštis ir katalizatorių sumaišius su metanolio arba jame ištirpinus. Katalizatoriams dažniausiai taikomas terminis apdorojimas (metalinis kaitinimo blokas), tai priklauso nuo to, kuris katalizatorius yra naudojamas ir kiek laiko leidžiama vykti reakcijai. Dažniausiai naudojami rūgštiniai katalizatoriai: HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, BF<sub>3</sub>, visi jie tirpinami metanolyje. Dažniausiai naudojami šarminiai katalizatoriai: NaOCH<sub>3</sub>, KOH ir NaOH [36].

Rūgštimi katalizuotas transmetilinimas / metilinimas. Rūgštiniai katalizatoriai peresterizuoja TG ir kitus kompleksinius lipidus, bet taip pat esterifikuoja FFA esant metanolio. Aukšta temperatūra naudojama reakcijos paspartinimui, ji gali svyruoti nuo 60 iki 90 °C laipsnių, o trukmė nuo kelių minučių iki valandų. HCl koncentracija siekia 5 % . Naudojama koncentruota ir bevandenė metanolinė HCl, kuri ruošama iš acetilchlorido ir metanolio. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> koncentracija 1–2 %, o naudojant BF<sub>3</sub> 6–14 %, temperatūra 80–100 °C laipsnių, reakcijos trukmė 2–60 min. BF<sub>3</sub> yra dažniausiai naudojamas rūgštinis katalizatorius metilinimo ir metanolizės reakcijoms atlikti. Šis katalizatorius yra ne tik kenksmingas, bet ir trumpo galiojimo. Kitas trūkumas naudojant šiuos rūgštinius katalizatorius (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ir BF<sub>3</sub>) yra tas, jog juos naudojant didelėmis koncentracijomis ir esant aukštai temperatūrai gali susidaryti nuosėdos [33].

Šarmu katalizuotas transmetilinimas. Reakcija vyksta daug sparčiau bei lengvesnėmis sąlygomis, lyginant su rūgštiniais katalizatoriais, tačiau šie katalizatoriai negali esterinti FFA, taip pat reakcijai reikalingos griežtesnės bevandenės sąlygos, nes vandens buvimas terpėje sukelia negrįžtamą lipidų hidrolizę [16]. Populiariausi šarminiai katalizatoriai yra natrio metoksidas bevandeniame metanolyje, taip pat kalio ir natrio hidroksidai metanolyje. Šarmų koncentracijos svyruoja nuo 0,2 iki 3,3 N, kambario temperatūra, reakcija trunka nuo kelių sekundžių iki valandos. Metodas taikomas tik



išgrynintiems riebalams ir aliejams, kuriuose mažai FFA (rūgščių skaičius yra <2), nes šie katalizatoriai nesugeba esterinti FFA ir reikalauja griežtai bevandenės terpės.

## 1.6 Gliukozės sirupo gamyba

Gliukozės sirupas gali būti gaminamas tiek iš kviečių, kukurūzų ar bulvių krakmolo. Svarbiausia, kad krakmolas, naudojamas gliukozės sirupo gamybai, būtų kuo aukštesnės kokybės, be šalutinių metalų jonų, mikrobiologinio užterštumo ir turintis mažai baltymų, idealiu atveju baltymų kiekis neturėtų viršyti 0,3 %. Metalų jonai ir baltymai, esantys krakmole, lemia sirupo senėjimo savybes ir nepageidaujamos sirupo spalvos atsiradimą. Gliukozės sirupų gamybinis procesas susideda iš šių pagrindinių etapų [39] :

- Skystinimas – krakmolo kleisterio klampumo sumažinimas iki skystos fazės.
- Cukrinimas – įvairių fermentų pagalba krakmolo grandinė suskaidoma į smulkesnes dalis ir taip pasiekiamas norimas dekstrozės ekvivalentas (DE) krakmolo hidrolizate.
- Filtracija – netirpių priemaišų pašalinimas iš tirpalo.
- Spalvos šalinimas aktyvuota anglimi – iš tirpalo pašalinamos tirpios priemaišos, kurios turi spalvą.
- Demineralizacija – valymas jonų mainų dervomis (katijonitais, anijonitais ir maišyto sluoksnio). Iš tirpalo pašalinamos mineralinės medžiagos (sumažinamas peleningumas). Tai įvairios ištirpusios druskos bei mineralinės rūgštys (sulfatai, chloridai, nitratai ir kt.).
- Išgarinimas – sukonzentruojamas produktas ir sumažinamas jo tūris.
- Bazių saugojimas – bazės sukaupiamos talpose iki tolesnio jų panaudojimo.
- Maišymas – bazių maišymas, norint gauti tam tikrą produktą.
- Galutinis išgarinimas – sirupo sukonzentravimas prieš jo atkrovimą.
- Produkto saugojimas ir atkrovimas.

Toliau bus aptarti pagrindiniai gliukozės sirupo gamybos etapai.

### 1.6.1 Skystinimas

Šaltame vandenyje krakmolas netirpsta, todėl krakmolo pienelis turi būti šildomas. Kaitinamas krakmolo pienelis tirštėja, nes išbrinksta krakmolo grūdėliai. Fermentas  $\alpha$ -amilazė suskaido šakotą krakmolo grandinę iki smulkesnių dalelių ir tirštas krakmolo pienelis tampa skystu.

### 1.6.2 Cukrinimas

Panaudojus skirtingus fermentus, gaunamas įvairaus dekstrozės ekvivalento (DE) krakmolo hidrolizatas (pvz. DE30, DE47, DE57, DE95). DE parodo krakmolo hidrolizės (suskaidymo) laipsnį. Neskaidyto krakmolo DE = 0. Kuo smulkiau krakmolo grandinė suskaidoma, tuo didesnis sirupo DE. Jei krakmolas būtų suskaidytas po vieną gliukozės molekulę (žiedą), sirupo DE = 100. DE – tai santykis tarp redukuojančių grupių skaičiaus ir bendro gliukozės žiedų skaičiaus. Vienas atskiras gliukozės žiedas turi vieną redukuojančią grupę. DE įvertina skirtingų ilgių molekulių mišinio vidutinę redukuojamąją galią. Kuo mišinyje daugiau ilgų (daug gliukozės žiedų turinčių) molekulių, tuo mažesnis DE.

### 1.6.3 Ultrafiltracija

Didžiausią dalį netirpių priemaišų sudaro baltymai, patekę su krakmolu į cukrinimo talpą. Skystinimo ir cukrinimo metu iš krakmolo granulių taip pat išsilaisvina riebalai (lipidai) ir riebalų rūgštys. Dalį netirpių medžiagų gali sudaryti neskaidyto krakmolo likučiai, ypač kai pažeidžiamas technologinis režimas skystinime ir cukrinime, kuomet sudaromos sąlygos krakmolo retrogradacijai (krakmolo ir dekstrinų molekulių pakartotinei agregacijai). Ultrafiltracijos (UF) metu srautas paduodamas į modulį su membranomis. Membranos nepraleidžia priemaišų, o skaidrus filtratas (permeatas) praeina pro membraną ir išteka pro atvamzdį modulyje. Procesas nėra greitas, todėl paduodamas srautas nuolat cirkuliuoja ratu. Šis srautas, kuris nespėja prasifiltruoti ir grįžta atgal prieš filtravimą, vadinamas retentatu. Recirkuliacija užtikrina, kad retentatas, dideliu greičiu tekėdamas membranų vamzdeliais, nuneša nuo sienelių susidariusias nuosėdas ir taip pagerina filtraciją. Filtravimo metu nuolat stebimas filtrato skaidrumas, nes drumstas filtratas yra ženklas, kad membrana yra pažeista ir ją būtina keisti nauja. UF metu matuojamas permeato srautas – permeato kiekis, prasifiltravęs per laiko ir membranos paviršiaus ploto vienetą. Nuolat filtruojant, membranos vis labiau užsineša priemaišomis ir šis srautas sumažėja kelis kartus. Membranoms užsinešus priemaišomis, atliekamas membranų plovimas (CIP – *clean in place*). Plovimas gali būti rūgštinis, šarminis ir fermentinis [39].

### 1.7. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas

Šis projektas buvo skirtas tam, kad būtų pagerintas gaminamo gliukozės sirupo produkto grynumas. Gamyboje naudojami filtruojamumo fermentai pilnai nesuskaido lipidų į netirpius vandenyje junginius, po ultrafiltracijos proceso yra pastebimas produkto putojimas. Pirmasis uždavinys buvo ištirti gamyboje naudojamos lizofosfolipazės skilimo produktus ir jų įtaką ultrafiltracijos produktų kokybei. Tada buvo keliamas uždavinys parinkti kuo tinkamesnį lipazių mišinį, kuriuo tirpūs junginiai būtų konvertuoti į mažiausio tirpumo lipidų skaidymo produktus. Optimizacija iš pradžių turi būti

atliekama laboratorinės apimtys bandymais. Kai lipazių mišinys jau optimizuotas, bandymai turi būti atliekami didesne apimtimi. Fermentacijos produktams turi būti ultrafiltruojami, išlaikant kuo artimesnius gamybai parametrus, nes tik taip bus galima daryti išvadą apie parinkto fermentų mišinio efektyvumą ir įtaką filtracijos produktams. Po ultrafiltracijos gautiems permeatams reikia atlikti kiekybinę ir kokybinę analizes, kurios įvertintų teršalų šalinimo efektyvumą ir sirupo savybes. Atlikus visus etapus ir gavus rezultatus, galima daryti išvadas apie modifikuotos fermentacijos efektyvumą.

## 2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

### 2.1 Tiriamojo projekto darbų schema

2.1. lentelėje pavaizduota projekto uždavinių įgyvendinimui naudota darbų schema. Detalios analizių metodikos bus pateiktos kituose skyreliuose.

**2.1 lentelė.** Tiriamojo projekto darbų schema su pagrindiniais parametrais ir reagentais

Bandymų apimtis (procesai)		Tyrimų metodai	
<b>Fermentacijos optimizacija (laboratoriniai bandymai)</b>		Lipidų ekstrakcija (40 min, chloroformas:metanolis, 1:1), Lipidų HPLC (CAD)	
pH 4,7	Lizofosfolipazė (171 µL/L)		
pH 4,7 ir 5,5	Lizofosfolipazė (342 µL/L)		
	Lizofosfolipazė (342 µL/L) ir <i>Lecitase Ultra</i> (80 µL/L)		
	(342 µL/L) ir <i>Vilzim LIP</i> (30 µL/L)		
pH 5,5	Lizofosfolipazė (342 µL/L) ir <i>LIPOMOD</i> (20 mg/kg)		
<b>Pusiai gamybiniai bandymai</b>			
1.	Gamybinė fermentacija AB „Amilina“ ceche (60 °C, 4,7 pH)	Pusiai gamybinė fermentacija pilotinėje laboratorijoje (60 °C, 5,5 pH)	CST, centrifuginis testas, lipidų ekstrakcija, lipidų HPLC (CAD), spektrofotometriniai tyrimai, SEC, azoto, fosforo nustatymas
2.	Ultrafiltracija (200 kDa, 60 °C, 3 m/s)		Lipidų ekstrakcija, MS / MS, putojamumo ir putos stabilumo tyrimas

### 2.2 Medžiagos ir tirpikliai

Dėl įmonei priklausančios konfidencialios informacijos apie gliukozės sirupų gamybos technologiją, kai kurios medžiagos ir gamintojai nėra įvardinti (žr. 2.2 ir 2.3 lentelė).

**2.2 lentelė.** Projektui atlikti naudotos medžiagos ir reagentai

Pavadinimas (sant-rumpa)	Molekulinė formulė	Medžiagos grynumas	Gamintojas
Sterilus dejonizuotas vanduo (MiliQ)			Ruošiamas Millipore Mili-Q Integral Water Purification sistema
Linolo rūgštis (C18:2)	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Palmitino rūgštis (C16:0)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	≥ 99 %	Sigma Aldrich

L-alfa-lizofosfatidilcholinas (LPC)	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	≥ 99 %	Sigma Aldrich
L-alfa-fosfatidilcholinas (PC)	C <sub>44</sub> H <sub>88</sub> NO <sub>8</sub> P	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Heptadekanoninė rūgštis	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	≥ 98 %	Sigma Aldrich
Metanolis (MeOH)	CH <sub>3</sub> OH	MS grynumo	Sigma Aldrich
Acetonitrilas (ACN)	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	≥ 99,9 %	Sigma Aldrich
Tetrahidrofuranas (THF)	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	≥ 99,9 %	Sigma Aldrich
Chloroformas	CHCl <sub>3</sub>	99–99,4 %	Sigma Aldrich
Druskos rūgštis	HCl	35 %	Sigma Aldrich
Natrio hidroksidas	NaOH	50 % H <sub>2</sub> O	Labochema
Dezinfekantas hipochlorito pagrindu			Divosan
Natrio bisulfitas	NaHSO <sub>3</sub>	X %, kuriame X % SO <sub>2</sub>	Sirupų cechas, AB „Amilina“
Natrio azidas	NaN <sub>3</sub>	100 %	Lachner
Natrio nitratas	NaNO <sub>3</sub>	100 %	Lachner
D-(+)-gliukozė	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	≥ 99,5 %	Sigma Aldrich
D-(+)-maltozės monohidratas	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ·H <sub>2</sub> O	≥ 95 %	Sigma Aldrich
Dekstranų (Dxt) standartų rinkinys molekulinei masei	Dxt 5; Dxt 12; Dxt 25; Dxt 50; Dxt 150; Dxt 270; Dxt 410; Dxt 676	100 %	Agilent
MQ chloro testinės juostelės			Sigma Aldrich
MQ sulfito testinės juostelės			Sigma Aldrich
Dimetilsulfoksidas (DMSO)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	≥99 %	Sigma Aldrich

**2.3 lentelė.** Projekto metu, fermentų optimizacijos tyrimams naudoti fermentai

Fermento pavadinimas	Aktyvumas	E.C./CAS numeris	Iš ko išskirtas	Optimalūs parametrai	Forma	Gaminotojas
F1 (lizofosfolipazė)	Konfidencialu	Konfidencialu	Konfidencialu	Konfidencialu	Bespalvis skystis	Konfidencialu
Karboksirūgšties esterio hidrolazė <b>Lecitase Ultra</b> (PLA1)	10 KLU/g	E.C.3.1.1.3	<i>Thermomyces lanuginosus</i> / <i>Fusarium oxysporum</i>	50–55 °C pH 6	Rudas skystis	Novozymes

Lipazinio ir esterazinio aktyvumo enzimas, <b>LI-POMOD</b>	Lipazinis – 115000 u/g ; Esterazinis – 65000 u/g	CAS 9001–62–1	<i>Candida cylindracea (rugosa)</i>	40–55 °C pH 5–8	Balti milteliai	Biocatalysts
Koncentruota lipazė <b>Vilzim LIP</b>	3000000 u/g	E.C.3.1.1.3	<i>Aspergillus niger</i>	37–50 °C pH 7,5–8,5	Gelsvas skystis	Baltijos enzimai

### 2.3 Prietaisai

Projekto metu naudoti prietaisai ir darbo priemonės yra surašytos lentelėje 2.4 lentelėje.

