



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

**Saimonas Raudonius**

**ARONIŲ IŠSPAUDŲ KIETAFAZĖS FERMENTACIJOS  
NAUDOJANT *BACILLUS MEGATERIUM* SĄLYGŲ  
OPTIMIZAVIMAS IR GAUTŲ PRODUKTŲ SAVYBIŲ  
ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovas**

Prof. Petras Rimantas Venskutonis

**KAUNAS, 2018**

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS  
MAISTO MOKSLO IR TECHNOLOGIJOS KATEDRA**

**ARONIŲ IŠSPAUDŲ KIETAFAZĖS FERMENTACIJOS  
NAUDOJANT *BACILLUS MEGATERIUM* SĄLYGŲ  
OPTIMIZAVIMAS IR GAUTŲ PRODUKTŲ SAVYBIŲ  
ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas  
Pramoninės biotechnologijos studijų programa (kodas 621J70004)

**Vadovas**

Prof. Petras Rimantas Venskutonis

**Recenzentas**

Doc. dr. Aušra Šipailienė

**Projektą atliko**

Saimonas Raudonius

**KAUNAS, 2018**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**

(Fakultetas)

(Studento vardas, pavardė)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

**ARONIŲ IŠSPAUDŲ FERMENTAVIMO *BACILLUS MEGATERIUM* SĄLYGŲ  
OPTIMIZAVIMAS IR GAUTŲ PRODUKTŲ SAVYBIŲ ĮVERTINIMAS**

**AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

2018 m. Kaunas, d.

Patvirtinu, kad mano, **Saimono Raudoniaus**, baigiamasis projektas tema „ARONIŲ IŠSPAUDŲ KIETAFAZĖS FERMENTACIJOS NAUDOJANT *BACILLUS MEGATERIUM* SĄLYGŲ OPTIMIZAVIMAS IR GAUTŲ PRODUKTŲ SAVYBIŲ ĮVERTINIMAS“ 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 .....	6
SUMMARY .....	8
LENTELIŲ SĄRAŠAS .....	11
PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS .....	12
SANTRUMPOS.....	13
ĮVADAS .....	14
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	16
1.1. Juodavaisės aronijos ( <i>Aronia melanocarpa</i> ) apibūdinimas .....	16
1.1.1. Biocheminis apibūdinimas bei antioksidacinio aktyvumo apibrėžimas .....	17
1.1.2. Uogų farmakologinis poveikis.....	17
1.1.3. Aronijų išspaudų panaudojimas kietafazei fermentacijai .....	18
1.2. Kietafazė fermentacija .....	18
1.2.1. Fermentacijai naudojami mikroorganizmai .....	19
1.2.2. Kietafazei fermentacijai naudojami substratai.....	20
1.2.3. Dalelių dydžio poveikis fermentacijai .....	20
1.2.4. Drėgmės lygio taikymas kietafazei fermentacijai.....	21
1.2.5. Kietafazės fermentacijos temperatūriniai rodikliai.....	21
1.2.6. Maistinių faktorių įtaka kietafazei fermentacijai .....	21
1.3. <i>Bacillus megaterium</i> kaip mikroflora kietafazei fermentacijai atlikti .....	22
1.3.1. <i>Bacillus</i> genties bakterijų apibūdinimas .....	22
1.3.2. <i>Bacillus spp.</i> panaudojimas kietafazei fermentacijai .....	24
1.3.3. Kietafazė fermentacija naudojant <i>B. megaterium</i> .....	24
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI.....	25
2.1. Naudoti reagentai .....	25

2.2. Eksperimentinis modelis .....	25
2.3. Bakterijų skaičiaus nustatymas mėginiuose.....	26
2.4. Svarbiausių fermentacijos faktorių tyrimas sąlygų optimizavimui .....	26
2.5. Mėginių ekstrahavimas etanolium ir vandeniu .....	27
2.6. Antioksidacinio aktyvumo tyrimai .....	28
2.6.1. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas .....	28
2.6.2. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal DPPH <sup>•</sup> radikalų surišimo metodą.....	29
2.6.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal ABTS <sup>•+</sup> radikalų-katijonų surišimo metodą.....	31
2.7. Bendrojo antocianinų kiekio nustatymas pH diferenciniu metodu.....	32
2.8. Antocianinų sudėties nustatymas efektyvios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos (ESCh-MS) metodu.....	33
2.9. Statistinė analizė .....	34
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	35
3.1. Kietafazės fermentacijos sąlygų optimizavimo rezultatai .....	35
3.1.1. <i>B.megaterium</i> augimo priklausomybė nuo mitybinių faktorių.....	35
3.1.2. <i>B.megaterium</i> augimo priklausomybė nuo pH vertės terpėje.....	36
3.1.3. Priklausomybė nuo substrato ir bakterinio inokulumo tūrinio santykio bei rotacijos	37
3.2. Kietafazės fermentacijos įtaka ekstraktų išėigoms .....	38
3.3. Bendras fenolinių junginių kiekis ekstraktuose .....	39
3.4. Antioksidacinio aktyvumo rezultatai .....	40
3.5. Bendrasis antocianinų kiekis.....	42
3.6. Antocianinų identifikavimas.....	43
4. REKOMENDACIJŲ DALIS.....	45
IŠVADOS .....	47
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	48

PRIEDAS .....	53
Padēka .....	53
Pranešimai .....	53

Raudonius, Saimonas. ARONIJŲ IŠSPAUDŲ KIETAFAZĖS FERMENTACIJOS NAUDOJANT *BACILLUS MEGATERIUM* SĄLYGŲ OPTIMIZAVIMAS IR GAUTŲ PRODUKTŲ SAVYBIŲ ĮVERTINIMAS. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas prof. Petras Rimantas Venskutonis; Kauno technologijos universitetas, cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: technologijų mokslai, biotechnologijos

Reikšminiai žodžiai: aronijų išspaudos, *B.megaterium*, kietafazė fermentacija, antioksidacinis aktyvumas.

Kaunas, 2018. 54 p.

## SANTRAUKA

Juodavaisės aronijos (*Aronia melanocarpa*) yra geras antioksidantų šaltinis. Šio augalo uogų pagrindinis panaudojimas yra sulčių gamyba. Tai nulemia didelius kiekius uogų išspaudų, kurios dažniausiai yra pašalinamos kaip šalutinis produktas. Tačiau mokslinės literatūros teigimu, išspaudose lieka dalis biologiškai aktyvių medžiagų. Kietafazė fermentacija yra puikus tokių šalutinių produktų apdirbimo metodas. Remiantis moksline literatūra, *Bacillus* genties naudojimas kietafazei fermentacijai gali praturtinti agro-industrinės kilmės šalutinius produktus bioaktyviais junginiais.

Šio projekto **tikslas** buvo išsiaiškinti kietafazės fermentacijos, naudojant *Bacillus megaterium* bakterijas, įtaką juodavaisių aronijų išspaudų perdirbimui į aukštesnės vertės biologiškai aktyvius produktus.