**2.4 lentelė.** Tyrimui atlikti naudoti prietaisai ir darbo priemonės

Prietaisai/darbo priemonės	Gamintojas
pH-Metras, Thermo Scientific Orion Star A211 pH Benchtop Meter	Thermo Scientific
Magnetinė maišyklė, IKA RT 5	IKA
Garintuvas, Biotage V-10 Evaporator	Biotage
Dispergatorius, IKA Ultra-TurraxT25 Digital Homogenizer	IKA
Membranis GHP Acrodisc švirkštinis filtras (membranų porų dydis 0,45 µm)	Acrodisc
Mikropipetės (5-50 µl; 100-300; 100-1000 µl; 5 ml, 1-10 ml)	Finnpipette
Analitinės elektroninės svarstyklės – Mettler Toledo AG204 Digital Analytical Balance	Mettler Toledo
Vienkartiniai švirkštai su adata (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Sigma Aldrich
Termostatas BINDER	Binder GmbH
Atvirkščių fazių kolonėlė Eclipse C8 (50 x 2,1 mm)	Agilent
Kolonėlė ACQUITY UPLC C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm)	Thermo Scientific
Kolonėlė Ultrahydrogel 500 (7,8 x 300 mm, 10 µm)	Waters
Kolonėlė, Shodex OH pak SB-802 HQ (8 x 300 mm, 6 µm)	Waters
Prieškolonėlė, Shodex OH pak SB	Waters
Drėgnomatis Mettler Toledo Moisture Balance HG63	Mettler Toledo
Drėgnomatis The SMART System 5	CEM
Memranos FP200, 200 kDa	PCI
Filtravimo stendas UF „Micro Laboratory Pilot Plant ROP 2035“	PCI

Srauto matuokliai Proline Promag 10Pelectromagnetic flowmeter	Endress and Hauser
Optinis refraktometras ATAGO	ATAGO
Aparatas, naudojamas CST matuoti Triton Type 319 Multi-purpose CST	Tritonel
Centrifuga Eppendorf 5702	Eppendorf
Drumstumo matuoklis LaMotte Portable Turbidity Meter	Tritonel
Azoto ir baltymų kiekio analizatorius FLASH 2000 Organic Elemental (N/Protein) Analyzer	Thermo Scientific
Spektrofotometras	Agilent
Masių spektrometras LTQ XL	Thermo Scientific
Vandens gryninimo ir paruošimo sistema MilliQ10 Milipore	Milipore

## 2.4 Tiriamasis objektas

Gliukozės sirupai gaminami iš švaraus kviečių krakmolo, išskirto krakmolo gamybos ceche iš kvietinių miltų. Sirupų gamybai skirtas krakmolas nedžiovinamas, o pateikiamas koncentruotos (iki 38–42 % SM) vandeninės suspensijos (vadinamojo krakmolo pieneliu) pavidalu.

Tiriamajam projektui atlikti buvo naudojamas gliukozės sirupas, kurio DE 28–30. Sirupų pavyzdžiai buvo paimti iš gamybinės linijos cukrinimo etapo, prieš įvedant filtruojamumo fermentus.

## 2.5 Metodai

### 2.5.1 Lipidolizės tyrimai (fermentacijos optimizavimas)

Atlikti lipidolizės tyrimai su toliau išvardintais fermentų mišiniais, nurodytomis sąlygomis:

- 1) Į tiriamąjį tirpalą dedama riebalus skaidančių fermentų:
  - a) F1(171 µL/L), sirupo pH 4,5–4,7.
  - b) F1(342 µL/L), sirupo pH 4,7 ir 5,5.
  - c) F1(342 µL/L) ir *Lecitase Ultra* (80 µL/L), sirupo pH 4,7 ir 5,5.
  - d) F1 (342 µL/L) ir *Vilzim LIP* (30 µL/L), sirupo pH 4,7 ir 5,5.
  - e) F1 (342 µL/L) ir *LIPOMOD* (20 mg/kg), sirupo pH 5,5.
- 2) Po 10 minučių tliekama fermento inaktyvacija (pH koreguojamas iki 2 naudojant 2N HCl, mėginys pašildomas iki 80 °C, 50–60 s.)
- 3) Atlikus inaktyvaciją matuojamas sausų medžiagų (SM) kiekis bandinyje.
- 4) Toliau vykdoma mėginio lipidų ekstrakcija.

- 5) Kiti mėginiai imami po 30min, 1, 2, 24 valandų, kartojami 2–4 punktai.
- 6) Iki bandinio paėmimo tiriamieji tirpalai fermentuojami 60 °C temperatūroje, esant nuolatiniam maišymui.

### 2.5.2 Lipidų ekstrakcija

Tiriamąjį projektą metu atlikta fermentuotų ir nevalytų krakmolo hidrolizatų ir permeatų lipidų ekstrakcija. Tiksliai pasvertas 45 g mėginys užpilamas chloroformo : metanolio – 1:2 mišiniu (15 ml : 30 ml), ir maišomas 20 minučių. Praėjus 20 minučių įpilama 15 ml chloroformo ir paliekama maišyti dar 20 minučių. Pasibaigus maišymui, mėginys paliekamas nusistovėti, o atsiskyrus sluoksniams, viršutinis (metanolinis) sluoksnis nudekantuojamas į atliekas, o likęs apatinis (chloroforminis) išmatuojamas. Koncentruojant mėginį MS analizei, ekstraktas yra išgarinamas su *Biotage* išgarintuvu. Koncentruotas mėginys užpilamas MS / MS analizei: ACN:IPA:H<sub>2</sub>O, v/v/v (65:30:5), (sirupų permeatai, po 1–2 ml), nufiltruojamas ir dedamas į chromatografą [40]. Lipidų junginių nustatymui naudoti standartinių tirpalai (žr. 2.6 lentelė), kurių koncentracija: 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml.

### 2.5.3 Efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC)

Efektyviosios skysčių chromatografijos metodas [41] naudotas lipidų profilio kitimo nustatymui fermentuotame krakmolo hidrolizate, lipidolizės įtakos įvertinimui.

Analizės sąlygos:

- Eliuentai: A – Metanolis: MiliQ vanduo : Acto rūgštis (750 ml : 250 ml : 4 ml); B – ACN:Metanolis:THF (500 ml : 375 ml : 125 ml).
- Gradientas, naudotas HPLC analizės metu, nurodytas 2.5 lentelėje.

**2.5 lentelė.** Gradientas, naudotas HPLC analizės metu

Laikas, min	A, %	B, %
0	100	0
3	55	45
7	32	68
10	20	80
15	0	100
18	0	100
20	100	0
26	100	0

- Injekcija: 3 µl.
- Tėkmės greitis: 0,3 ml/min.



- Įkrauto aerozolio detektorius *CAD Corona Ultra*.
- Ekstraktai prieš analizę filtruoti su membraniniu *GHP Acrodisc* švirkštiniu filtru (0,45µm).
- Vieno bandinio analizės trukmė 26 min.
- Analizei atlikti naudoti standartiniai junginiai nurodyti 2.6 lentelėje.
- Automatinio mėginio įvedimo įrenginio temperatūra 5 °C.
- Kolonėlės temperatūra 40 °C.
- Chromatogramoms integruoti naudota *Chromeleon 7* kompiuterinė programa, duomenys apdoroti naudojant *MS Excel* programą.

**2.6 lentelė.** Standartų tirpalai, naudoti HPLC analizės metu

<b>Standarto pavadinimas</b>	<b>Grupė</b>	<b>Sulaikymo trukmė, min</b>
Linoleno rūgštis	FFA-1	4,5
Palmitino rūgštis	FFA-2	4,9
L-alfa-lizofosfatidilcholinai (LPC)	LPC	3,5
L-alfa-fosfatidilcholinai (PC)	PC	7,5
Sojų aliejus (trigliceridai, TG)	TG	12,0
Vidinis standartas, heptadekanoninė rūgštis	IS	5,5

#### **2.5.4 Molekulinių sietų chromatografija (SEC)**

Modifikuotas SEC metodas [42], pritaikytas sacharidų sudėties kitimo nustatymui sirupo gamybos metu, prieš ir po UF.

Analizės sąlygos:

- Eliuentas: 0,05 M NaNO<sub>3</sub>.
- Injekcija: 50 µl.
- Tėkmės greitis: 0,5 ml/min.
- Detekcija – lūžio rodiklio detektorius *Wyatt Optilab T-rEX Multi-Angle Light Scattering (MALS)*.
- Mėginiai prieš analizę filtruoti su membraniniu *GHP Acrodisc* švirkštiniu filtru (0,45µm).
- Vieno bandinio analizės trukmė 90 min.
- Kalibracijai naudoti gliukozės, maltozės (5 mg/ml) ir dekstranų (2 mg/ml) standartiniai tirpalai;

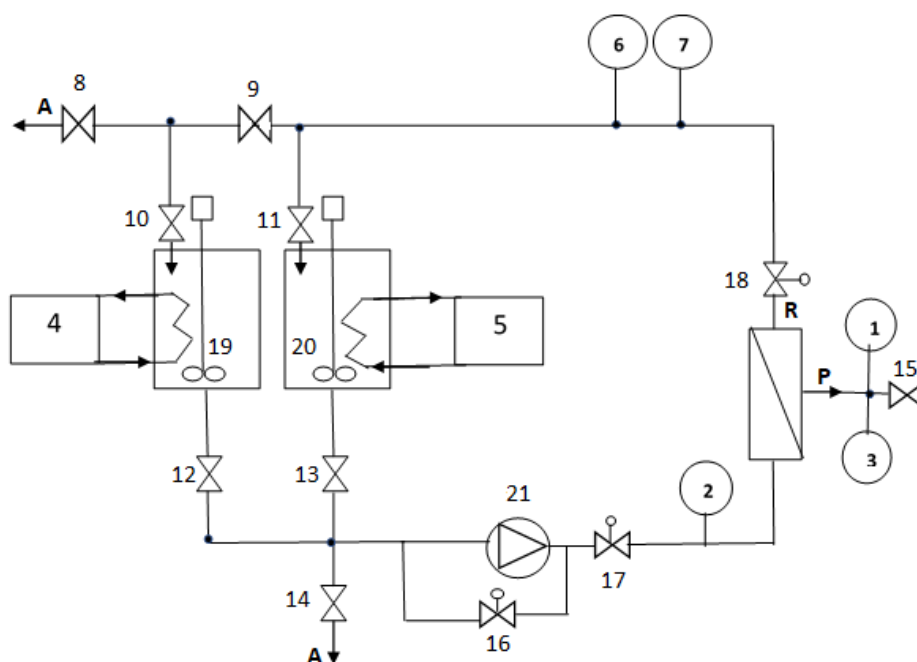
- Kolonėlės temperatūra 40 °C.
- Mėginio paruošimas: jei reikia, mėginys skiedžiamas su *MiliQ* vandeniu, toliau filtruojamas su švirkštiniu filtru. Į nufiltruotą mėginį pridedama 2 % DMSO.
- Naudotos kompiuterinės programos: *ASTRA6* ir *ChemStation*, o duomenys apdoroti *MS Excel* programa.

### 2.5.5 Ultrafiltracija

Ultrafiltracijos bandymams atlikti buvo sudaryta speciali sistema, pavaizduota 2.2 paveiksle. Membranų stendą ir vamzdelines polimerines membranas FP 200 (žr. 1. priedas) suteikė kompanija *PCI*, (filtracijos stendo leistini parametrai surašyti 3.7 lentelėje, o vamzdelinių membranų pateikti 2.8 lentelėje). Ultrafiltracijos procesas atliktas modifikuotos ir gamybinės fermentacijos gliukozės sirupams:

- A. Nevalytas krakmolo hidrolizatas su filtruojamumo fermentais po 24 valandų fermentacijos, iš sirupų cecho gamybinės linijos (transportuojamas į FP 200 membranas).
  - aa. A mėginio permeatas.
- B. Nevalytas krakmolo hidrolizatas su filtruojamaisiais fermentais po 24 valandų, iš sirupų cecho gamybinės linijos (transportuojamas į FP 200 membranas).
  - bb. B mėginio permeatas.
- C. Nevalytas krakmolo hidrolizatas su F1 ir *Lecitase Ultra* po 24 valandų, iš modifikuotos fermentacijos bandymų (transportuojamas į FP 200 membranas).
  - cc. C mėginio permeatas.
- D. Nevalytas krakmolo hidrolizatas su F1 ir *Lecitase Ultra* po 24 valandų, iš modifikuotos fermentacijos bandymų (transportuojamas į FP 200 membranas).
  - dd. D mėginio permeatas.

Viso eksperimento metu atlikti bandymai su FP 200 membranomis yra surašyti 2-ame priede, o naudoti parametrai pateikti 2.9 lentelėje.



**2.2 pav.** Gliukozės sirupo principinė pusiau gamybinės apimties ultrafiltracijos schema (P – permeato surinkimas; R– retentato cirkuliacija; A – atliekų šalinimas; 1, 2, 6 – slėgio matuokliai; 3 – permeato srauto matuoklis; 4, 5 – šildymo termostatai; 7 – retentato srauto matuoklis, 8–15 sklendės, 16–18 reguliuojamos sklendės, 19–20 talpų maišyklės, 21 – siurblys)

Membranų plovimas (CIP) buvo sudarytas iš tokių etapų (CIP parametrai pateikti 3.9. lentelėje): plovimo su vandeniu ir hipochlorito reagentu, o membranų konservavimui naudotas NaHSO<sub>3</sub>.

**2.7 lentelė.** Filtracijos stendo UF „Micro Laboratory Pilot Plant ROP 2035“ leistini parametrai [43]

Maksimalus slėgis	69 bar
Maksimalus slėgio nukritimas	1 bar
Darbinė temperatūra	5 - 60 °C
CIP temperatūra	30 °C
pH vykdant UF	2 - 11
pH vykdant CIP	1 - 13

**2.8 lentelė.** Informacija apie vamzdelinių polimerines membranas FP 200 [44]

Medžiaga	Polivinilidenfluoridas (PVDF)
Porų dydis	200 kDa
Matmenys	
Skersmuo	1,25 cm
Ilgis	32 cm
2 membranų plotas	250 cm <sup>2</sup> (0,025 m <sup>2</sup> )
Veikimo sąlygos	
Permeato srautas	5 – 50 ml/min

Rekomenduojamas slėgis	4 bar UF
Recirkuliacinis srautas	18 l/min kai linijinis greitis 2,5 m/s; 30 l/min kai greitis 4m/s;
Papildoma informacija	
Maksimalus slėgis	55 bar esant 70 °C; 70 bar esant 20 °C
Vamzdelių tūris	75 ml
Permeato tūris (pilnas)	750 ml
Permeato tūris (tuščias)	50 ml
Konstrukcija	316 nerūdijantis plienas su nitrilo gumos sandarikliais

**2.9 lentelė.** UF metu naudoti parametrai

	Temperatūra, °C	TMP slėgis, bar	Recirkuliacinis srautas, l/h	Greitis, m/s	pH
Plovimas vandeniu	20–25	2	1400–1450	3,3	7–8
UF	60	4	1400–1450	3,3	4,5–5,5
CIP su reagentais	20–25	2	1400–1450	3,3	4–11

### 2.5.6 Putojamumo nustatymas

Po UF atliktas krakmolo hidrolizato permeatų putojamumo testas [40], panaudojus dispergatorių *IKA Ultra-Turrax T25*.

150 g mėginio (2 lygiagretūs mėginiai) maišoma su *Ultra-Turrax T25* (30 s. nustačius 8500 1/min apukas, 8 min nustačius 10000 1/min apukas). Pasibaigus maišymui matuojamas putos ir skysčio kiekis. Tas pats kiekis matuojamas po 30, 60 ir 90 minčių. Atliekami putojamumo ir putos stabilumo skaičiavimai pagal formules (2.1), (2.2).

$$\text{Putojamumas (\%)} = \frac{V \text{ putų iškart po maišymo}}{V \text{ visas iškart po maišymo}} * 100\% \quad (2.1)$$

$$\text{Putos stabilumas (\%)} = \frac{V \text{ putos po 30;60;90 min maišymo} - V \text{ putų iškart po maišymo}}{V \text{ putų iškart po maišymo}} * 100\% \quad (2.2)$$

### 2.5.7 Šviesos sugerties nustatymas

Šviesos sugertis matuojama su spektrofotometru *Agilent 8453* [45, 46]. Parinktos 3 skirtingų ilgių bangos: 260, 280 ir 320 nm. Palyginamasis mėginys – *MiliQ* vanduo. Prieš matuojant mėginis, įvertinamas drumstumas su drumstumo matuokliu – *LaMotte Portable Turbidity Meter*. Jei reikia, mėginys skiedžiamas ir filtruojamas su 0,45 μm membraniniu *GHP Acrodisc* švirkštiniu filtru. Atliekami 3 kiekvieno mėginio matavimai.

Šviesą sugeriančių junginių šalinimo efektyvumui ultrafiltracijoje įvertinti naudota tokia formulė:

$$E(OD) = \frac{OD(f) - OD(p)}{OD(f)} * 100 \%$$

(2.3)

čia: OD(f) – krakmolo hidrolizato po 24 valandų šviesos sugertis,

OD(p) – atitinkamo permeato šviesos sugertis.

### 2.5.8 Azoto ir baltymų kiekio nustatymas

Bendras azoto ir baltymų kiekis įvertinamas su elementiniu analizatoriumi – *Thermo Scientific FLASH 2000 Organic Elemental (N/Protein) Analyzer* [40]. Tyrimus atliko AB „Amilina“ tyrėja I. Kukanauzienė. Azoto ir baltymų kiekis įvertintas nevalytuose krakmolo hidrolizatuose po fermentacijos ir jų permeatuose po UF.

Tiksliai pasvertas 20–100 mg mėginys aliuminio folijos tiglyuke automatiniu mėginių imtuvu paduodamas į pirmąjį reaktorių, kurio temperatūra 950 °C. Azoto turintys junginiai, padedant oksidacijos katalizatoriui, sudeginami iki azoto oksidų. Specialiais adsorbcijos filtrais atskiriamai susidare anglies oksidai ir vanduo. Antrajame reaktoriuje, užpildytame aukštos kokybės variu ir įkaitintame iki 840 °C temperatūros, azoto oksidai redukuojami iki azoto, kuris patenka į azoto ir kitų dujų atskyrimo chromatografinę kolonėlę ir kiekybiškai nustatomas šilumos laidumo detektoriumi. Chromatogramoms integruoti naudota *Eager Xperience* kompiuterinė programa. Prietaiso kalibracijos tiesei sudaryti buvo naudojami tiksliai pasverti asparto rūgšties mėginiai.

Buvo atliekama bent po 2 lygiagrečius matavimus, kurių verčių skirtumas nuo vidurkio mažesnis nei 5%.

Baltymų kiekiui mėginyje apskaičiuoti iš azoto kiekio matavimo rezultatų naudojama tokia formulė:

$$C(\text{balt.}) = (N - P/31 * 14) * 6,25; \quad (2.4)$$

čia: C (balt.) – baltymų kiekis mėginyje, % SM

N – azoto kiekis mėginyje, % SM

P – fosforo kiekis mėginyje, % SM.

Koeficientas 6,25 taikomas kviečių baltymų perskaičiavimui iš azoto kiekio. (2.4) formulės narys  $P/31 * 14$  leidžia įvertinti azoto kiekį, esantį ne baltymuose, bet fosfatidilcholino grupę turinčiuose junginiuose (LPL, PL ir GPC).

Baltymų šalinimo ultrafiltracijos metu efektyvumui įvertinti naudota tokia skaičiavimų formulė:

$$E(\text{balt.}) = 1 - \frac{\text{Baltymai}(p)}{\text{Baltymai}(f)} * 100 \% \quad (2.5)$$

čia: Baltymai(f) – baltymų kiekis krakmolo hidrolizate po 24 valandų fermentacijos, %SM.

Baltymai(p) – atitinkamo permeato baltymų kiekis, % SM.

### 2.5.9 Fosforo kiekio nustatymas

Bendras fosforo kiekis nustatytas ICP masių spektrometru – *Elan DRC II* naudojant deguonies ir argono dujas [40], analizę atliko AB „Amilina“ vyr. tyrėja D. Šidlauskienė. Bendram fosforui nustatyti naudojami tik skaidrūs tirpalai, juose negali būti nuosėdų, todėl mėginiai mineralizuojami su mineralizatoriumi *CEM MARS*.

Tiksliai pasvertas 2 g mėginys arba distiliuotas vanduo (vanduo naudojamas kaip palyginamasis tirpalas) užpilamas 10 ml 70 % azoto rūgštimi ir 1 ml 30 % vandenilio peroksidu. Mineralizacija atliekama 180 °C temperatūroje, 300 bar slėgyje. Pasibaigus mineralizacijai mėginiai paliekami minutę atidaryti, azoto dujoms nugaruoti. Mėginiai kiekybiškai perpilami į reikiamo tūrio matavimo kolbas ir kolbos turinys praskiedžiamas azoto rūgšties tirpalu. Duomenys apdorojami *MS Excel* programa.

Fosforo šalinimo ultrafiltracijos metu efektyvumui įvertinti naudota tokia skaičiavimų formulė:

$$E(P) = 1 - \frac{\text{Fosforas}(p)}{\text{Fosforas}(f)} * 100 \% \quad (3.6)$$

čia: Fosforas (f) – fosforo kiekis krakmolo hidrolizate po 24 h fermentacijos, % SM,

Fosforas (p) – atitinkamo permeato fosforo kiekis, % SM.

### 2.5.10 Centrifuginis testas

Vykdamas krakmolo hidrolizato cukrinimą, pusiau gamybinės apimties bandymuose buvo atliktas centrifuginis testas [37], naudojant centrifugą – *Eppendorf 5702*. Šis testas įvertina sirupo priemaišų sedimentacijos ir separacijos procesus. Tirti 3 mėginiai: krakmolo hidrolizatas iš skystinimo etapo be filtruojamumą gerinančių fermentų, mėginiai po 5 ir 22 valandų trukusios krakmolo hidrolizato modifikuotos fermentacijos. Rezultatai lyginami su gamyboje gautu sirupu, naudojant standartinį filtruojamumo fermentų mišinį.

Procedūra: 45 ml mėginio įdedama į centrifugą, nustatoma 3000 G jėga, centrifuguojama 10 minučių.

### 2.5.11 Kapiliarinės difuzijos testas (CST)

Atliekant krakmolo hidrolizato cukrinimo stadiją didesnės apimties bandymuose buvo daromas CST testas [40], naudojant *Triton Type 319 Multi-purpose CST* aparatą. Gauti rezultatai parodo filtracijos proceso greitį. Matuoti 3 mėginių CST: pradinio krakmolo hidrolizato (be filtruojamumo fermentų mišinio), praėjus 5 ir 22 valandoms po fermentų sudozavimo. Rezultatai lyginami su gamybos sąlygomis fermentuojamu krakmolo hidrolizatu.

Procedūra: mėginys pašildomas iki 50–60 °C, 10 mm cilindras užpildomas bandiniu, filtratas tam tikrą laiką difunduoja filtriniu popieriumi, difuzijai pasibaigus fiksuojama trukmė.

### 2.5.12 Masių spektrometrija (MS / MS)

Pusiau kiekybinė, modifikuotos ir gamybinės fermentacijos permeatų analizė atlikta su masių spektrometru *Thermo LTQ XL* [47, 48, 49]. Eksperimentą atliko AB „Amilina“ tyrėjas G. Plakys.

Analizės sąlygos:

- Eliuentai: A – ACN/H<sub>2</sub>O (60:40) su 10 mM amonio formiato ir 1 % NH<sub>4</sub>OH; B – Izopropanolis/ACN (90:10) su 10 mM amonio formiato ir 1 % NH<sub>4</sub>OH.
  - Mėginio tirpiklis – ACN:IPA:H<sub>2</sub>O, v/v/v (65:30:5).
- Eliuentų gradientas, naudotas MS / MS analizės metu, nurodytas 2.10 lentelėje.

**2.10 lentelė.** Eliuentų gradientas, naudotas MS / MS analizės metu.

Laikas, min	A, %	B, %
0	95	5
2	88	12
14	0	100
23	0	100

26	95	5
30	95	5

- Injekcija: 10 µl.
- Eliuento srautas: 0,4 ml/min.
- Ekstraktai prieš analizę filtruoti su membraniniu *GHP Acrodisc* švirkštiniu filtru (0,45µm).
- Vieno bandinio analizės trukmė 30 min.
- Kolonėlės temperatūra 60 °C.
- Temperatūra kapiliare 275 °C.
- Įtampa kapiliare: teigiama 35 V ir neigiama -35 V.
- Purškimo įtampa 5 kV.
- Įtampa vamzdžio lęšyje: teigiama 110 V ir neigiama -200 V.
- Skenavimo laukas 110–2000 m/z.
- Fragmentacija – *CID (Collision induced dissociation)*.
- MS/MS : skaidomos dvi intensyviausios smailės iš viso spektro.
- Chromatogramų plotų skaičiavimas / atsako įvertinimas – *Thermo Xcalibur Qual Browser* programa, duomenys apdoroti *MS Excel* programa.
- Masių analizatorius – *Linear Ion-trap* (jonų gaudyklė).
- Jonizacijos tipas: teigiama (+) (PC ir LPC) ir neigiama (-) (FFA) (žr. 2.11 lentelė).

**2.11 lentelė.** MS / MS analizės metu lipidų identifikavimui naudoti parametrai.

<b>Junginys</b>	<b>Molinė masė</b>	<b>Junginio m/z</b>	<b>Išėjimo trukmė, min</b>
<b>FFA PA -</b>	256,2	255,3	0,79
<b>FFA LA -</b>	280,2	279,2	0,79
<b>LPC LA +</b>	519,3	520,2	1,23
<b>LPC PA +</b>	495,3	496,4	1,56
<b>PC LL +</b>	781,6	782,6	10,95
<b>PC PL +</b>	757,6	758,5	11,45
<b>PC PP +</b>	733,6	734,6	11,93



### 2.5.13 Rezultatų tikslumo ir patikimumo įvertinimas

Standartinis nuokrypis (SN) skaičiuotas pagal formulę:

$$SN = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (2.7)$$

Standartinė paklaida (SP) skaičiuota pagal formulę:

$$SP = \frac{SN}{\sqrt{n}} \quad (2.8)$$

Santykinė standartinė paklaida skaičiuota pagal formulę:

$$SSP = \frac{SP}{\bar{x}} \quad (2.9)$$

Koreliacijos koeficientas skaičiuotas pagal formulę:

$$Correl(X, Y) = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} \quad (2.10)$$

Duomenys apdoroti *MS Excel* programa ir pateikti kaip 2–3 matavimų vidurkiai +/- SN.

### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1 Laboratoriniai fermentacijos bandymai

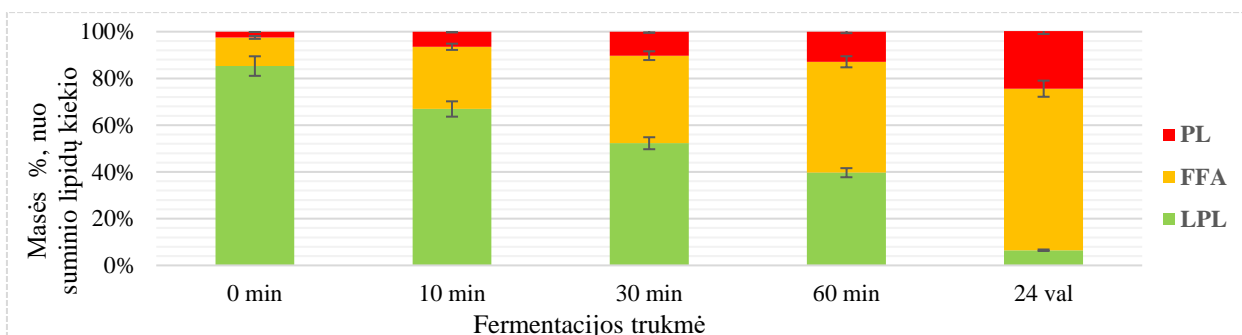
Skyriuje aptariami rezultatai, gauti išbandžius 4 skirtingas lipazes ir jų mišinius, esant skirtingiems parametrams. Bandymai buvo vykdomi su gliukozės sirupu DE 28 (krakmolo hidrolizatu), gautu iš AB „Amilina“ sirupų cecho, prieš įvedant į jį filtruojamumo fermentus. Pirmiausia buvo norima išsiaiškinti gamyboje naudojamos lizofosfolipazės lipidų skaidymo produktus ir jų įtaką produkto grynumui. Toliau buvo siekama rasti lipazių mišinį, kurio metu susidaro mažiausio tirpumo lipidų skilimo produktai ir jį optimizuoti, todėl buvo vykdomi laboratoriniai bandymai. Jų metu buvo koreguojami lipazių kiekiai, lipazių mišiniai ir pH. Fermentacijos trukmė visais atvejais buvo 24 valandos, o fermento inaktyvacija vyko pH koreguojant iki 2 su 2N HCl ir pakaitinant sirupą 50 s iki 80 °C. Visiems mėginiams buvo atlikta modifikuota *Blight* ir *Dyer* lipidų ekstrakcija, po jos mėginiai buvo praleisti per HPLC sistemą su *CAD* detektoriumi.