**Uždaviniai ir metodai.** Optimizuoti juodavaisių aronijų išspaudų kietafazės fermentacijos, naudojant *Bacillus megaterium*, sąlygas, manipuluojant pagrindiniais fermentacijai svarbiais faktoriais, t.y. mitybinėmis medžiagomis, pH, rotacija bei substrato-bakterinio inokulumo tūriniu santykiu. Po fermentacijos įvykdyti etanolinę bei vandeningą ekstrakcijas bei apskaičiuoti ir palyginti fermentacijos įtaką ekstraktų išeigoms. Ištirti bei palyginti bendrą fenolinių junginių kiekį ekstraktuose *Folin-Ciocalteu* metodu. Taip pat ištirti bei palyginti tiriamų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą DPPH ir ABTS<sup>•+</sup> radikalinio surišimo metodais. Nustatyti bei palyginti antocianinų bendrą kiekį ekstraktuose, naudojant pH diferencinį spektrofotometrijos metodą bei antocianinų sudėtį, naudojant efektyvios skysčių

chromatografijos-masių spektrometrijos (ESCh-MS) metodą. Projekto pabaigoje, remiantis gautais rezultatais, suprojektuoti rekomenduojamą principinę technologinę schemą tyrimo metu naudotui eksperimentiniui modeliui.

**Rezultatai.** Aronijų išspaudų kietafazės fermentacijos, naudojant *B.megaterium*, sąlygų optimizavimo metodai parodė, jog iš tiriamųjų faktorių naudojama mikroflora jautriausiai reaguoja į maistines medžiagas ir pH. Tyrimai su rotacijos poveikiu bei substrato ir bakterinio inokulumo santykiu reikšmingų pokyčių neparodė. Taip pat, kietafazė fermentacija padidino vandeninių, bet ne etanolinių aronijų išspaudų ekstraktų išeigas. Bendrojo fenolinių junginių kiekis po fermentacijos reikšmingai padidėjo vandeniniuose ekstraktuose. Antioksidacinio aktyvumo tyrimai parodė, jog etanolinių ekstraktų antioksidacinė geba padidėja po fermentacijos ir turi reikšmingai didesnę radikalų surišimo potencialą už vandeninius ekstraktus. Nustatant bendrąjį antocianinų kiekį etanoliniuose ekstraktuose, paaiškėjo, jog kietafazė fermentacija sumažina antocianinų kiekį aronijų išspaudų ekstraktuose iki beveik neregistruojamo lygio. Tai patvirtino ir ESCh-MS parodymai – po fermentacijos jokie antocianinai, aptinkami aronijų išspaudose, nebuvo aptikti.

**Išvados.** *B.megaterium* bakterijų rūšis yra tinkama mikroflora aronijų išspaudų kietafazei fermentacijai atlikti. Kietafazės fermentacijos efektyvumas tiesiogiai priklauso nuo mitybinių medžiagų ir pH įtakos. Kietafazė fermentacija padidina aronijų išspaudų vandeninės, bet ne etanolinės ekstrakcijos išeigos dydį. Kietafazė fermentacija padidina bendrąjį fenolinių junginių kiekį vandeniniuose aronijų išspaudų ekstraktuose trigubai. Etanoliniuose ekstraktuose bendrasis fenolinių junginių kiekis yra apie 5 kartus didesnis nei vandeniniuose ekstraktuose, tačiau kietafazė fermentacija reikšmingos įtakos tam neturi. Kietafazė fermentacija padidina etanolinių aronijų išspaudų ekstraktų antioksidacinį potencialą. Vandeninių ekstraktų radikalų surišimo geba yra maža ir kietafazė fermentacija tam tiesioginės įtakos neturi. Kietafazė fermentacija, naudojant *B.megaterium*, aronijų išspaudose antocianinų kiekį sumažina iki beveik neaptinkamo lygio. Šis efektas buvo identifikuotas ir pH diferenciniu, ir ESCh-MS metodais.



Raudonius, Saimonas. OPTIMIZATION OF SOLID STATE FERMENTATION PARAMETERS OF CHOKEBERRY POMACE USING *BACILLUS MEGATERIUM* AND EVALUATION OF THE PRODUCT'S PROPERTIES. *Master's thesis in Industrial Biotechnology / supervisor assoc. prof. Petras Rimantas Venskutonis. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.*

Study field and area: technology, biotechnology

Key words: chokeberries, *Aronia melanocarpa*, Solid state fermentation, *Bacillus megaterium*, antioxidant capacity

Kaunas, 2018, 54 p.

## SUMMARY

Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) are a good source of antioxidants. The main use for this plant is the production of juice from the berries. This results in large amounts of pomace, which is usually treated as a by-product and utilized. However, there are traceable amounts of biologically active compounds in the pomace. According to scientific literature, the use of genus *Bacillus* for solid state bioprocessing can enrich the by-products of agricultural and industrial by-products.

The **aim** of this project was to evaluate the effects of solid state fermentation using *Bacillus megaterium* on the processing of chokeberry pomace into higher value bioactive products.

**Objectives and methods.** To optimize the conditions for solid state fermentation of chokeberry pomace by using *Bacillus megaterium*, by manipulating key factors of the fermentation, i.e. nutrients, pH, effects of rotation and the volume ration between the substrate and bacterial inoculum. After fermentation, to perform ethanolic and aqueous extractions and calculate and compare the effects of the fermentation on the yield of the extracts. Further, to investigate and compare total phenolic compounds abundant in the extracts using *Folin-*

*Ciocalteu* method. Also, the antioxidant activity of the investigated extracts was assessed and compared with DPPH and ABTS<sup>•+</sup> radical binding assays. Furthermore, to determine and compare the total amount of anthocyanins in the extracts using pH differential spectrophotometric method and to assess the composition of anthocyanins using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) method. And at the end of the project, based on the obtained results, to design the recommended principal technological scheme for the experimental model used during the study.

**Results.** The methods for the optimization of the conditions for solid state fermentation of chokeberry pomace using *Bacillus megaterium* have shown that the microflora is most sensitive to nutrients and pH, compared to other investigated factors. Studies with the effects of rotation and substrate-inoculum volume ratios did not show significant changes in bacterial growth. In addition, solid state fermentation increased the yield of aqueous, but not ethanolic, extracts of the fermented chokeberry pomace. The total phenolic compounds after fermentation significantly increased in aqueous extracts. Antioxidant activity studies have shown that the antioxidant capacity of ethanolic extracts increases after the fermentation and has a significantly higher radical binding potential than the aqueous extracts. The determination of total amount of anthocyanins in ethanolic extracts revealed that solid state fermentation reduced the anthocyanin content in the extracts of chokeberry pomace to an almost undetectable level. This was also confirmed by HPLC-MS that resulted in evidence, that no anthocyanins were detected in the extracts after the fermentation of chokeberry pomace.

**Conclusions.** *B.megaterium* is a suitable microflora for solid state fermentation of chokeberry pomace. The effectiveness of the fermentation directly depends on the used nutrients and the pH value. Solid state fermentation increases the yield in aqueous, but not ethanolic, extracts of chokeberry pomace. Solid state fermentation increases the total amount of phenolic compounds in the aqueous extracts of chokeberries. In ethanolic extracts, the total phenolic contents is about 5 times higher than that in the aqueous extracts, however, solid state fermentation does not have a significant effect on it. Solid state fermentation increases the

antioxidant potential of the ethanolic extracts of chokeberry pomace. The radical binding ability of aqueous extracts were low and solid state fermentation does not have a direct effect on it. Solid state fermentation using *B.megaterium* reduces the total amount of anthocyanins in chokeberry pomace to an almost undetectable levels. This effect was identified by both pH differential and HPLC-MS assays.