##### 3.1.1 Bandymai su gamyboje naudojama lizofosfolipaze

Dėl įmonei priklausančios konfidencialios informacijos apie gliukozės sirupų gamybos technologiją šio fermento tikslus pavadinimas nėra įvardytas. F1 yra lizofosfolipazė, gerinanti filtruojamumą gliukozės sirupo gamybos technologijoje. Bandymų metu nustatyti šio fermento lipidų skilimo produktai. Fermentacijos metu dozuotas F1 kiekis – 171 µL/L sirupo, o temperatūra (60 °C) ir pH (4,5–4,7) išlaikyti tokie patys, kaip ir sirupo gamybos metu ceche.

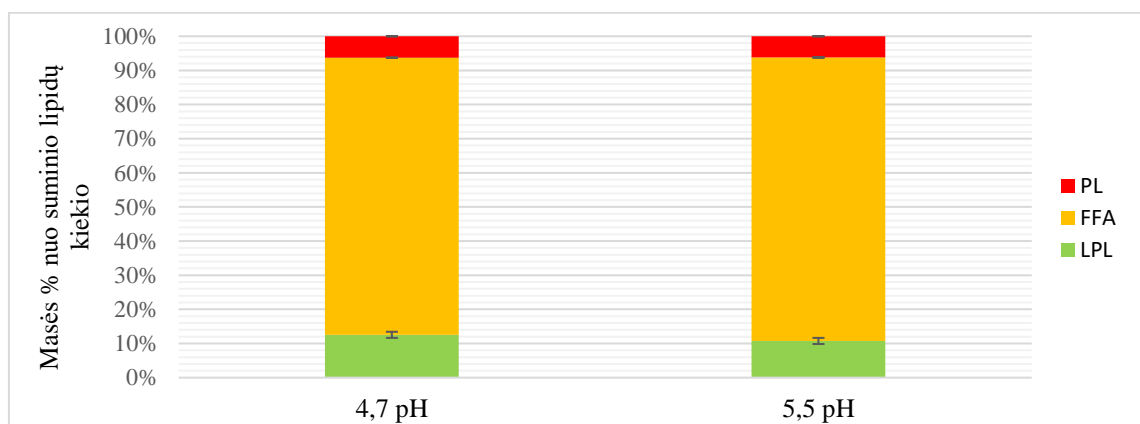
Pradiniame mėginyje (0 min, be F1) LPL kiekis buvo 78 %, FFA 11 %, PL 2%. Po 24 valandų LPL kiekis sumažėjo iki 7 %, FFA išaugo iki 69 %, PL susidarė 25 % (žr. 3.1 pav.). Rezultatai po 24 valandų fermentacijos parodė, jog lizofosfolipazė hidrolizuoja lipidus, nes FFA kiekis padidėjo 6 kartus, kas yra gerai, nes tai yra mažesnio tirpumo junginiai, todėl jie yra sulaikomi membranose ir nepatenka į galutinį produktą. Tačiau drauge didėja ir PL kiekis. PL pasižymi geromis emulsinėmis savybėmis, kas šiuo atveju yra nenaudinga, nes būtent šie dariniai padidina hidrofobinių junginių tirpumą, sudaro miceles ir kemša ultrafiltracijos membranas, taip stabdydami filtracijos procesą ir blogindami produkto grynumą. PL susidarymą gali lemti atvirkštinė esterifikacijos (acilinimo) reakcija, kurios metu LPL reaguojant su FFA susidaro PL, kai reakcija katalizuojama PLA2 [14]. Gali būti, jog gamyboje naudojama lizofosfolipazė turi dalinį PLA2 aktyvumą.

Įsitikinta, kad fermento veiksmingumo nustatymui pakanka 24 valandų fermentacijos, nes po 48 valandų žymesnio skirtumo nepastebėta, todėl tolimesni tyrimai buvo vykdomi išlaikant fermentaciją 24 valandas.



**3.1 pav.** Krakmolo hidrolizato lipidų profilio kitimas laike vykdant fermentaciją su F1, sąlygos: pH 4,5–4,7, 60 °C, 171  $\mu\text{L/L}$

Toliau buvo vykdomi bandymai su F1, tik buvo keičiamas terpės pH ir fermento dozė. Po cukrinimo etapo sirupo pH svyruoja nuo 4,5 iki 4,7. Toks pH palaikomas, kad optimaliai veiktų cukrinimo fermentai. Šio eksperimento metu naudojant 1M NaOH tirpalą mėginio pH buvo privestas iki 5,5, o fermento dozė buvo 342  $\mu\text{L/L}$  sirupo. Toks pH palankesnis daugumai lipazių. Nustatyta, kad praėjus 24 valandoms nuo fermentacijos pradžios palyginamajame mėginyje – sirupe, kurio pH 4,7 (žr. 3.2 pav) – FFA kiekis nuo 28 % išaugo iki 84 %, o aukštesnio pH mėginyje – iki 83 %. Nors fermento kiekis buvo dvigubai didesnis nei prieš tai darytame bandyme, reakcijos metu vis vien susidarė PL, jų kiekis siekė 6 % masės nuo suminio lipidų kiekio. Fermento aktyvumui pH pokytis reikšmingos įtakos neturėjo, tačiau fermento kiekio didinimas lėmė spartesnę reakcijos vyksmą. Tolimesni bandymai buvo vykdomi su padidintu fermento F1 kiekiu (342  $\mu\text{L/L}$ ) ir su 4,7 ir 5,5 pH.



**3.2 pav.** Krakmolo hidrolizato lipidų sudėtis po 24 valandų fermentacijos su F1 (342  $\mu\text{L/L}$ ), 60 °C

### 3.1.2 Bandymai su F1 ir kitomis lipazėmis

Prieš tai aptartuose bandymuose buvo pastebėta, jog lizofosfolipazė F1 galutinai nesuskaido LPL, bet tuo pačiu dar ir pagamina PL, kaip manoma dėl esterifikacijos reakcijos. Abu šie junginiai yra tirpūs vandenyje ir ultrafiltracijos metu jie nebūtų sulaikomi retentate, o patektų į galutinį produktą, todėl buvo nuspręsta išbandyti 3 skirtingus fermentų mišinius, kurie leistų visiškai sumažinti LPL ir PL kiekius. Rezultatai apibendrinti 3.1 lentelėje.

Pirmieji bandymai atlikti su *Lecitase Ultra*, kuri veikia kaip PLA1, t.y. hidrolizuoja fosfolipidų esterines jungtis 1 padėtyje, taip susidarant 2-acil-lizofosfolipidams ir FFA. Šiam fermentui tinkamas pH yra iki 6, F1 tai nėra optimalus pH, bet jis patenka į fermento veikimo ribas [50]. Fermento *Lecitase Ultra* dozė buvo 80 µL/L sirupo, o F1 342 µL/L sirupo. Nuo reakcijos pradžios LPL kiekis sumažėjo 8 kartus prie pH 5,5 ir 6 kartus prie pH 4,7. FFA kiekis išaugo 3 kartus prie 5,5 pH ir 4,7 pH. Svarbiausias pastebėtas dalykas išbandant šį fermentų mišinį buvo tai, jog po 24 valandų fermentacijos prie pH 5,5 visiškai nesusidarė PL, taip pat ir mėginyje, kurio pH buvo 4,7, PL kiekis siekė tik 4 % nuo suminio lipidų kiekio (žr. 3.1 lentelė). Sirupe, kurio pH buvo 5,5, liko daugiau nei 90 % vandenyje blogai tirpstančių FFA, o likusią dalį sudarė tirpūs LPL.

Kitas išbandytas fermentas buvo koncentruota lipazė, triacilglicerolio acilhidrolazė *Vilzim LIP*. Parametrai buvo išlaikyti tokie pat, kaip ir prieš tai darytuose bandymuose (60 °C ir 4,7–5,5 pH). F1 dozė buvo 342 µL/L, o *Vilzim LIP* 30 µL/L. Temperatūros vertės šiam fermentui svyruoja nuo 25 iki 75 laipsnių, tačiau palankiausia temperatūra yra 37–50 °C. Pagal gamintojo specifikaciją, ši koncentruota lipazė natūralius lipidus turėtų skaidyti į FFA [40], pagal gautus rezultatus (žr. 3.1 lentelė) FFA kiekis išaugo 4 kartus esant 4,7 pH, ir 3 kartus esant 5,5 pH. Esant skirtingiems terpės pH, abiejuose mėginiuose po 24 valandų fermentacijos susidarė PL. Esant pH 5,5 PL kiekis buvo 1,5 karto didesnis nei mėginyje kurio pH buvo 4,7. *Vilzim LIP* optimalus veikimo pH yra 7,5–8,5, todėl šiuo atveju 5,5 pH buvo artimesnis optimumo taškui, ir visgi tiek FFA, tiek PL susidarymo atžvilgiu gautas priešingas efektas, kai žemesniame pH lipazė suveikė kiek efektyviau. LPL kiekis abiem atvejais sumažėjo 8 kartus. Lyginant su prieš tai išbandytu fermentų mišiniu, triacilglicerolio acilhidrolazė įvertinta kaip mažiau tinkama lipazė gliukozės sirupo filtruojamumo gerinimui, nes bandymo metu susidarė daugiau PL, taip pat fermentas prie šių parametrų pilnai nevykdė reakcijos, nors jie ir patenka į fermento veikimo ribas.

Paskutinis fermentų mišinys buvo F1 ir *LIPOMOD*. Išlaikytos sąlygos: 60 °C ir 5,5 pH. *LIPOMOD* turi esterazinį ir lipazinį aktyvumą. Lipazės ir esterazės hidrolizuoja TG, atpalaiduodamos

FFA. Fermentas veikia tiek trumpo, vidutinio ir ilgo ilgio riebalų rūgštis, skeldamas jas visose trijose pozicijose. Fermentas daugiausia naudojamas kiaušinio baltymo putojimo gerinimui, tačiau yra tinkamas ir bendrai riebalų hidrolizei [50]. Optimalus pH šio fermento veikimui yra 5,5, todėl bandymai buvo atlikti tik esant šiam pH. Rekomenduojamas temperatūros intervalas – nuo 40 iki 55 laipsnių, tačiau visais optimizavimo atvejais temperatūra buvo išlaikoma 60 °C, nes tai optimali temperatūra kitiems sirupo gamybos ir gryninimo etapams.

Pagal gautus rezultatus matyti, jog galutiniame fermentacijos taške susidarė 14 % PL. LPL kiekis nuo fermentacijos pradžios sumažėjo tik 1,9 karto, o FFA atsipalaidavo nuo 8 % prieš fermentaciją iki 40 %. Dėl tokio mažo konversijos laipsnio fermentas nustatytas kaip netinkamas, taip pat susidarė ir nepageidaujamieji PL. Tai reiškia, kad mėginyje po fermentacijos liko daugiau tirpių lipidų nei netirpių, kas ultrafiltracijos metu neleisėtų išvalyti produkto.

**3.1 lentelė.** Fermentacijos optimizavimo lipidų profilio rezultatai su skirtingais fermentų mišiniais po 24 valandų fermentacijos, n=4

Fermentų mišinys	Fermentų dozės	pH	LPL masės % nuo suminio lipidų kiekio	FFA masės % nuo suminio lipidų kiekio	PL masės % nuo suminio lipidų kiekio
F1 su <i>Lecitase Ultra</i>	342 µL/L ir 80 µL/L	4,7	12,3 ± 0,1	83,9 ± 0,8	3,9 ± 0,9
	342 µL/L ir 80 µL/L	5,5	8,7 ± 1,0	91,3 ± 1,0	0,0±0,0
F1 su <i>Vilzim LIP</i>	342 µL/L ir 30 µL/L	4,7	10,0 ± 2,0	70,7 ± 2,0	19,3 ± 3,0
	342 µL/L ir 30 µL/L	5,5	9,9 ± 1,0	63,0 ± 1,0	27,1 ± 1,0
F1 su <i>LIPOMOD</i>	342 µL/L ir 20 mg/kg	5,5	46,0 ± 2,0	39,7 ± 6,0	13,6 ± 4,0

Apibendrinus tyrimus nuspręsta, kad tinkamiausias mišinys sirupo filtruojamumo savybių gerinimui yra *Lecitase Ultra* ir F1. Todėl tolimesni didesnės apimties technologiniai bandymai buvo vykdomi su F1 342 µL/L doze ir *Lecitase Ultra* 80 µL/L, esant 60 °C ir 5,5 pH, nes tik su šiuo fermentų mišiniu galutiniame fermentacijos taške nesusidarė vandenyje tirpių PL, o lipidų konversija, t.y. LPL suskaidymas ir FFA kiekio išaugimas, buvo didžiausias.

## **3.2. Technologiniai bandymai**

Fermentacija su parinktu fermentų mišiniu ir nustatytais sąlygomis buvo atliekama su 25 L sirupo. Po fermentacijos, patikrinus sirupo filtruojamumą toliau aprašytais CST ir centrifuginiu testais bei įsitikinus lipidų konversija HPLC metodu, sirupas buvo filtruojamas pilotiniu ultrafiltracijos stendu. Palyginimui buvo atlikta ultrafiltracija ir su gamybos sąlygomis fermentuotu krakmolo hidrolizatu.

### **3.2.1 Preliminarus sirupo paruošimo filtravimui įvertinimas**

CST testas leidžia įvertinti gliukozės sirupo paruošimą filtravimui. Gliukozės sirupo gamybos įmonėse nustatyta, kad CST vertė gerai koreliuoja su filtracijos greičiu: kuo mažesnis CST, tuo spartesnė filtracija. Todėl ir šio projekto technologiniuose bandymuose šis testas buvo atliktas tam, jog įsitikintume, ar tikrai fermentų mišinys yra veiksmingas ir leidžia tikėtis pakankamai sparčios filtracijos. Buvo matuojamas 3 mėginių CST: pradinio (be fermentų mišinio), praėjus 5 ir 22 valandoms po fermentų sudozavimo ir lyginama su gamybos sąlygomis fermentuojamu sirupu (žr. 3.2 lentelė). Pradinio mėginio CST trukmė buvo 1072 s, po 5 valandų 193 s, o po 22 valandų 271 s. Šie rezultatai parodo, kad fermentų mišinys yra veiksmingas ir hidrolizuoja mėginyje esančius lipodus. Pradinio mėginio (be fermentų) CST truko ilgiausiai, nes lipidai nepradėti skaidyti ir mėginys sunkiai difunduoja filtriniu popieriumi. Po 5 valandų laikas sumažėjo 5 kartus lyginant su pradiniu mėginiu, nes fermentai jau pradėję hidrolizinti riebalus. Mėginio, kurio fermentacija truko 22 valandas, CST trukmė buvo 1,5 karto ilgesnė nei mėginio po 5 valandų fermentacijos, nors turėtų būti trumpesnė. Šis skirtumas galėjo atsirasti dėl to, jog mėginys prieš analizę atvėso (matuojant CST temperatūra turi būti 60 °C), o jį pašildžius vandens vonelėje mėginio savybės šiek tiek pakito ir difuzija popieriumi sulėtėjo. Lyginant gamyboje gautą ir eksperimentinėje fermentacijoje paruoštą sirupus, matoma, jog laboratoriniuose bandymuose parinktas lipazių mišinys jau po 5 valandų geriau suskaidė lipodus, nei gamyboje naudojamas filtruojamumo fermentų mišinys po 8 valandų.

**3.2. lentelė.** Sirupo paruošimo filtravimui modifikuotos ir gamybinės fermentacijos preliminarus įvertinimo duomenys

Mėginys	Trukmė nuo filtruojamumo fermentų sudėjimo	CST, sekundės	Nuosėdos, ml	Riebalai, ml
<b>Modifikuota fermentacija</b>	0 min	1072	3	-
	5 val	193	2	0,5
	22 val	271	2	1
<b>Gamyboje naudojama fermentacija</b>	8 val	464	2	0,5
	18 val	215	2	0,5

CST testas patvirtino, kad parinktas fermentų mišinys vykdo lipidų skaidymą sparčiau, nei gamyboje naudojamas filtruojamumo fermentų mišinys.

### 3.2.2 Centrifuginis testas

Sedimentacijos ir separacijos procesams įvertinti atliktas centrifuginis testas. Teigiamas šio testo rezultatas – gerai atsiskiriantys (išplaukiantys į paviršių) lipidai, palyginti kietas jų sluoksnis – leidžia daryti prielaidą, kad ultrafiltracija vyks gerai. Pradiniame mėginyje (be filtruojamumo fermentų) po centrifugavimo pastebėta tik sedimentacija, susidariusių nuosėdų kiekis siekė 3 ml. Atlikus šį testą po 5 valandų modifikuotos fermentacijos, pastebėtas sedimentacijos ir lipidų separacijos procesas, tie patys procesai nustatyti ir gamybiniame mėginyje praėjus 8 valandoms po fermentų sudėjimo (žr. 3.2 lentelė). Optimizuotos fermentacijos mėginyje, po 22 valandų, nuosėdų kiekis siekė 2 ml, o išplaukę į viršų lipidai sudarė 1 ml tūrio (žr. 3.3 pav.), kai tuo tarpu gamybiniame mėginyje po 18 valandų nebuvo pakitimų lyginant su ankstesniu mėginiu.

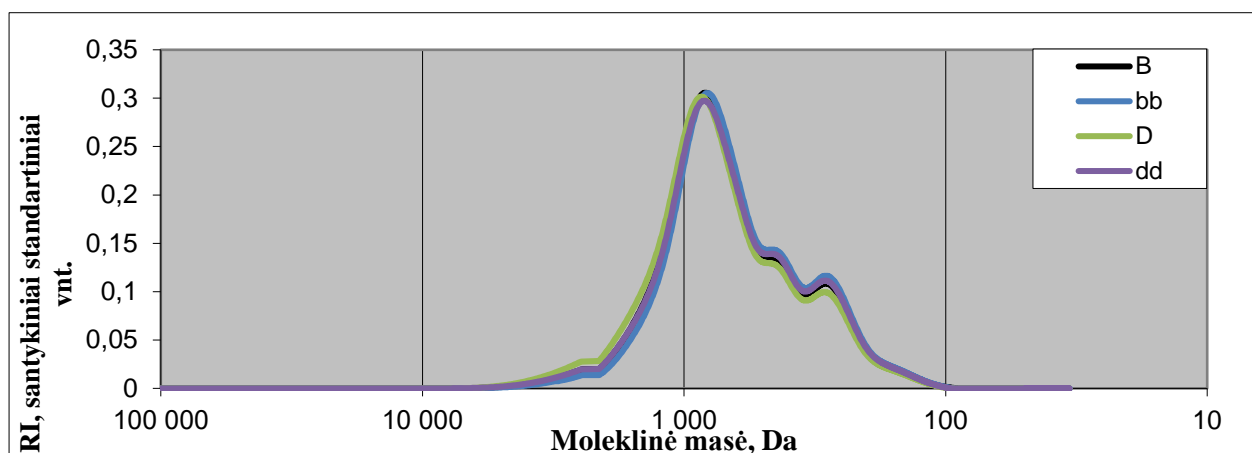


**3.3 pav.** Kairėje pusėje pradinis krakmolo hidrolizato mėginys, kuriame nematyti separacijos proceso, dešinėje pusėje mėginys po 22 valandų modifikuotos fermentacijos ir matomi į viršų išplaukę lipidai.

### 3.2.3. Sacharidų sudėties įvertinimas

SEC analizė naudota gamybinių ir modifikuotos fermentacijos nevalytų krakmolo hidrolizatų ir permeatų sacharidų sudėties įvertinimui. Analizės metu buvo siekiama išsiaiškinti, ar filtruojamumą gerinantys fermentų mišiniai turi įtakos didelės molekulinės masės sacharidų sulaikymui membranoje.

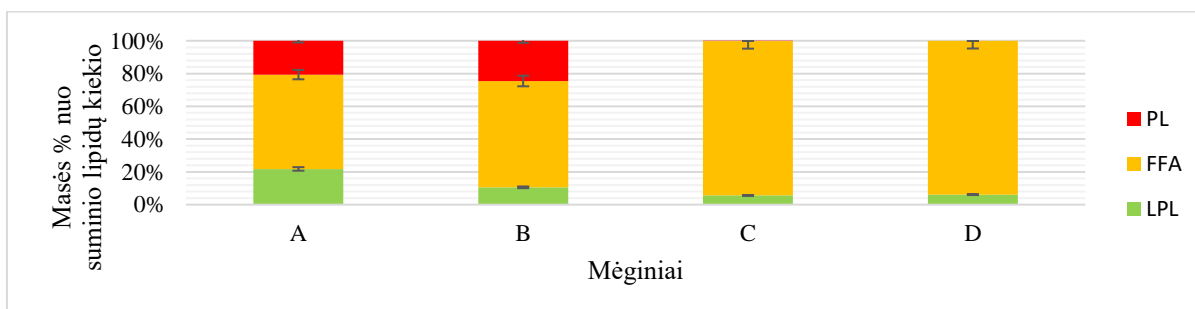
3.4 paveiksle akivaizdžiai matyti, jog tiek gamybinių, tiek optimizuotos fermentacijos ir UF permeatų sacharidų molekulinė masių pasiskirstymas sutampa. Šie rezultatai parodo, jog ir gamyboje naudojami filtruojamumo fermentai, ir pusiau gamybinės apimties bandymuose naudoti fermentai neturi įtakos cukrinimo etapo krakmolo hidrolizatams. Cukrinimo metu susidarę sacharidai yra tirpios vandenyje medžiagos, ir jų molekulinė masė tokia, kad membranų poros jų nesulaiko ir jie patenka į permeatą.



**3.4 pav.** Modifikuotos ir gamybinės fermentacijos nevalytų krakmolo hidrolizatų ir UF permeatų sacharidų molekulinės masės pasiskirstymas (D – nevalytas krakmolo hidrolizatas po 22 valandų modifikuotos fermentacijos, dd – modifikuotos fermentacijos UF permeatas, B – nevalytas gamybinis krakmolo hidrolizatas po fermentacijos, bb – gamybinis UF permeatas)

### 3.2.4 Lipidų sudėties nustatymas

HPLC lipidų analizė atlikta mėginiams po 24 valandų modifikuotos fermentacijos su optimizuotu fermentų mišiniu (F1 ir *Lecitase Ultra*) (C ir D mėginiai). Kontroliniai mėginiai buvo gliukozės sirupai po cukrinimo stadijos gamyboje su standartiniais filtruojamumą gerinančiais fermentais (A ir B mėginiai). Mėginiai buvo gauti iš AB „Amilina“ sirupų cecho.



**3.5 pav.** Krakmolo hidrolizato lipidų kiekis masės % po modifikuotos (C, D) ir gamybinės (A, B) fermentacijos su filtruojamumą gerinančiais fermentais



Kontroliniuose A ir B mėginiuose matyti susidarę PL, jų kiekis masės % vidutiniškai siekė 23 % nuo visų mėginyje esančių lipidų. C ir D mėginiuose PL nenustatyta, tirpiųjų LPL kiekis abiejuose mėginiuose buvo 6 %, t.y. 3,8 karto mažiau nei A ir B mėginiuose (žr. 3.5 pav). FFA atsipalaidavo po 94 % ir C, ir D mėginyje, t.y. 1,5 karto daugiau nei A ir B mėginyje. C ir D mėginių rezultatai atitinka laboratorinių optimizacijos bandymų rezultatus (F1 ir *Lecitase Ultra*, 60 °C, pH 5,5), koreliacijos koeficientas 0,9.

### **3.3 Technologiniai ultrafiltracijos bandymai**

Ultrafiltracijos tyrimai atlikti su *PCI Micro Pilot Plant* stendu ir FP 200 vamzdelinėmis polimerinėmis membranomis. Visos bandymo sąlygos taikytos tokios, kad būtų kuo panašesnės į gamyboje vykdomą ultrafiltraciją. Visi ultrafiltracijos bandymai ir parametrai surašyti 3.3 lentelėje. Sirupas DE 95 naudotas pasiruošimo darbams, t.y. membranų užnešimui, kad rezultatai būtų kuo patikimesni, nes pastebėta, kad naujų membranų efektyvumas pirmuosiuose darbo-plovimo cikluose stipriai skiriasi lyginant su vėlesniais ciklais. UF visų bandymų metu buvo vykdoma prie 60 °C, recirkuliacinis srautas 1400–1430 l/h, TMP UF metu 4 bar, plovimo metu 2 bar. Mažesnis slėgis plovimo metu užtikrina geresnį membranų išsivalymą. Linijinis greitis svyravo nuo 3,00 iki 3,30 m/s. Vidutinis permeato srautas skirtinguose bandymuose svyravo nuo 38 iki 64 LHM. Tokiam nemažam skirtumui įtakos galėjo turėti krakmolo hidrolizato savybės, sausų medžiagų koncentracija ir pan. Retentato sukonzentravimo faktorius filtravimo metu būdavo nedidelis (< 2). Buvo tikrinama, kad prieš kiekvieną bandymą vandens srautas būtų panašus – tai leidžia užtikrinti kuo panašesnę membranų atplovimą, kad šis neturėtų įtakos rezultatams.

**3.3 lentelė.** Projekto metu atliktų ultrafiltracijos bandymų parametrų suvestinė

Bandymas	Režimas	Trukmė, min	Recirkuliacinis srautas, (l/h)	Permeato srautas, (l/h)	Permeato srautas, LHM	Slėgis, bar	Linijinis retentato greitis V(m/s)	Temperatūra, °C
<b>DE95</b>	CIP su H <sub>2</sub> O	25	1405	8,90	353	2	3,18	25
	<b>UF</b>	<b>165</b>	<b>1429</b>	<b>1,08</b>	<b>43</b>	<b>4</b>	<b>3,24</b>	<b>60</b>
	CIP su NaClO	40	1413	7,03	280	2	3,20	25
	CIP su NaHSO <sub>3</sub>	30	1428	13,23	526	2	3,23	25
<b>A</b>	CIP su H <sub>2</sub> O	40	1434	11,03	428	2	3,25	25
	<b>UF</b>	<b>206</b>	<b>1413</b>	<b>0,90</b>	<b>36</b>	<b>4</b>	<b>3,20</b>	<b>60</b>
	CIP su NaClO	90	1440	10,40	413	2	3,26	25
<b>B</b>	CIP su H <sub>2</sub> O	12	1419	12,31	49	2	3,21	25
	<b>UF</b>	<b>180</b>	<b>1417</b>	<b>1,30</b>	<b>50</b>	<b>4</b>	<b>3,21</b>	<b>60</b>
	su NaClO	60	1405	6,75	268	2	3,18	25
	CIP su NaHSO <sub>3</sub>	60	1430	10,59	421	2	3,24	25
<b>C</b>	CIP su H <sub>2</sub> O	5	1420	18,67	742	2	3,22	25
	<b>UF</b>	<b>170</b>	<b>1421</b>	<b>1,60</b>	<b>64</b>	<b>4</b>	<b>3,22</b>	<b>60</b>
	CIP su NaClO	60	1416	8,32	331	2	3,21	25
	su NaHSO <sub>3</sub>	40	1359	15,27	607	4	3,08	25
<b>D</b>	CIP su H <sub>2</sub> O	7	1428	21,78	866	2	3,23	25
	<b>UF</b>	<b>164</b>	<b>1425</b>	<b>0,95</b>	<b>38</b>	<b>4</b>	<b>3,23</b>	<b>60</b>
	CIP su NaClO	80	1430	7,62	302	2	3,24	25
	CIP su NaHSO <sub>3</sub>	60	1416	12,42	494	2	3,21	25

### 3.3.1 Filtracijos produktų tyrimai

#### 3.3.1.1 Spektrofotometriniai tyrimai ir elementinė analizė

Tyrimų rezultatai apibendrinti 3.4 lentelėje. Šviesos sugertis ties 280 nm banga leidžia įvertinti tirpių baltymų kiekį. Lygiagrečiai baltymų kiekis vertintas ir matuojant azoto kiekį mėginiuose. Šis metodas leidžia įvertinti bendrą baltymų (tiek tirpių, tiek ir netirpių) koncentraciją. Visgi mėginiuose esant nemažam kiekiui kitų azoto turinčių junginių (šiuo atveju fosfocholinų), reikia papildomų skaičiavimų. Fosfocholinų ir jų turimo azoto kiekis buvo įvertintas pagal fosforo matavimus ir baltymų koncentracijos skaičiavimuose atimtas iš pamatuoto bendrojo azoto kiekio.

Baltymų šalinimo efektyvumo pagal azoto matavimus rezultatai silpnai koreliuoja su spektrofotometriniais duomenimis, koreliacijos koeficientas 0,4. Efektyvumas pagal spektrofotometrinius matavimus mažesnis, nes greičiausiai tirpiųjų baltymų šalinama mažiau nei netirpių, kurių kiekis įvertintas pagal azoto kiekį (žr. 3. priedas). Galima pastebėti, kad po modifikuotos fermentacijos tirpių baltymų buvo pašalinta kiek daugiau, nei po standartinės fermentacijos, tačiau skirtumas nėra reikšmingas dėl didelio duomenų išsibarstymo lygiagrečiuose bandymuose.

Dar pagal gautus rezultatus galime apibendrinti, kad fermentų mišinio pakeitimas neturi įtakos baltymų šalinimui. Baltymų šalinimo efektyvumo rezultatai rodo, jog tiek gamybiniuose, tiek modifikuotos fermentacijos bandiniuose šalinimas yra panašaus lygio (bendro baltymų kiekio šalinimo efektyvumo vidurkių skirtumas tarp gamybinių ir pusiau gamybinių fermentacijų bandinių siekia tik 5 %).

Šviesos sugertis ties 260 nm iš dalies siejama su lipidų kiekiu, tačiau šio bangos ilgio spinduliuotę sugeria ir kiti junginiai, pvz., nukleorūgštys. Todėl tegalima teigti, kad po ultrafiltracijos sirupuose lieka nemažai šių junginių (jų šalinimo efektyvumas apie 20-25% tiek su gamybiniu, tiek su modifikuotuoju fermentų mišiniu). Šviesos sugertis ties 320 nm leidžia įvertinti fenolinių ir kitų aromatinių junginių kiekius. Jie turi įtakos sirupų spalvos atsiradimui sandėliuojant. Tačiau matavimų rezultatai rodo, kad ultrafiltracija neleidžia jų efektyviai pašalinti. Pastebėtas kiek geresnis jų šalinimo efektyvumas po modifikuotosios fermentacijos, tačiau didelis duomenų išsibarstymas visgi neleidžia daryti aiškios išvados.