## LENTELIŲ SĄRAŠAS

<b>3.1. lentelė.</b> Bendrojo fenolinių junginių kiekio parodymai .....	39
<b>3.2. lentelė.</b> Antioksidacinio aktyvumo parodymai .....	41
<b>3.3. lentelė.</b> Bendrojo antocianinų kiekio tyrimo parodymai.....	42
<b>3.4. lentelė.</b> ESCh-MS Identifikuotų junginių aronijų išspaudose prieš fermentaciją charakteristikos .....	44

## PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

<b>1 pav.</b> Supaprastinta principinė tyrimo schema .....	15
<b>2 pav.</b> <i>Aronia melanocarpa</i> (juodavaisė aronija) .....	16
<b>3 pav.</b> Kviečių šiaudų kietafazė fermentacija, kaip mikroflorą naudojant <i>Trichoderma asperellum</i> .....	19
<b>4 pav.</b> <i>Bacillus megaterium</i> bakterijų SEM nuotrauka .....	23
<b>5 pav.</b> Galo rūgšties kalibracinė kreivė bendram fenolinių junginių kiekiui nustatyti.....	29
<b>6 pav.</b> Trolokso kalibracinė kreivė antioksidaciniam aktyvumui nustatyti DPPH <sup>•</sup> metodu.....	30
<b>7 pav.</b> Trolokso kalibracinė kreivė antioksidaciniam aktyvumui nustatyti ABTS <sup>•+</sup> metodu .....	31
<b>8 pav.</b> Cianidino-3-gliukozido kalibracinė kreivė .....	34
<b>9 pav.</b> Bakterinio augimo priklausomybė nuo mitybinių faktorių .....	35
<b>10 pav.</b> Bakterinio augimo priklausomybė nuo pH vertės terpėje .....	36
<b>11 pav.</b> Bakterinio augimo priklausomybė nuo tūrinio substrato ir bakterinio inokulumo santykio ir rotacijos .....	37
<b>12 pav.</b> Kietafazės fermentacijos įtaka etanolinių ir vandeninių ekstraktų išėigoms.....	38
<b>13 pav.</b> Bendras fenolinių junginių kiekis ekstraktuose po fermentacijos .....	39
<b>14 pav.</b> Tiriamųjų mėginių antioksidacinio aktyvumo parodymai, naudojant DPPH <sup>•</sup> ir ABTS <sup>•+</sup> radikalų surišimo metodus .....	40
<b>15 pav.</b> ESCh-MS gautos chromatogramos, reprezentuojančios antocianinų aptikimą aronijų išspaudose prieš ir po kietafazės fermentacijos. ....	43
<b>16 pav.</b> Rekomenduojama principinė aronijų išspaudų apdirbimo kietafaze fermentacija technologinė schema .....	45

## SANTRUMPOS

ABTS<sup>•+</sup> – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfo) rūgštis;

CO<sub>2</sub> – anglies dioksidas;

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrihidrazil hidratas;

ESCh-MS – efektyvioji skysčių chromatografija-masių spektrometrija;

EtOH – etanolis;

GMO – genetiškai modifikuotas organizmas;

GRE – galo rūgšties ekvivalentas;

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – kalio dihidrofosfatas;

KSV – koloniją sudarantis vienetas;

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – natrio karbonatas;

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – dinatrio fosfatas;

NaCl – natrio chloridas;

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – natrio dihidrofosfatas;

SEM – skenuojamoji elektroninė mikroskopija

SM – sausa masė;

TE – trolokso ekvivalentas.

## IVADAS

Augalinių maisto produktų nauda sveikatai yra siejama su jų sudėtyje esančiais biologiškai aktyviais komponentais. Juodavaisės aronijos yra žinomos kaip geras antioksidantų, ypač polifenolių, šaltinis. Šių uogų sulčių gamybos metu gaunami dideli kiekiai išspaudų, kurių sudėtyje yra ne tik polifenolinių junginių, bet ir lipidų, baltymų bei sacharidų (1). Ši kompozicija lemia išspaudų tinkamumą bakteriniam augimui. Ir nors aronijų sveikatingumą skatinantys efektai yra plačiai nagrinėjami, nėra daug žinių apie tai, kaip veiksmingai išgauti biologiškai aktyvius komponentus iš uogų išspaudų (2,3).

Kietafazė fermentacija yra aplinkai nekenksmingas ir praktiškas bioatliekų apdorojimo metodas, kurio tikslas – praturtinti substratus vertingomis biologiškai aktyviomis medžiagomis (4). Plataus masto bioaktyvių komponentų gamybai plečiantis, tuo pat metu auga ir išlaidų bei energijos sąnaudos. Kietafazės fermentacijos metodika yra sėkmingai pritaikoma šiuolaikiniuose tyrimuose bei industrijoje gaminant fermentus ir kitus bioaktyvius antrinius metabolitus (5,6). Šis apdorojimo būdas pasižymi mažesnėmis energijos sąnaudomis, stabilesnio produkto išgavimu bei paprastesniu apdirbimu (7).

Aronijoms turint didelį sveikatai naudingą potencialą, kietafazė fermentacija galėtų būti puikus šių uogų išspaudų apdorojimo būdas siekiant išgauti vertingus biologiškai aktyvius junginius. Tačiau beveik nėra mokslinės literatūros apie šio būdo pritaikymą kaip substratą naudojant juodavaisių aronijų išspaudas.



**1 pav.** Supaprastinta principinė tyrimo schema

**Darbo tikslas** – išsiaiškinti kietafazės fermentacijos, naudojant *Bacillus megaterium* bakterijas, įtaką juodavaisių aronijų išspaudų perdirbimui į aukštesnės vertės biologiškai aktyvius produktus.

**Darbo uždaviniai:**

1. Optimizuoti juodavaisių aronijų išspaudų kietafazės fermentacijos, naudojant *Bacillus megaterium*, sąlygas, manipuluojant pagrindiniais fermentacijai svarbiais faktoriais;
2. Įvykdyti etanolinę bei vandeninę ekstrakcijas bei apskaičiuoti ir palyginti fermentacijos įtaką ekstraktų išėigoms;
3. Ištirti bei palyginti bendrą fenolinių junginių kiekį ekstraktuose *Folin-Ciocalteu* metodu;
4. Ištirti bei palyginti tiriamų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą DPPH<sup>\*</sup> ir ABTS<sup>++</sup> metodais;
5. Nustatyti bei palyginti antocianinų bendrą kiekį ekstraktuose, naudojant pH diferencinį spektrofotometrijos metodą bei antocianinų sudėtį, naudojant efektyvios skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos (ESCh-MS) metodą.



# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Juodavaisės aronijos (*Aronia melanocarpa*) apibūdinimas

Gentis *Aronia* apima dvi Šiaurės Amerikos lapuočių krūmų rūšis: *A. melanocarpa*, žinoma kaip juodavaisė aronija, ir *A. arbutifolia*, kuri atpažįstama kaip raudonavaisė aronija. *A. melanocarpa* yra 90–180 centimetrų aukščio krūmas su juodos–violetinės spalvos, maždaug 6 milimetrų skersmens, uogomis (2 pav.). Uogos yra ankstyvo brendimo bei kritimo (8).



2 pav. *Aronia melanocarpa* (juodavaisė aronija)

*A. melanocarpa* susilaukė populiarumo dvidešimtajame amžiuje, augalų uogas Rytų Europoje ir Sovietų Sąjungoje pradėjus naudoti kaip natūralų maistinių dažiklių šaltinį bei didelio mąsto sulčių ir vynų produkcijai. Laikui bėgant, Rytų Europos regionuose juodavaisės aronijos pradėtos naudoti kaip vaistažolės analogas, dažnai augalą vartojant kaip antihipertenzinį ar antiaterosklerozinį preparatą.