**3.4 lentelė.** Spektrofotometrinių tyrimų, fosforo ir baltymų šalinimo ultrafiltracijoje rezultatai

		Šviesos sugerties sumažėjimas*, %			Fosforo šalinimo UF efektyvumas, %	Baltymų šalinimo UF efektyvumas, %
		260 nm	280 nm	320 nm		
<b>Gamybinė fermentacija</b>	A	18	16	14	1	68
	B	37	32	25	1	57
<b>Modifikuota fermentacija</b>	C	21	29	25	-10	68
	D	27	39	53	-9	45

\*lyginama šviesos sugertis UF permeate ir atitinkamame mėginyje prieš UF, nuskaidrinus jį 0,45 um membraniniu filtru.

Fosforo šalinimui naudojami filtruojamumo fermentai įtakos neturi, nes efektyvumas gamybiniuose mėginiuose siekė 1 %, o modifikuotos fermentacijos bandymuose fosforo po ultrafiltracijos netgi padaugėjo. Iš dalies tai galima paaiškinti matavimų paklaida, tačiau tai gali būti ir dėl to, kad permeatuose didžiausią dalį fosforo neša GPC, kuris atsipalaiduoja skylant LPC bei PC ir kuris yra tirpus ir membranos jo nesulaiko UF metu. Kadangi modifikuotoje fermentacijoje gerokai mažiau LPC ir PC likučių nei gamybinėje, vadinasi, buvo gauta daugiau GPC, ir dėl to permeatų fosforo kiekis sausosiose medžiagose galėjo padidėti.

### 3.3.1.2 Masių spektrometrija

Pusiau kiekybinis lipidų junginių įvertinimas UF permeatuose atliktas su masių spektrometru *Thermo LTQ XL*, nes permeatuose lipidų koncentracija sumažėjo tūkstančiais kartų lyginant su nevalytais krakmolo hidrolizatų mėginiais, ir HPLC *CAD* detektoriaus signalas yra per silpnas šių junginių aptikimui. FFA nustatymui naudota neigiama jonizacija, o LPC ir PC junginių identifikavimui – teigiama. Atskirų lipidų junginių, o ne jų grupių rezultatai pateikti 3. priede. 3.5 lentelėje pateikti apibendrinti lipidų grupių rezultatai santykiniais vienetais, kurie leidžia tarpusavyje lyginti vienos grupės lipidų kiekius, tačiau neleidžia įvertinti skirtingų grupių lipidų tarpusavyje. Todėl UF efektyvumo skirtingoms fermentacijoms palyginimui 3.6 lentelėje suskaičiuota, kuri dalis atitinkamos grupės lipidų vidutiniškai yra modifikuotos fermentacijos permeatuose lyginant su standartinės fermentacijos permeatais.

**3.5 lentelė.** Gamybinės (aa, bb) ir modifikuotos (cc, dd) fermentacijos permeatų lipidų pusiau kiekybinės MS/MS analizės rezultatai (n=4)

	LPC, santyk. plot vnt.	FFA, santyk. plot vnt.	PC, santyk. plot vnt.
<b>aa</b>	$1,2 * 10^7 \pm 5,6 * 10^6$	$4,1 * 10^4 \pm 2,2 * 10^4$	$2,1 * 10^5 \pm 8,6 * 10^4$
<b>bb</b>	$4,7 * 10^6 \pm 4,4 * 10^5$	$8,1 * 10^4 \pm 8,2 * 10^3$	$8,2 * 10^4 \pm 2,1 * 10^4$

<b>cc</b>	$2,5 * 10^6 \pm 2,8 * 10^5$	$3,5 * 10^3 \pm 4,9 * 10^2$	$7,8 * 10^3 \pm 3,0 * 10^3$
<b>dd</b>	$4,1 * 10^6 \pm 1,3 * 10^6$	$3,4 * 10^3 \pm 2,4 * 10^2$	$5,4 * 10^3 \pm 1,0 * 10^3$

Matome, kad modifikuotos fermentacijos permeatai po ultrafiltracijos proceso liko gerokai švaresni lyginant su gamybiniais permeatais: juose apie 20 kartų mažiau FFA ir PL ir apie 2 kartus mažiau LPC (žr. 3.5 lentelė).

**3.6 lentelė.** Lipidų kiekių palyginimas UF permeatuose po gamybinės ir modifikuotos fermentacijos (lipidų kiekis modifikuotos fermentacijos permeatuose % nuo standartinės fermentacijos permeatų)

Lipidų grupė	Lipidų %
LPC	40
FFA	6
PC	5

### 3.3.1.3 Produkto putojimo tyrimai

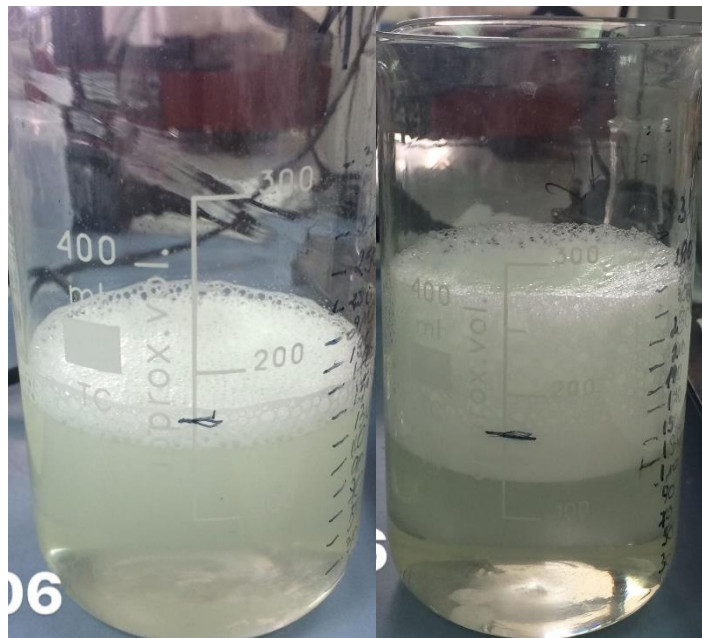
Kad būtų įvertinta filtruojamumo fermentų įtaka mėginio putojimui, ultrafiltracijoje gautiems permeatams buvo nustatytas putojamumas. Kiekvieno mėginio atlikta po 3 lygiagrečius matavimus.

**3.7 lentelė.** Putojamumo ir putos stabilumo rezultatai gamybiniuose ir modifikuotos fermentacijos permeatuose, n=3

	Putojamumas %			
	Tyrimo pradžia, 0 min	Po 30 min	Po 60 min	Po 90 min
<b>aa</b>	48	33	25	10
<b>bb</b>	44	20	12	0
<b>cc</b>	33	7	-	-
<b>dd</b>	13	-	-	-
Putos stabilumas, %				
	Po 30 min	Po 60 min	Po 90 min	
<b>aa</b>	-40	-84	-	
<b>bb</b>	-10	-66	-	
<b>cc</b>	-86	-	-	
<b>dd</b>	-	-	-	

Tyrimo pradžioje (0 min), tuoj po suplakimo dispergatoriumi, gamybinių permeatų putojamumo vidurkis yra 2 kartus didesnis už modifikuotos fermentacijos permeatų putojamumą (žr. 3.7 lentelė). Gamybinio ir modifikuotos fermentacijos permeato putojimą iškart po maišymo vizualiai

galima įvertinti 3.6 paveiksle. Putos stabilumu ryškiai išsiskyrė gamybinės fermentacijos permeatai, puta buvo vis dar stabili praėjus valandai po maišymo, kai tuo tarpu modifikuotos fermentacijos permeate (cc) putas nebeliko po 37 minučių, o modifikuotos fermentacijos permeate (dd) jau po 10 minučių. Šiuos putojimo skirtumus galima paaiškinti permeatų sudėties tyrimų rezultatais, kuriuose nustatyta, jog produktuose po modifikuotos fermentacijos lieka žymiai mažiau PL. Kadangi tirpių baltymų abiejų fermentacijų permeatuose liko panašiai, matyt, sirupų putojimui didesnės įtakos turi ne baltymai, o fosfolipidai arba visas skirtingų klasių PAM kompleksas.



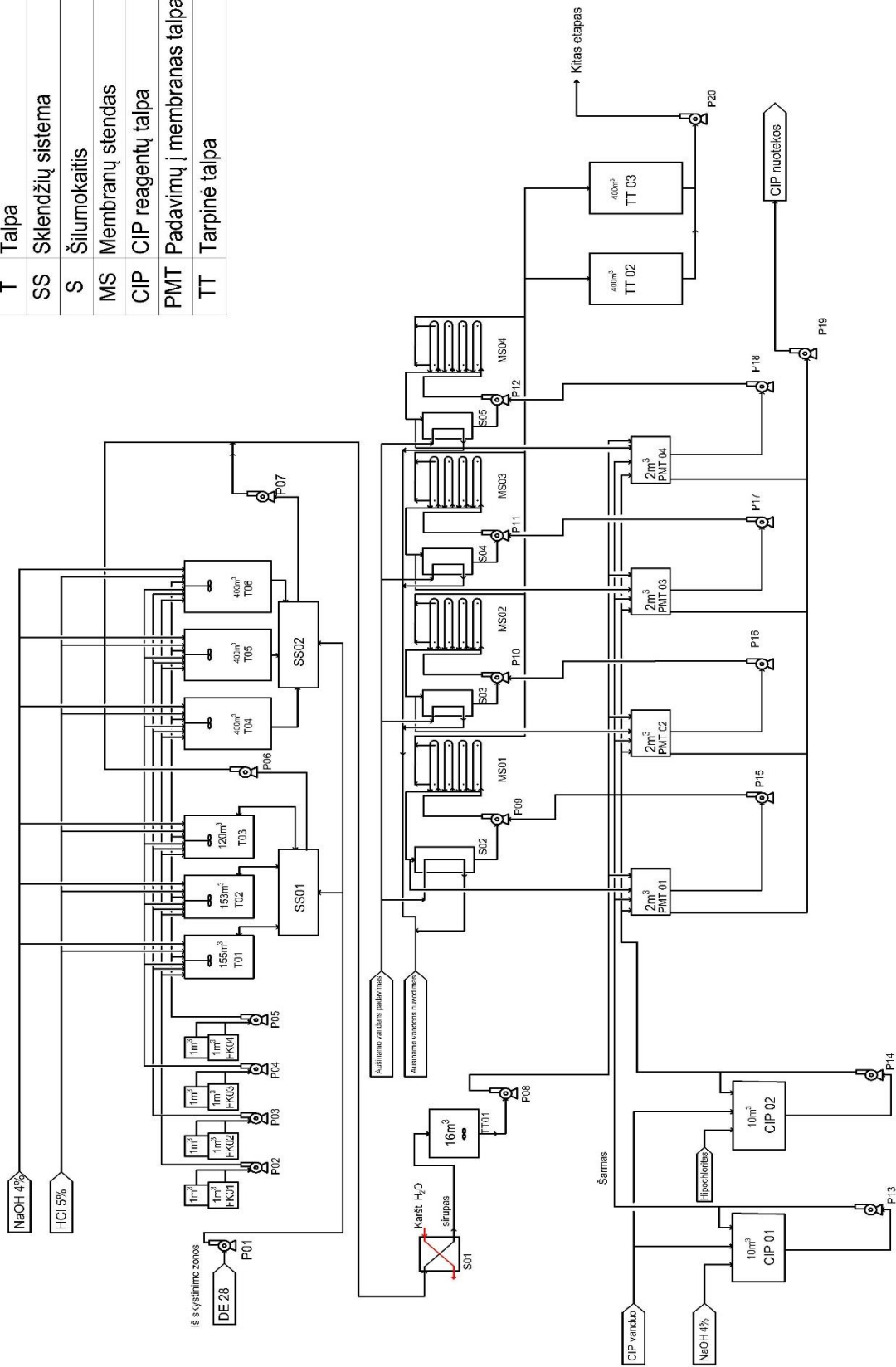
**3.6 pav.** Kairėje, modifikuotos fermentacijos permeato cc putojimas, dešinėje gamybinės fermentacijos permeato aa putojimas iškart po suplakimo

#### 4. REKOMENDACIJOS

Mažiausias diacilfosfolipidų kiekis gautas vykdant krakmolo hidrolizato fermentaciją su lizofosfolipaze ir lipaze PLA1, palaikant 60 °C temperatūrą ir 5,5 pH. Principinė aparatūrinė schema pavaizduota 4.1 paveiksle.

Lipidų fermentinė hidrolizė prasideda krakmolo hidrolizatui (gliukozės sirupui) atitekėjus iš skystinimo zonos į cukrinimo talpas (nuo T01 iki T06), pasibaigus cukrinimo etapui. Reagentų kiekiai ir parametrų vertės apskaičiuotos esant 30 m<sup>3</sup>/h sirupo gamybos našumui. Fermentai lizofosfolipazė (10,26 L/h) ir lipazė PLA1 (2,4 L/h) dozuojami iš fermentų konteinerių talpų (atitinkamai FK01 ir FK02) pumpuojant siurbliams P02 ir P03. Fermentų talpos FK03 ir FK04 su siurbliais P04 ir P05 yra skirtos cukrinimo ir kitiems filtruojamumo fermentams. Į visas cukrinimo talpas automatiškai dozuojami NaOH ir HCl reagentai, kurie palaiko reikiamą fermentacijos 5,5 pH. Po 24 valandų fermentacijos krakmolo hidrolizatas iš talpų (T01 – T06) atitinkamai pumpuojant siurbliams P06 arba P07 keliauja per S01 šilumokaitį, iš kur patenka į 16 m<sup>3</sup> tarpinę talpą TT01. Iš TT01 talpos pumpuojant P08 siurbliui fermentuotas krakmolo hidrolizatas keliauja į padavimo į membranas talpas (PMT01 – PMT04). Iš šių talpų hidrolizatas siurbliais (P15 –P18) teka į membranų stendus (MS01 – MS04). Visų keturių membranų stendų membranų paviršiaus plotas sudaro 853 m<sup>2</sup>, o stendo vidutinis sirupo srautas – 10,7 m<sup>3</sup>/h. Maksimalus siurblių recirkuliacinis našumas – 2000 m<sup>3</sup>/h. Šilumokaičiai (S02 – S05) palaiko 60 °C temperatūrą, reikalingą ultrafiltracijos procesui. Atitinkamai iš kiekvieno membranų stendo permeatas teka į tarpines talpas TT02 ir TT03, iš kurių siurbliu P20 keliauja į kitą rafinavimo etapą. Trijuose membranų stenduose nuolatos vyksta ultrafiltracijos procesas, o vienas stendas būna plovimo režime. Ciklas susideda iš darbinio režimo (16,5 h) ir CIP (5,3 h), todėl bendra jo trukmė – 21,8 h. Vieno stendo išskalavimui nuo sirupo (vadinamajai diafiltracijai) prieš CIP reikia 7 m<sup>3</sup> vandens. Jis paduodamas į plaunamo stendo PMT ir MS, kuriuose vyksta vandens cirkuliacija. Diafiltracijos metu surinktas permeatas (saldieji vandenys) grąžinami į cukrinimo etapą, taip išvengiant sirupo nuostolių. Po diafiltracijos iš PMT ir MS nudrenuojamas likęs vadinamasis diaretentatas, kuris P19 siurbliu nuvedamas į atliekas. CIP01 ir CIP02 CIP reagentų talpose paruošiami CIP reagentai. Tam į šias talpas prileidžiama po 3,3 m<sup>3</sup> CIP vandens ir atitinkamai 3 L 4 % NaOH ir 4,8 L hipochlorito tirpalo (kas perskaičiavus visiems 4 stendams sudaro vidutiniškai 0,5 L/h ir 0,9 L/h atitinkamai). Iš talpų siurbliais P13 ir P14 reagentai transportuojami į plaunamo stendo PMT ir MS. Plovimui pasibaigus CIP nuotekos pašalinamos P19 siurbliu ir PMT bei MS išskalaujami 5 m<sup>3</sup> vandens.