Juodavaisių aronijų uogos yra rūgštaus skonio ir turinčios sutraukiamųjų savybių, o tai lemia jų didesnę tinkamumą perdirbti į antrinius produktus nei vartoti tiesiogiai (8,9).

### **1.1.1. Biocheminis apibūdinimas bei antioksidacinio aktyvumo apibrėžimas**

*A. melanocarpa* pasižymi dideliu antioksidaciniu potencialu. Dėl didelio polifenolių kiekio, šių aronijų uogos gali būti naudojamos kaip sudedamasis ingredientas antioksidantinėse, sveikatingumą skatinančiose, sultyse bei arbatose. Antocianinai, proantocianidinai, flavonolių bei flavan-3-olių glikozidai ir fenolinės rūgštys yra pagrindiniai polifenoliai, randami juodavaisėse aronijose. Šviežiame juodavaisių aronijų svoryje vyrauja nuo 357 iki 1790 mg. antocianinų per 100 g. vaisių (10).

Juodavaisių aronijų uogose esantis antocianinų profilis yra pakankamai paprastas, lyginant su kitomis uogomis – jis susideda iš keturių cianidino glikozidų: cianidin-3-galaktozido, cianidin-3-ksilozido, cianidin-3-arabinozido bei cianidin-3-gliukozido. Galaktozės ir arabinozės cukrų antocianinai yra pagrindiniai šių junginių atstovai, sudarantys daugiau nei 90% visų antocianinų kiekio uogose. Taip pat uogose yra randami ir kvercetas bei keletas kvercetino glikozidų (kvercetino-3-gliukozidas, kvercetino-3-galaktozidas ir kvercetino-3-rutinozidas), tačiau palyginus mažomis koncentracijomis – apie 70 mg. per 100 g. šviežių uogų masės (10–13).

### **1.1.2. Uogų farmakologinis poveikis**

Aronijų vartojimas padeda palaikyti kraujospūdžio lygį normaliose ribose. Šių uogų sultys yra labai rekomenduojamos žmonėms, turintiems problemų dėl aukšto kraujospūdžio lygio. Aronijos taip pat pasižymi kraujagysles tvirtinančiomis bei širdies ir kraujagyslių ligų riziką mažinančiomis savybėmis (14). Šios uogos taip pat kovoja su bakterijomis bei virusais ir taip stiprina imuninę sistemą. Uogų sudėtyje taip pat yra daug karotino, kuris ne tik apsaugo įvairias ląsteles nuo pažeidimų, bet ir pasižymi akis nuo kataraktos apsaugančiu poveikiu (10, 15–17). Taip pat, pastarųjų metų tyrimas su žiurkėmis parodė, jog aronijų sulčių vartojimas turi teigiamą poveikį siekiant sumažinti stresą ar depresiją (18).

### **1.1.3. Aronijų išspaudų panaudojimas kietafazei fermentacijai**

Kol kas galima rasti tik vieną publikaciją, kurioje aptariamas aronijų išspaudų kaip substrato pritaikymas kietafazei fermentacijai. Tai 2017 metų Dulf ir kt. (19) atliktas tyrimas, kurio metu buvo taikoma kietafazė fermentacija naudojant *Aspergillus niger* ir *Rhizopus oligosporus* padermes aronijų išspaudoms fermentuoti. Eksperimento metu buvo pasirinkta tirti ne tik pofermentacinį antioksidacinį aktyvumą bei lipidų ir fenolinių antioksidantų sudėtį, bet ir stebėti antocianinų kiekybinius pokyčius fermentacijos metu. Atlikti tyrimai parodė, jog antocianinų kiekis ženkliai mažėjo fermentaciniu periodu, tačiau po fermentacijos flavonolių ir lipidų kiekis išaugo. Mokslininkai padarė išvadą, jog kietafazė fermentacija praturtino aronijų išspaudas biologiškai aktyviomis medžiagomis ir taip pagerino šio substrato maistines savybes.

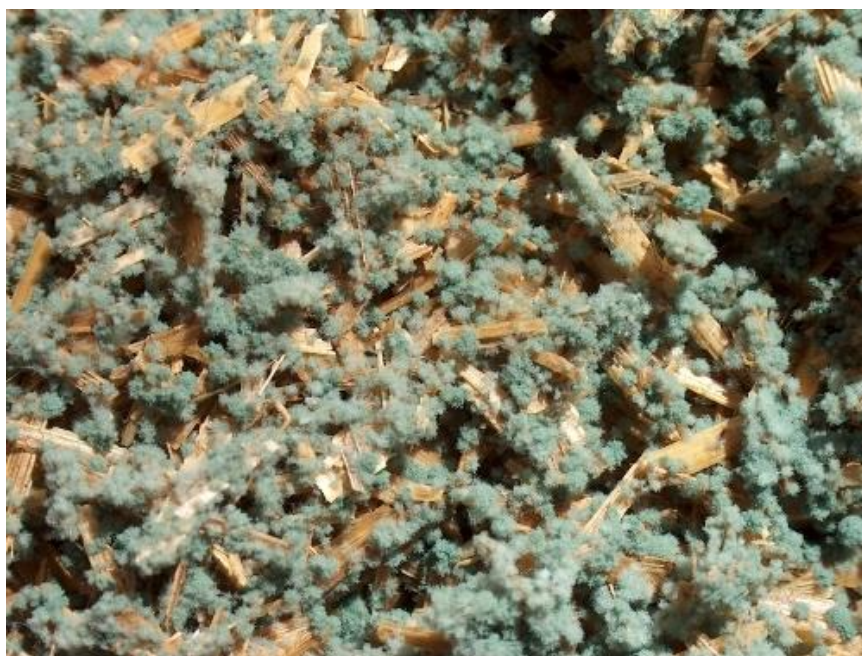
## **1.2. Kietafazė fermentacija**

Kietafaze fermentacija (angl. k. *Solid State Fermentation; SSF*) apibrėžiamas procesas, kuriame mikroorganizmai auga ant kietųjų medžiagų, terpėje nesant laisviems skysčiams (20). Kietafazėje fermentacijoje drėgmė, reikalinga mikroorganizmams augti yra absorbuotos fazės arba komplekse su kietąja matrica (21).

Priklausomai nuo kietosios fazės pobūdžio, yra išskirti du kietafazės fermentacijos sistemų tipai. Dažniausiai naudojama sistema paremta kultivavimu ant gamtinės medžiagos. Rečiau naudojama sistema apima kultivavimą ant inertinės kietos medžiagos, impregnuotos skysta terpe (22). Kadangi gamtiniai, natūralūs, substratai dėl savo heterogeniškumo sukuria nemažai sunkumų fermentacijos kinetikos tyrimams, tokia studija gali būti atlikta naudojant sintetinius inertiškus kietuosius substratus (23).

### 1.2.1. Fermentacijai naudojami mikroorganizmai

Pagrindinės kietafazėje fermentacijoje naudojamos mikroorganizmų grupės yra mikroskopiniai grybai ir bakterijos. Filamentiniai grybai yra ideali mikroflora, nes jie yra geriausiai prisitaikę prie SSF sąlygų. Atsižvelgiant į kietųjų substratų kolonizavimą bei naudingųjų medžiagų utilizavimą, hifinis grybų augimas ir puiki mažo vandens aktyvumo ( $A_w$ ) bei aukšto osmotinio slėgio sąlygų tolerancija suteikia jiems privalumų lyginant su vienaląsčiais organizmais (24–27).



**3 pav.** *Kviečių šiaudų kietafazė fermentacija, kaip mikroflorą naudojant *Trichoderma asperellum**

Tačiau specifinės mikroorganizmų padermės parinkimas yra sudėtingas procesas, ypač norint išgauti komerciškai kompetetingą produktą. Dar vienas esminis aspektas yra susijęs su kamieno atranka, norint sąlygoti jo efektyvumą gaminant norimą galutinį produktą. Dažniausiai hidrolitiniai fermentai, tokie kaip celiulazės, ksilanazės ir pektinazės yra gaminami mikroskopinių

grybų (26). Tačiau bakterijos taip pat dalyvauja daugelyje natūralių fermentacijos procesų, pavyzdžiui, kompostavimo, silosavimo bei maisto fermentacijos. Pastarųjų metų studijos rodo, jog *Bacillus* gentis yra puiki mikroflora įvairių fermentų produkcijai naudojant kietafazę fermentaciją (28–31).

### **1.2.2. Kietafazei fermentacijai naudojami substratai**

Visi kietieji substratai turi bendrą bruožą – jų makromolekulinė struktūra susideda iš krakmolo, celiuliozės, lignoceliuliozės, pektino ar kitų polisacharidų. Tokia molekulinė struktūra suteikia substratams kietojo kūno savybių. Substratai kietafazei fermentacijai yra heterogeniški žemės ūkio produktai arba šalutiniai produktai iš įvairių agro-industrijos šakų (32).

Struktūrinės makromolekulės gali sudaryti inertinę matricą, kurioje yra adsorbuojami anglies bei energijos šaltiniai. Išankstinis apdorojimas bei preparacija yra būtini žingsniai norint konvertuoti žalią substratą į tinkamą naudojimui formą. Tokios priemonės yra – dydžio sumažinimas smulkinant, spaudžiant ar pjaustant; fizinė, cheminė ar fermentinė polimerų hidrolizė substratų prieinamumui padidinti. Taip pat, maisto medžiagų pridėjimas, tinkamo pH bei drėgmės lygio nustatymas, bei pagrindinių kontaminantų pašalinimas, yra svarbūs preparacijos elementai kietafazei fermentacijai atlikti.

Pagrindinis gamtinių substratų trūkumas yra tai, kad anglis yra sudedamoji jų struktūros dalis. Mikroorganizmams augant, kietoji terpė suyra bei sukelia geometrinius bei fizinius terpės charakteristikos pokyčius, kas galiausiai nulemia šilumos bei masės mainų nuostolius (21,24).

### **1.2.3. Dalelių dydžio poveikis fermentacijai**

Dalelių dydis yra svarbus aspektas, nes yra susijęs su substrato charakterizavimu bei naudojamos sistemos pajėgumu derinti mikrobinį augimą ir šilumos bei masės mainus kietafazės fermentacijos sistemoje. Taip pat, tai daro įtaką dalelių paviršiaus ploto ir tūrio santykiui, kuris lemia substrato frakciją, kuri proceso pradžioje yra prieinama mikroorganizmui. Dalelių dydžiui

mažėjant, paviršiaus ploto ir tūrio santykis didėja. Substrato dydis taip pat lemia erdvės talpą, kuri yra užimama oro. Kadangi deguonies srauto perdavimas į šią erdvę lemia mikroorganizmų augimą, siekiant padidinti masės perdavimą, substratas turi susidėti iš tinkamo dydžio dalelių.

Dažniausiai mažo dydžio dalelės padidina paviršiaus plotą mikrobiniais veiksmais, bet per mažo dydžio dalelės gali sukelti substrato aglomeraciją, kuri gali trikdyti mikrobinį kvėpavimą bei aeraciją ir taip nulemti prastą kultivaciją (23).

#### **1.2.4. Drėgmės lygio taikymas kietafazei fermentacijai**

Siekiant gero fermentacijos proceso, turi būti išlaikytas optimalus drėgnumo lygis, nes maža drėgmė yra linkusi sumažinti maistinių medžiagų difuziją, mikrobinį augimą bei fermentų stabilumą. Per didelis drėgmės lygis lemia dalelių aglomeraciją bei dujų perdavimo apribojimus. Dažniausiai kietafazės fermentacijos procesuose drėgnumo lygis varijuoja nuo 30 iki 85%. Bakterijoms kietosios matricos drėgmės lygis turi būti didesnis nei 70%. Filamentiniams grybams diapazonas yra 20–70% (21,24,26).

#### **1.2.5. Kietafazės fermentacijos temperatūriniai rodikliai**

Turbūt pats svarbiausias iš visų fizinių kintamųjų, lemiančių kietafazės fermentacijos efektyvumą, yra temperatūra. Taip yra todėl, kad mikrobinis augimas ir fermentų ar metabolitų gamyba yra temperatūrai jautrūs procesai. Šilumos generacijos lygis yra tiesiogiai proporcingas metabolinio aktyvumo lygiui SSF sistemoje.

Dažniausiai fermentacijos procesai kuriami su mezofilinėmis mikroorganizmų padermėmis, tai yra, mikroflora, kurių temperatūrinė tolerancija yra maždaug iki 50 °C (23,28,30).

#### **1.2.6. Maistinių faktorių įtaka kietafazei fermentacijai**

Anglis reprezentuoja energijos šaltinį, kuris bus prieinamas mikroorganizmui augant. Tai gali būti grynas monosacharidas, pavyzdžiui, gliukozė arba sudėtingesnės molekulės, tokios kaip

celiuliozė ar krakmolas. Kiti anglies šaltiniai gali būti sacharozė, laktozė, rafinozė, maltozė, celobiozė, salyklo ekstraktas, glicerolis, etanolis, kalio acetatas ir kt. Azoto šaltiniai, reikalingi mikroflorai, gali būti amonio tartratas, oksalatas, sulfatas, nitratas, chloridas; natrio nitratas, karbamidas, peptonai bei aminorūgštys (30,33).

Formuojant terpę, būtina atsižvelgti į biomasės kompoziciją. Be pagrindinių maistinių elementų, kiti elementai, tokie kaip fosforas, siera bei metalai taip pat yra svarbūs, tačiau mažais kiekiais.

Manoma, kad anglies ir azoto santykis (C:N) yra pats svarbiausias rodiklis siekiant užtikrinti efektyvią užsibrėžto produkto gamybą. Anglies ir azoto santykiai biomasėje ir terpeje yra susiję su išeiga bei biomasės kompozicija. Remiantis studijomis, geriausias C:N santykio tinkamumas kietafazės fermentacijos procesams yra 16 (34).