FK	Fermentų konteineris
P	Siurblys
T	Talpa
SS	Sklendžių sistema
S	Šilumokaitis
MS	Membranų standas
CIP	CIP reagentų talpa
PMT	Padavimų į membranas talpa
TT	Tarpinė talpa



4.1 pav. Gliukozės sirupo gamybos iš kviečių krakmolo cukrinimo ir ultrafiltracijos etapų aparatūrinė schema



## IŠVADOS

1. Laboratoriniuose bandymuose nustatyta, jog naudojant lizofosfolipazę, kuri taikoma pramoninėje sirupo gamyboje, susidaro diacilfosfolipidai, kurie gali turėti įtakos galutinio produkto putojimui.
2. Išbandžius 4 lipazių mišinius, mažiausio tirpumo lipidų skaidymo produktai gauti optimizavus lizofosfolipazės F1 ir fosfolipazės A1 *Lecitase Ultra* fermentų mišinį. Optimalios fermentų dozės: 342 µL/L sirupo lizofosfolipazės ir 80 µL/L sirupo *Lecitase Ultra*; temperatūra – 60 °C ; pH – 5,5.
3. Lipazių mišinio veiksmingumas patikrintas atliekant didesnės apimties fermentacijos ir ultrafiltracijos bandymą:
  - 3.1. Naudojant tiek pramoninį, tiek ir parinktą fermentų mišinį, ultrafiltracijos metu fosforas nėra šalinamas iš sirupo. Baltymų šalinimo efektyvumas po modifikuotosios fermentacijos atitiko gamyboje naudojamo filtruojamumo fermentų mišinio efektyvumą, todėl galima teigti, kad parinktos lipazės neturi reikšmingos įtakos baltymų šalinimui.
  - 3.2. Parinktas fermentų mišinys neturi įtakos krakmolo hidrolizei: sacharifikacijos metu susidariusių sacharidų sudėtis išlieka tokia pati po fermentacijos ir po ultrafiltracijos.
  - 3.3. Ultrafiltracijos permeatai su parinktu filtruojamumo fermentų mišiniu buvo švaresni lyginant su gamybiniais permeatais: juose 20 kartų mažiau laisvųjų riebalų rūgščių ir diacilfosfolipidų, 2 kartus mažiau lizofosfolipidų. Permeatai su parinktu filtruojamumo fermentų mišiniu putojo apie 2 kartus silpniau, o putą išsilaikė tik iki 30 minučių, tuo tarpu su gamyboje naudojamu fermentų mišiniu ji išsilaikė ilgiau nei 60 min.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. ŠRAMKOVÁA, Z., E. GREGOVÁB and E. ŠTURDÍKA. Chemical Composition and Nutritional Quality of Wheat Grain, *Acta Chimica Slovaca*. 2(1):115–138, 2009. ISSN: 1337-978X.
2. MIN, David B. *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. New York, USA, 2002. ISBN: 0-8247-0749-4.
3. FAHY, E., D. COTTER, M. SUD and S. SUBRAMANIAM S. Lipid Classification, Structures and Tools. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1811:637-647, 2011. ISSN: 1337-978X.
4. LI, W., L. GAO, G. WU, J. ZHENG, S. OUYANG, Q. LUO and G. ZHANG. Physicochemical and Structural Properties of A- and B-Starch Isolated From Normal and Waxy Wheat: Effects of lipids removal. *Food Hydrocolloids*. 60:364–374, 2016. ISSN: 0268-005X.
5. ROCHA, J. M., P. L. KALO and F. X. MALCATA. Fatty Acid Composition of Non-Starch and Starch Neutral Lipid Extracts of Portuguese Sourdough Bread. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 89:2025–2045, 2012. ISSN: 1558-9331.
6. BLASZCZAK, W., J. FORNAL and R. AMAROWICZ. Lipids of Wheat, Corn and Potato Starch. *Journal of Food Lipids*. 10:301-312, 2003. ISSN:1745-4522.
7. SAS, B., E. PEYS and M. HELSEN. Efficient Method For (Lyso)phospholipid Class Separation by High-Performance Liquid Chromatography Using an Evaporative Light-Scattering Detector. *Journal of Chromatography A*. 864:179–182, 1999. ISSN: 0021-9673.
8. MORISSON, W. R. Wheat Lipid composition. *Cereal Chemistry*. 55:5–548-558,1978. ISSN: 1943-3638.
9. SALT, J. L., I. G. THUILLIER , G. CHOPE, S. PENSON, P. TOSI, R. P. HASLAM , P. K. SKEGGS, P. R. SHEWRY and P. J.WILDE. Intrinsic Wheat Lipid Composition Effects The Interfacial and Foaming Properties of Dough Liquor. *Food Hydrocolloids*. 75:211–222, 2018. ISSN: 0268-005X.
10. POLAINA, Julia. and Andrew P. MACCABE. *Industrial Enzymes Structure. Function and Applications*, Valencia, Spain, 2017. ISSN: 978-1-4020-5377-1.
11. HANAHAN, Dobald. J. *A Guide to Phospholipids Chemistry*. New York, USA, 1997. ISBN: 0-19-507980-9.

12. MURAYAMA, K., K. KANO and Y. MATSUMOTO. Crystal Structure of Phospholipase A1 from *Streptomyces albidoflavus* NA297. *Journal of Structural Biology*. 182(2):192-196, 2013. ISSN: 1047-8477.
13. PELLELY, John. W. *Metabolism of Steroids and Other Lipids*, Elsevier's Integrated Review Biochemistry (Second Edition). Texas, USA, 2013. ISBN: 9781455755585.
14. LUX, G., MANSFELD, J., ULBRICH-HOFMANN, R.. Phospholipase A2-catalyzed Acylation of Lysophospholipids Analyzed by Experimental Design. *Enzyme and Microbiological Technology*, 64–65:60–66, 2014. ISSN: 0141-0229.
15. WOLF, C. And P. J. QUINN. *Lipidomics: Practical Aspects and Applications*. Progress in Lipid Research. 47:15–36, 2008. ISSN: 0163-7827.
16. AKOH, Casmir. and David. B. MIN. *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 3<sup>rd</sup> edition. Food Science and Technology, New York, USA, 2008. ISBN: 9781420046632.
17. PRIETO, J. A., A. EBRI and C. COLLAR. Optimized Separation of Nonpolar and Polar Lipid Classes from Wheat Flour by Solid.Phase Extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 69(4):387–391, 1992. ISSN: 1558-9331.
18. FINNIE, S. M., R. JEANNOTTE, C. F. MORRIS, M. J. GIROUX and J. M. FAUBION. Variation in Polar Lipids Located on the Surface of Wheat Starch. *Journal of Cereal Science*. 51:73–80, 2010. ISSN: 0733-5210.
19. PACETTI, D, E. BOSELLI, P. LUCCI and N. G. FREGA. Simultaneous Analysis of Glycolipids and Phospholipids Molecular Species in Avocado (*Persea Americana* Mill) Fruit. *Journal of Chromatography A*. 1150:241–251, 2007. ISSN: 0021-9673.
20. PELILLO, M., F. FERIOL, G. IAFELICE, E. MARCONI and M. F. CABONI. Characterisation of the Phospholipid Fraction of Hulled and Naked Tetraploid and Hexaploid Wheats. *Journal of Cereal Science*. 51:120–126, 2010. ISSN: 0733-5210.
21. XIAO, L. Evaluation of Extraction Methods for Recovery of Fatty Acids from Marine Products. Master thesis of EMQAL project 2010.
22. BROWN, Alex. H. *Methods in Enzymology: Lipidomics and Bioactive Lipids Mass-Spectrometry Based Lipid Analysis* (432). Oxford, 2007. ISBN: 978-0-12-373895-0.
23. GURR, Michael. I., John. L. HARWOOD and Keih. N. FRAYN. *Lipid Biochemistry, An Introduction*, 5th edition. New Jersey, USA, 2002. ISBN 0-632-05409-3.
24. LIU, Z., S. ROCHFORT and B. G. COCKS. Optimization of a Single Phase Method for Lipid Extraction from Milk, *Journal of Chromatography A*. 1458:145-149, 2016. ISSN: 0021-9673.

25. RAMLUCKAN, K., K. G. MOODLEY and F. BUX. An Evaluation of the Efficacy of Using Selected Solvents for the Extraction of Lipids from Algal Biomass by the Soxhlet Extraction Method, *Fuel*. 116:103–108, 2014. ISSN: 0016-2361.
26. BERNDMEYER, C., V. THIEL V., BLUMENBERG M. Test of Microwave, Ultrasound and Bligh & Dyer Extraction for Quantitative Extraction of Bacteriohopanepolyols (BHPs) from Marine Sediments. *Organic Geochemistry*. 68:90–94, 2014. ISSN: 0146-6380.
27. ARCHANAA, S., S. MOISE and G. K. SURAIISKUMAR. Chlorophyll Interference in Microalgal Lipid Quantification Through the Bligh and Dyer Method. *Biomass and Bioenergy*. 46:805–808, 2012. ISSN: 0961-9534.
28. SHANKARA, M., P. K. CHHOTARAYB, A. AGRAWAL, R. L. GARDASD, K. TAMILARASAN and M. RAJESH. Protic Ionic Liquid-Assisted Cell Disruption and Lipid Extraction from Fresh Water *Chlorella* and *Chlorococum* Microalgae. *Algal Research*, 25:228–236, 2017. ISSN: 2211-9264.
29. LEI, L., J. LI, J. HU, R. LIU, Y. FAN, L. TANG and Z. DENG. Separation of Phospholipids from Hen Egg Yolk by Short Packed Silica Gel Column Chromatography. *Journal of Food Science*, 00(00):C1–C6, 2012. ISSN: 1750-3841.
30. MENGESHA, A. E. and P. M. BUMMER. Simple Chromatographic Method for Simultaneous Analyses of Phosphatidylcholine, Lysophosphatidylcholine, and Free Fatty Acids. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. 11(3):1084–1091, 2010; ISSN: 1550-7416.
31. 9. PAPANTONIOU, E., E. W. HAMMOND, F. SCRIVEN, M. H. GORDON and J. D. SCHOFFIELD. Isolation of Polar Lipid Classes from Wheat Flour Extracts by Preparative High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chemistry Journal*. 78(6):663–665, 2001; ISSN: 0733-5210.
32. BELAYNEHA, H. D., R. L. WEHLINGA, E. CAHOONB and O. N. CIFTICIA. Lipid Composition and Emulsifying Properties of *Camelina Sativa* Seed Lecithin. *Food Chemistry*. 242:139–146, 2018; ISSN: 0308-8146.
33. ŠPITSMEISTER, M., K. ADAMBERG and R. VILU R. UPLC/MS Based Method for Quantitative Determination of Fatty Acid Composition in Gram-negative and Gram-positive Bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 82:288–295, 2010; ISSN: 0167-7012.

34. CARRIER, A. And J. PARENT. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Determination of Free Fatty Acids in Phospholipid-Based Formulations. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 24(1): 97–107, 2007. ISSN: 1082-6076.
35. ICHIHARA, K. And Y. FUKUBAYASH. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-liquid Chromatography. *The Journal Of Lipid Research*. 51(3):635–640, 2010. ISSN 1539-7262.
36. MCLAREND, G., P. L. MILLER, M. L. LASSMAN, M. J. CASTRO-PEREZ, B. K. HUBBARD and T.P. RODDY. An Ultraperformance Liquid Chromatography Method for the Normal-phase Separation of Lipids. *Analytical Biochemistry*. 414:266–272, 2011; ISSN: 0003-2697
37. LIU, Ke-Shun. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Lipids in Biological Materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 71(11):1179-1187, 1994. ISSN: 1558-9331.
38. ESCHE, R., L. MÜLLER and K. H. ENGEL. Online LC-GC-Based Analysis of Minor Lipids in Various Tree Nuts and Peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61:11636–11644, 2013; ISSN: 1520-5118.
39. HULL Petter. *Glucose Syrups Technology and Applications*. Iowa, USA, 2010. ISBN: 978-1-405-17556-2.
40. Vidiniai dokumentai, AB „Amilina“, 2018.
41. PLANTE, M., B. BAILEY and I. ACWORTH. Analysis of Lipids by RP-HPLC Using Corona Analysis of Lipids by RP-HPLC Using the Coron Ultra. Application Note 71759. ESA-A Dionex Company, Chelmsford, MA, USA, 2009.
42. RADOSTA, S., B. KIESSLER, W. VORWERG and T. BRENNER. Molecular Composition of Surface Sizing Starch Prepared using Oxidation. Enzymatic Hydrolysis and Ultrasonic Treatment Methods. *Starch*. 68:541-548, 2016. ISSN 0038-9056.
43. Specification for Laboratory Reverse Osmosis Unit (Micro 240), PCI Membranes, 2018.
44. Product & Technical Showcase Micro 240 Series Membranes & Modules. Xylem Flow Control. 2018.
45. CLEMENT, A., L. LAGACE and B. PANNETON. Assessment of Maple Syrup Physico-Chemistry and Typicity by Means of Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Food engineering*. 97:17–23, 2010. ISSN: 0260-8774.