### **1.3. *Bacillus megaterium* kaip mikroflora kietafazei fermentacijai atlikti**

#### **1.3.1. *Bacillus* genties bakterijų apibūdinimas**

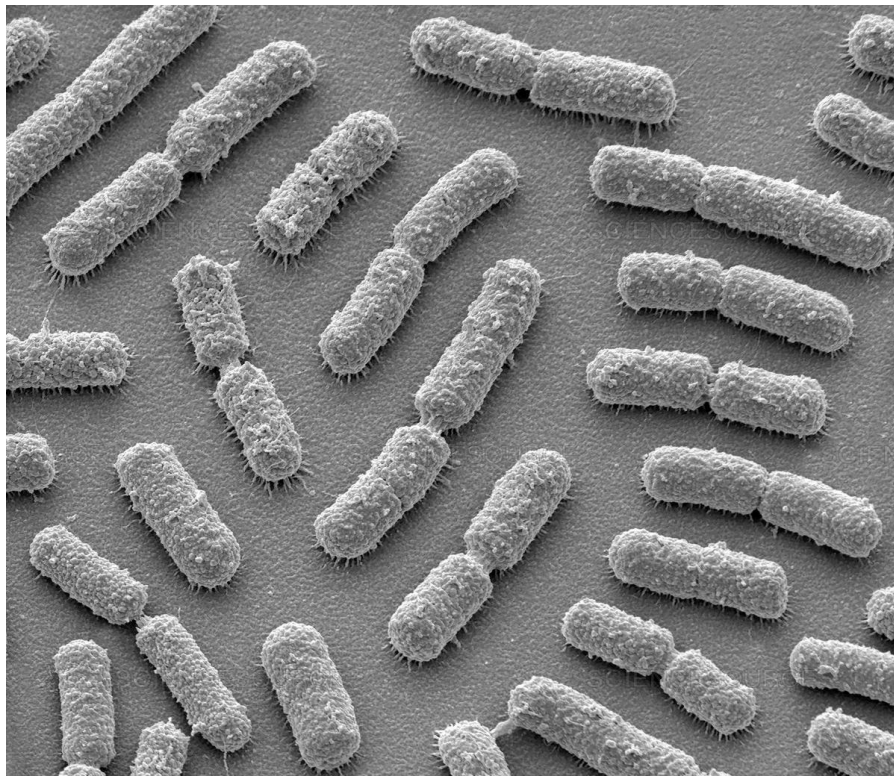
Morfologiškai šių bakterijų vegetatyvinės ląstelės yra tiesios, apvalių arba kampuočių kraštų lazdelės. Bakterijos yra 0.5-1.2 μM pločio ir 2.5-10.0 μM ilgio (4 pav.). Dauguma jų judros, juda peritrichiniais žiuželiais. Ši gentis yra formuojanti endosporas. Sporos forma gali varijuoti priklausomai nuo rūšies ir gali būti ovalo, ritinio ar sferos tipo. Sporos formuojamos esant blogoms sąlygoms, t.y. kultūrai senstant, esant dideliame karščiui ar maisto medžiagų trūkumui.

Metaboliniu požymiu būtų galima įvardinti deguonies poreikį augimui. Tačiau keletas rūšių gali būti fakultatyviniai anaerobai. Bakterijos respiratoriškai arba fakultatyviškai fermentacinio pobūdžio. Daugelis rūšių yra chemoorganoheterotrofinės. Didžioji dalis genties rūšių gali augti ant maistinio agarų. Kai kurios rūšys, pavyzdžiui *Bacillus polymyxa* gali fiksuoti azotą.

Rekomenduojama terpė bakterijoms:

- Kultivavimui – 5% kraujo agaras, tripsinizuotas sojos agaras (TSA), smegenų širdies infuzinis (BHI) agaras arba maistinis agaras;
- Selektiviam izoliavimui – selektyvios terpės, apart *Bacillus anthracis*, nėra;
- Priežiūrai – 5% kraujo agaras, tripsinizuotas sojos agaras (TSA), smegenų širdies infuzinis (BHI) agaras arba maistinis agaras.

Industrijoje daugelis *Bacillus* rūšių geba išskirti didelius kiekius fermentų. *Bacillus amyloliquefaciens* yra natūralaus antibiotinio baltymo barnazės (ribonukleazės) šaltinis. Dalis *Bacillus thuringiensis* genomo buvo inkorporuota į kukurūzų bei medvilnės augalus. Gautieji GMO dėl to yra atsparūs kai kuriems kenkėjams vabzdžiams (28,35,36).



**4 pav.** *Bacillus megaterium* bakterijų SEM nuotrauka



### **1.3.2. *Bacillus spp.* panaudojimas kietafazei fermentacijai**

Pastarųjų metų tyrimai rodo, jog *Bacillus* genties mikroorganizmai yra tinkama mikroflora kietafazės fermentacijos procesams apdorojant agro-industrines atliekas. *Bacillus thuringiensis* rūšis eksperimente buvo naudojama sojos atliekoms fermentuoti ir gaminti  $\delta$ -endotoksina, siekiant išgauti biopesticidais turtingą dirvožemį (28). *B. licheniformis* mikroflora buvo naudojama fermentuoti įvairias žemės ūkio atliekas, tokias kaip bananų bei apelsinų žievės, bulvių lupenos ar datulių atliekos. Rezultatai parodė, jog ši rūšis tinkamomis sąlygomis gamina stabilią  $\alpha$ -amilazės formą (31). Eksperimentai su *B. cereus* ir kietafaze fermentacija nulėmė lipopeptidinės kilmės biosurfaktanto gamybą, kaip substratą naudojant riešutinės kilmės bio-atliekas (37). *B. subtilis* kultūra 2017 metų tyrime buvo panaudota pektinolitinių fermentų ir pektino liazės gamyboje naudojant kietafazę fermentaciją bei siekiant atrasti didžiausią išeią nulemiantį, žemės ūkio atliekų pobūdžio, substratą (29).

### **1.3.3. Kietafazė fermentacija naudojant *B. megaterium***

Kol kas yra tik keletas publikacijų, kuriose aptariamas *Bacillus megaterium* panaudojimas kietafazei fermentacijai atlikti. Vienas jų yra Ramesh ir kt. (38) 1987 metais atliktas tyrimas, kurio metu iš kviečių sėlenų substrato buvo siekiama išgauti  $\alpha$ -amilazę. Darbas buvo paremtas fermentacijos faktorių optimizavimu bandant gauti geriausią fermento išeią bei siekiant išvengti kitų fermentų, tokių kaip celiulazės ar proteazės, bendros produkcijos.

Kitame, 2006 metų, tyrime Sindhu ir kt. (39) taip pat atliko optimizacinio pobūdžio eksperimentą, siekiant išgauti aktyviausią fermento ksilanazės formą naudojant *Bacillus megaterium* bakterijas. Buvo pasirinkta keletas kintamųjų, tokių kaip substrato kompozicija, dalelių dydis, maistinių tirpalų tipai bei inkubacijos periodas. Taip pat, kietafazės fermentacijos metu išgautas fermento aktyvumas buvo lyginamas su įprastos, skystos, fermentacijos metu išgauto fermento aktyvumu. Rezultatai parodė, jog, optimizavus kietafazės fermentacijos sąlygas, gauta fermento ksilanazės forma yra daug kartų aktyvesnė lyginant su skystos fermentacijos metu išgautu fermentu.

## 2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

### 2.1. Naudoti reagentai

Mikrobiologiniams tyrimams naudoti natrio hidrofosfatas ir kalio fosfatas gauti iš Sigma-Aldrich, peptono ir triptono maistinė druska gauta iš LAB M, triptono fosfatinė maistinė druska iš Biolife Italiana, maistinis agaras iš Sigma-Aldrich.