46. DARRA, N., H. RAJHA, F. SALEH F, R. AL-OWEINI, R. G. MAROUN and N. LOUKA. Food Fraud Detection in Commercial Pomegranate Molasses Syrups by UV–VIS Spectroscopy, ATR–FTIR Spectroscopy and HPLC methods. *Food Control*. 7:132-137, 2017. ISSN: 0956-7135.
47. KIMA, J and C. L. HOPPEL. Comprehensive Approach to the Quantitative Analysis of Mitochondrial Phospholipids by HPLC–MS. *Journal of Chromatography B*. 912:105-144, 2013. ISSN: 1570-0232.
48. KIM, J., J. W. LAMPE, T. YIN, K. SHINOZAKI and L. C. ,BECKER. Phospholipid Alterations in the Brain and Heart in a Rat model of Asphyxia-Induced Cardiac Arrest and Aardio-pulmonary Bypass Resuscitation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2015. ISSN: 1573-4919.
49. HUMMEL, J., S. SEGU, S. IRGANG, J. JUEPPNER and P. GIAVALISCO. Ultra Performance Liquid Chromatography and Highresolution Mass Spectrometry for the Analysis of Plant Lipids. *Frontiers in Plant Science*. 2(54):1-17, 2011. ISSN: 1664-462X.
50. Lecitase Ultra, Product Sheet. *Oils&Fats*. 2002-05894-03:1-3, 2003.
51. LIPOMOD 34 MDP (L034MDP). General Product Sheet. 7, 2015.

## **PUBLIKACIJOS MAGISTRO TEZIŲ TEMA**

1. Agnė Katileviciūtė, Edita Mažonienė. Gliukozės sirupų gryninimas šalinant fosfolipidus. Studentų mokslinė konferencija „Chemija ir cheminė technologija 2017“, 2017-04-27, Radvilėnų pl. 19, Kaunas.
2. Agnė Katileviciūtė, Edita Mažonienė. Investigation and Optimization of Enzymatic Conversion of Phospholipids in the Production of Glucose Syrup from Wheat Starch. 12th International Scientific Conference Vital Nature Sign, 2018-05-16, S. Daukanto g. 28, Kaunas.

## **PADĖKOS**

Nuoširdžiai dėkoju AB „Amilina“ vadovybei už suteiktą galimybę atlikti tyrimus įmonės laboratorijose, mokslinės tyrimų laboratorijos tyrėjams už patarimus ir pastabas, gliukozės sirupo laboratorijos ir cecho darbuotojams už mėginių suteikimą ir konsultacijas.

UAB „Vortogama“ už ultrafiltracijos stendą, UAB „Baltijos enzimai“ už fermentus tyrimams atlikti.



## PRIEDAI

**1. priedas.** Ultrafiltracijos metu naudotos FP 200 vamzdelinės polimerinės membranos

2. priedas. Gamybinės (A, B) ir modifikuotos fermentacijos (C, D) UF perneatų MS / MS rezultatai

	Me- džiaga	Joniza- cijos ti-	Mol. Masė	Jungi- nio m/z	Sulai- kymo trukmė , min	A mėginio UF perneatas, santyk. pl. vnt.						
						1.1	1.2	2.1	2.2	Vid.	SN	SSP, %
	FFA PA	-	256.2	255.3	0.79	4.77* 10 <sup>4</sup>	4.63* 10 <sup>4</sup>	1.78* 10 <sup>4</sup>	2.19* 10 <sup>4</sup>	3.3*1 0 <sup>4</sup>		
	FFA LA	-	280.2	279.2	0.79	1.04* 10 <sup>4</sup>	1.54* 10 <sup>4</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	3.06* 10 <sup>3</sup>	7.47* 10 <sup>3</sup>		
Grupės suma	FFA	-				5.81* 10 <sup>4</sup>	6.17* 10 <sup>4</sup>	1.88* 10 <sup>4</sup>	2.49* 10 <sup>4</sup>	4.09* 10 <sup>4</sup>	2.21* 10 <sup>4</sup>	27
	LPC LA	+	519.3	520.2	1.23	2.53* 10 <sup>6</sup>	2.59* 10 <sup>6</sup>	1.00* 10 <sup>6</sup>	1.07* 10 <sup>6</sup>	1.80* 10 <sup>6</sup>		
	LPC PA	+	495.3	496.4	1.56	1.39* 10 <sup>7</sup>	1.39* 10 <sup>7</sup>	5.40* 10 <sup>6</sup>	6.00* 10 <sup>6</sup>	9.80* 10 <sup>6</sup>		
Grupės suma	LPC	+				1.64* 10 <sup>7</sup>	1.65* 10 <sup>7</sup>	6.40* 10 <sup>6</sup>	7.07* 10 <sup>6</sup>	1.16* 10 <sup>6</sup>	5.62* 10 <sup>6</sup>	24
	PC LL	+	781.6	782.6	10.95	2.78* 10 <sup>4</sup>	2.92* 10 <sup>4</sup>	1.39* 10 <sup>4</sup>	1.03* 10 <sup>4</sup>	2.03* 10 <sup>4</sup>		
	PC PL	+	757.6	758.5	11.45	1.15* 10 <sup>5</sup>	1.23* 10 <sup>5</sup>	6.17* 10 <sup>4</sup>	6.07* 10 <sup>4</sup>	9.03* 10 <sup>4</sup>		
	PC PP	+	733.6	734.6	11.93	1.92* 10 <sup>5</sup>	1.94* 10 <sup>4</sup>	8.33* 10 <sup>4</sup>	8.93* 10 <sup>4</sup>	9.61* 10 <sup>4</sup>		
Grupės suma	PC	+	256.2	255.3	0.79	3.35* 10 <sup>5</sup>	1.72* 10 <sup>5</sup>	1.59* 10 <sup>5</sup>	1.60* 10 <sup>5</sup>	2.07* 10 <sup>5</sup>	8.60* 10 <sup>5</sup>	21
	Me- džiaga	Joniza- cijos ti-	Mol. Masė	Jungi- nio m/z	Sulai- kymo laikas, min	B mėginio UF perneatas, santyk. pl. vnt.						
						1.1	1.2	2.1	2.2	Vid.	SN	SSP, %
	FFA PA	-	256.2	255.3	0.79	7.33* 10 <sup>4</sup>	5.71* 10 <sup>4</sup>	6.76* 10 <sup>4</sup>	7.18* 10 <sup>4</sup>	6.74* 10 <sup>4</sup>		
	FFA LA	-	280.2	279.2	0.79	9.82* 10 <sup>3</sup>	1.29* 10 <sup>4</sup>	1.41* 10 <sup>4</sup>	1.78* 10 <sup>4</sup>	1.37* 10 <sup>4</sup>		
Grupės suma	FFA	-				8.31* 10 <sup>4</sup>	7.00* 10 <sup>4</sup>	8.17* 10 <sup>4</sup>	8.96* 10 <sup>4</sup>	8.11* 10 <sup>4</sup>	8.17* 10 <sup>3</sup>	5
	LPC LA	+	519.3	520.2	1.23	9.17* 10 <sup>5</sup>	9.34* 10 <sup>5</sup>	9.85* 10 <sup>5</sup>	1.08* 10 <sup>6</sup>	9.80* 10 <sup>5</sup>		
	LPC PA	+	495.3	496.4	1.56	3.44* 10 <sup>6</sup>	3.31* 10 <sup>6</sup>	3.82* 10 <sup>6</sup>	4.13* 10 <sup>6</sup>	3.67* 10 <sup>6</sup>		
Grupės suma	LPC	+				4.36* 10 <sup>6</sup>	4.24* 10 <sup>6</sup>	4.81* 10 <sup>6</sup>	5.21* 10 <sup>6</sup>	4.65* 10 <sup>6</sup>	4.44* 10 <sup>5</sup>	5
	PC LL	+	781.6	782.6	10.95	1.86* 10 <sup>4</sup>	1.88* 10 <sup>4</sup>	6.81* 10 <sup>3</sup>	7.90* 10 <sup>3</sup>	1.30* 10 <sup>4</sup>		
	PC PL	+	757.6	758.5	11.45	4.88* 10 <sup>4</sup>	5.43* 10 <sup>4</sup>	2.25* 10 <sup>4</sup>	1.84* 10 <sup>4</sup>	3.60* 10 <sup>4</sup>		
	PC PP	+	733.6	734.6	11.93	3.26* 10 <sup>4</sup>	3.64* 10 <sup>4</sup>	3.46* 10 <sup>4</sup>	2.68* 10 <sup>4</sup>	3.26* 10 <sup>4</sup>		

Grupės suma	PC	+				1.00* 10 <sup>5</sup>	1.09* 10 <sup>5</sup>	6.39* 10 <sup>4</sup>	5.31* 10 <sup>4</sup>	8.16* 10 <sup>4</sup>	2.73* 10 <sup>4</sup>	17
	<b>Me- džiaga</b>	<b>Joniza- cijos ti-</b>	<b>Mol. Masė</b>	<b>Jungi- nio m/z</b>	<b>Sulai- kymo laikas, min</b>	<b>C mėginio UF permeatas, santyk. pl. vnt.</b>						
						1.1	1.2	2.1	2.2	Vid.	SN	SSP, %
	FFA PA	-	256.2	255.3	0.79	2.37* 10 <sup>3</sup>	3.07* 10 <sup>3</sup>	2.50* 10 <sup>3</sup>	1.88* 10 <sup>3</sup>	2.46* 10 <sup>3</sup>		
	FFA LA	-	280.2	279.2	0.79	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>		
Grupės suma	FFA	-				3.37* 10 <sup>3</sup>	4.07* 10 <sup>3</sup>	3.50* 10 <sup>3</sup>	2.88* 10 <sup>3</sup>	3.46* 10 <sup>3</sup>	4.86* 10 <sup>2</sup>	7
	LPC LA	+	519.3	520.2	1.23	5.79* 10 <sup>5</sup>	6.87* 10 <sup>5</sup>	5.71* 10 <sup>5</sup>	6.87* 10 <sup>5</sup>	6.31* 10 <sup>5</sup>		
	LPC PA	+	495.3	496.4	1.56	1.73* 10 <sup>6</sup>	2.00* 10 <sup>6</sup>	1.56* 10 <sup>6</sup>	2.00* 10 <sup>6</sup>	1.82* 10 <sup>6</sup>		
Grupės suma	LPC	+				2.31* 10 <sup>6</sup>	2.69* 10 <sup>6</sup>	2.13* 10 <sup>6</sup>	2.69* 10 <sup>6</sup>	2.45* 10 <sup>6</sup>	2.80* 10 <sup>5</sup>	6
	PC LL	+	781.6	782.6	10.95	7.33* 10 <sup>3</sup>	7.42* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	7.42* 10 <sup>3</sup>	5.79* 10 <sup>3</sup>		
	PC PL	+	757.6	758.5	11.45	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>		
	PC PP	+	733.6	734.6	11.93	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>		
Grupės suma	PC	+	256.2	255.3	0.79	9.33* 10 <sup>3</sup>	9.42* 10 <sup>3</sup>	3.00* 10 <sup>3</sup>	9.42* 10 <sup>3</sup>	7.79* 10 <sup>3</sup>	3.20* 10 <sup>3</sup>	21
	<b>Me- džiaga</b>	<b>Joniza- cijos ti-</b>	<b>Mol. Masė</b>	<b>Jungi- nio m/z</b>	<b>Sulai- kymo laikas, min</b>	<b>D mėginio UF permeatas, santyk. pl. vnt.</b>						
						1.1	1.2	2.1	2.2	Vid.	SN	SSP, %
	FFA PA	-	256.2	255.3	0.79	2.37* 10 <sup>3</sup>	2.39* 10 <sup>3</sup>	2.78* 10 <sup>3</sup>	2.21* 10 <sup>3</sup>	2.44* 10 <sup>3</sup>		
	FFA LA	-	280.2	279.2	0.79	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>		
Grupės suma	FFA	-				3.37* 10 <sup>3</sup>	3.39* 10 <sup>3</sup>	3.78* 10 <sup>3</sup>	3.21* 10 <sup>3</sup>	3.44* 10 <sup>3</sup>	2.44* 10 <sup>3</sup>	4
	LPC LA	-	519.3	520.2	1.23	6.98* 10 <sup>5</sup>	6.43E *10 <sup>5</sup>	1.13* 10 <sup>6</sup>	1.09* 10 <sup>6</sup>	8.89* 10 <sup>5</sup>		
	LPC PA	-	495.3	496.4	1.56	2.31* 10 <sup>6</sup>	2.34* 10 <sup>6</sup>	3.82* 10 <sup>6</sup>	4.36* 10 <sup>6</sup>	3.21* 10 <sup>6</sup>		
Grupės suma	LPC	+				3.01* 10 <sup>6</sup>	2.98* 10 <sup>6</sup>	4.95* 10 <sup>6</sup>	5.44* 10 <sup>6</sup>	4.10* 10 <sup>6</sup>	1.29* 10 <sup>6</sup>	16
	PC LL	+	781.6	782.6	10.95	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>		
	PC PL	+	757.6	758.5	11.45	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>	1.00* 10 <sup>3</sup>		
	PC PP	+	733.6	734.6	11.93	4.62* 10 <sup>3</sup>	3.76* 10 <sup>3</sup>	3.13* 10 <sup>3</sup>	2.21* 10 <sup>3</sup>	3.43* 10 <sup>3</sup>		

Grupių suma	PC	+	256.2	255.3	0.79	6.62* 10 <sup>3</sup>	5.76* 10 <sup>3</sup>	5.13* 10 <sup>3</sup>	4.21* 10 <sup>3</sup>	5.43* 10 <sup>3</sup>	1.02* 10 <sup>3</sup>	9
----------------	----	---	-------	-------	------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	---

### 3. priedas Spektrofotometrinės ir elementinės analizės rezultatai po gamybinės ir modifikuotos fermentacijos ir ultrafiltracijos

		A		B		C		D	
		A	aa	B	bb	C	CC	D	dd
<b>SM, % (n=2)</b>		27,1± 1,2	24,26 ±0,45	25,77 ±0,90	19,25 ±0,54	27,89 ±0,77	23,08 ±0,71	29,54 ±0,14	24,37 ±0,01
<b>Drumstumas, NTU (n=3)</b>		1295±0	2,5±0,02	1267±0	0±0,0	1729±15, 59	6,3±0,22	1347±2,8 9	0,63±0,02
Sviesto suger- tis, nm	<b>260</b>	4,58	3,73	3,61	2,26	4,44	3,50	4,57	3,60
	<b>280</b>	2,42	2,04	2,00	1,36	2,71	1,91	2,79	2,01
	<b>320</b>	0,66	0,56	0,51	0,38	0,61	0,46	1,16	0,54
<b>Azotas, ppm, (n=2)</b>		370±28	180±14,1	290±0	140±14,4	335±7,1	165±7,1	350±0,0	220±14,4
<b>Azotas, %</b>		0,037	0,018	0,029	0,014	0,034	0,016	0,035	0,022
<b>Azotas % SM</b>		0,14	0,07	0,11	0,07	0,12	0,07	0,12	0,09
<b>Fosforas, ppm (n=2)</b>		273± 1,5	241±4,8	248±3,4	184±7,5	2241±1	222±0,3	299±1,5	270±4,7
<b>Fosforas, %</b>		0,0272	0,0240	0,0248	0,0184	0,0241	0,0220	0,0299	0,0270
<b>Fosforas % SM</b>		0,100	0,099	0,096	0,096	0,087	0,095	0,101	0,111