Antioksidaciniuose tyrimuose naudoti metanolis ir etanolis gauti iš Chempur, 99% galo rūgštis iš Omnilab, *Folin-Ciocalteu* reagentas iš Sigma-Aldrich, bevandenis natrio karbonatas gautas iš Chempur, DPPH<sup>•</sup> [2,2-difenil-1-pikrihidrazil hidratas], ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfo rūgštis)] laisvieji radikalai ir troloksas [(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchromano-2-karboksilinė rūgštis] gauti iš Sigma-Aldrich. Antocianinų tyrimuose metanolis ir 98% skruzdžių rūgštis gauti iš Sigma-Aldrich.

### 2.2. Eksperimentinis modelis

Kiekvieno tyrimo metu kaip substratas buvo naudojama 10 g. juodavaisių aronijų išspaudų po CO<sub>2</sub> ekstrakcijos. Eksperimentinį laikotarpį sudarė 96 val. fermentacijos, stebint bakterinį augimą kiekvieną 24 val. periodą. Nustačius pageidautinas tiriamojo faktoriaus sąlygas, mėginys buvo dedamas autoklavuoti 30 min., 121 °C temperatūroje. Visos faktorių manipuliacijos buvo atliekamos kiekvieno atskiro eksperimento pradžioje ir nebuvo keičiamos viso fermentacijos periodo metu, siekiant išlaikyti sterilias sąlygas. Pirminis *B.megaterium* sėjimo kiekis pasirinktas spektrofotometriškai ir pagal gautą sugertį buvo siekiama išlaikyti vienodą sėjamos kultūros skaičių kiekvieno eksperimento metu. Kontrolei vietoje baakterinio inokulumo buvo naudojamas toks pat tūris fiziologinio tirpalo. Kietafazė fermentacija buvo atliekama 50 ml. talpos buteliukuose. Tiriamieji mėginiai buvo laikomi laboratoriniame termostate, 37 °C temperatūroje.

*B. megaterium* kultūra buvo kultivuojama mėgintuvėliuose ant nuožulnaus mitybinio agaro. Kultūra buvo laikoma termostate, o ilgesnį laiką nenaudojant ir siekiant išvengti peraugimo, patalpinama į šaldytuvą.

### 2.3. Bakterijų skaičiaus nustatymas mėginiuose

Aseptinėmis sąlygomis į sterilų maišelį pasveriami 1 g. mėginio, daromi  $10^3$ – $10^5$  laipsnių skiedimai fiziologiniu (0,85 % koncentracijos NaCl) tirpalu ir sėjami į Petri lėkšteles užpilant šiltu mitybiniu agaru. Kiekvienam skiediniui buvo skiriamos 2 Petri lėkštelės. Skiedimai ir sėjimai buvo atliekami laminare, laikantis visų privalomų sterilumo taisyklių. Po 24 val. skaičiuojamos užaugusios bakterijų kolonijos lėkštelę pasidedant ant tamsaus paviršiaus ir apvedant kolonijas žymekliu. Bakterijų skaičius buvo išreiškiamas kolonijas sudarančiais vienetais (KSV) 1 grame mėginio. Kolonijas sudarantys vienetai apskaičiuojami pagal formulę (A.Šarkinas, 2011m. „Maisto mikrobiologijos laboratoriniai darbai“ Mokomoji knyga; 31 psl.):

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot [n_1 + (0,1 \cdot n_2)] \cdot d};$$

$\sum C$  – suma kolonijų, suskaičiuotų visose neatmestose lėkštelėse iš dviejų vienas po kito einančių skiedinių, kai bent vienoje lėkštelėje yra 15-300 kolonijų;

$V$  – užsėtos medžiagos ar skiedinio tūris lėkštelėje mililitrais (šiuo atveju – 1 ml.);

$n_1$  – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius (šiuo atveju – 2);

$n_2$  – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius (šiuo atveju – 2);

$d$  – pirmojo vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas ( $d=1$ , kai tiriamasis skystas produktas (tiriamasis mėginys) yra neskiestas).

### 2.4. Svarbiausių fermentacijos faktorių tyrimas sąlygų optimizavimui

Remiantis literatūra, buvo pasirinkta tirti keletos esminių kietafazės fermentacijos faktorių įtaką: skirtingų maistinių druskų tirpalų, substrato ir bakterinio inokulumo santykio, rotacijos ir pH.

Eksperimentams buvo pasirinkti 3 rūšių maistinių druskų tirpalai: **Tirpalas 1** (g/l: 3,56  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,76  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4,3  $\text{NaCl}$ , 1 Triptono); **Tirpalas 2** (g/l: 5 Peptono, 5 Triptono, 5  $\text{NaCl}$ ); **Tirpalas 3** (g/l: 5 Peptono, 5 Triptono, 5  $\text{NaCl}$ , 9  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Kontrolei registruoti buvo naudojamas distiliuotas vanduo. Į 10 g. juodavaisių aronijų išspaudų substrato buvo pilama 30 ml. maistinių druskų tirpalo.

Tiriant pH įtaką, buvo pastebėta, jog pradinė fermentacinės terpės pH vertė yra 3. Buvo nuspręsta ištirti bakterinio augimo priklausomybę pasirenkant tokias vertes: **pH 3, pH 5, pH 7, pH 8**. Pradinei terpės pH esant rūgštinei, gauti aukštesnėms vertėms buvo naudojamas 0,1 mM koncentracijos  $\text{NaOH}$  tirpalas. pH vertės buvo matuojamos pH-metru, specialiai skirtu pusiau kietoms medžiagoms. Rezultatai buvo skaičiuojami po viso 96 val. fermentacijos periodo.

Substrato ir sėjamos kultūros tūrinio santykio tyrimui buvo pasirinkta stebėti **1:10, 1:5, 1:2** ir **1:1** santykius. Tai reiškė, jog santykiui mažėjant, didėjo fermentacijai sėjamos *B. megaterium* kultūros kiekis. Todėl siekiant išlaikyti objektyvią tyrimo stebėseną, skaičiuojant bakterinis augimas buvo konvertuojamas į kitimą kartais.

Rotacijos įtakos eksperimentas buvo atliekamas įprastine tvarka, tik inkorporuojant rotacinę purtyklę. Remiantis literatūra, rotacijos parametrai buvo nustatyti ties 200 aps./min., palaikant 37 °C temperatūrą. Bakterijų skaičius buvo registruojamas kiekvieną parą, 96 val. periode. Rezultatai išreiškiami kaip bakterinis augimas „**įprastinėmis sąlygomis**“ ir „**po rotacijos**“.

## **2.5. Mėginių ekstrahavimas etanoliu ir vandeniui**

Po fermentacinio laikotarpio buvo vykdoma etanolinė ekstrakcija. Mėginiai sumaišomi su etanoliu santykiu 1:5, tai yra, į turimus 10 g. mėginio pilama 50 ml. EtOH (96 %). Sumaišius su etanoliu, mėginiai 2 val. kambario temperatūroje purtomi ant purtyklės (200 aps./min.). Praėjus 2 valandoms, mėginiai filtruojami vakuumine filtracija. Filtratas atidedamas, o ant liekanos

užpilama 40 ml. EtOH ir mišinys dedamas ant purtyklės dar 2 valandoms. Analogiškai praeitam etapui, mėginiai filtruojami vakuumine filtracija. Turimi filtratai apjungiami. Liekana atidedama džiovinimui. Filtrato etanolis nugarinamas rotaciniu garintuvu, o likęs vanduo liofilizuojamas. Turimas sausas ekstraktas pasveriamas ir skaičiuojama ekstrakto išeiga lyginant su pradiniu mėginio kiekiu. Ekstraktai laikomi šaldiklyje iki tolimesnių eksperimentų.

Fermentacijai buvo naudojami vandeniniai mitybiniai tirpalai, todėl vandeninė ekstrakcija buvo atliekama panašiu į etanolinės ekstrakcijos principu. Mėginiai buvo keletą kartų filtruojami vakuumine filtracija, filtratai apjungiami ir nešami liofilizuoti. Gautas sausas ekstraktas pasveriamas ir apskaičiuojama ekstrakto išeiga lyginant su pradiniu mėginio kiekiu.

## **2.6. Antioksidacinio aktyvumo tyrimai**

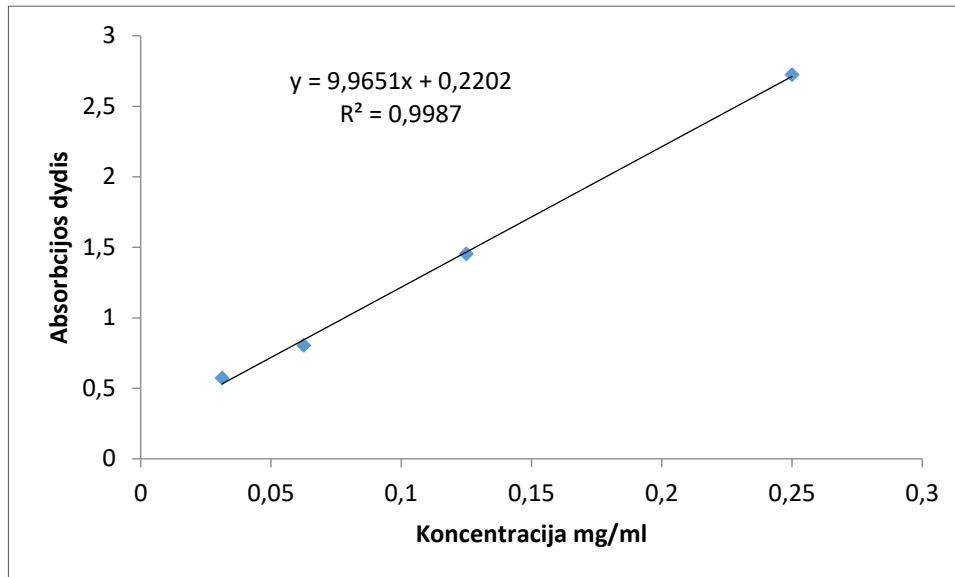
### **2.6.1. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas**

Iš turimų mėginių gaminami 1% koncentracijos tirpalai. Bandiniai buvo tirpinami metanolyje. Tirpumo savybėms pagerinti mėginiai buvo patalpinami į ultragarso kamerą.

Nustatant fenolinių junginių kiekį ekstraktuose sudaroma kalibracinė kreivė galo rūgščiai. Paruošiami standartiniai 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 mg/ml koncentracijos galo rūgšties tirpalai.

Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymui buvo daromi 3 matavimų pakartojimai. Tiriamasis mėginys gaminamas 0,1% koncentracijos (pagamintas motininis 1% koncentracijos tirpalas skiedžiamas 10 kartų). Nustatant absorbcijos reikšmes imta po 0,25 ml. Mėginio (kalibracinės kreivės sudarymui – kiekvienos koncentracijos galo rūgšties tirpalo), sumaišoma su 1,25 ml. paruoštu *Folin – Ciocalteu* reagentu ir 1 ml. 7,5% koncentracijos Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tirpalu. Po 30 min. išmatuojama tirpalų absorbcija spektrofotometru esant 765 nm. bangos ilgiui. Absorbcijos nulinis taškas išmatuojamas naudojant metanolį. Pagal gautas galo rūgšties absorbcijos reikšmes

yra nubraižoma kalibracinė kreivė (5 pav.). Bendras fenolinių junginių kiekis rezultatuose pateikiamas miligramais galo rūgšties ekvivalentų (GRE), tenkančių vienam gramui sausos ekstrakto masės (SM).



5 pav. Galo rūgšties kalibracinė kreivė bendram fenolinių junginių kiekiui nustatyti

### 2.6.2. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal DPPH• radikalų surišimo metodą

Violetinės spalvos DPPH• (2,2-difenil-1-pikrihidrazil hidrato) radikalai yra redukuojami antiradikaliniu aktyvumu pasižyminčių junginių į blankiai geltoną hidraziną. DPPH radikalų surišimo galia organinėje terpėje vertinama matuojant absorbcijos sumažėjimą esant fiksuotam bangos ilgiui – 515 nm.

Nustatinėjant antioksidacinį aktyvumą sudaroma kalibracinė kreivė troloksui ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchromano-2-karboksilinė rūgštis). Paruošiami standartiniai 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 mg/ml koncentracijos trolokso tirpalai.

Iš turimų mėginių gaminami 1% koncentracijos tirpalai. Antioksidacinio aktyvumo nustatymui kiekvienam mėginiui atliekami 3 matavimo pakartojimai. Nustatant absorbcijos reikšmes imama po 0,05 ml. mėginio (kalibracinės kreivės sudarymui – kiekvienos koncentracijos

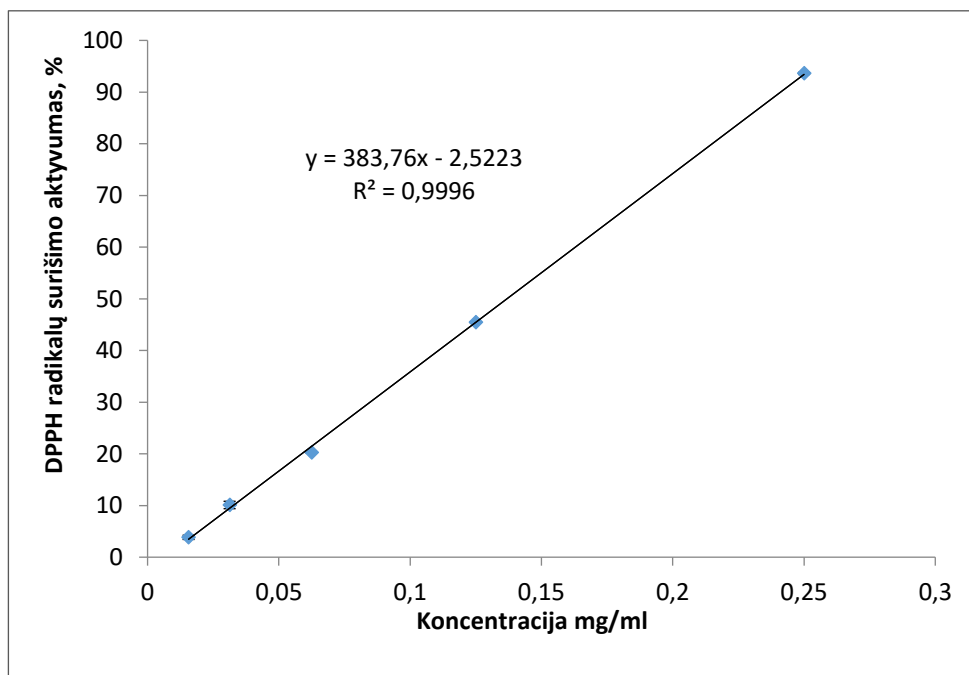
trokso tirpalo) ir sumaišoma su 2 ml. DPPH<sup>\*</sup> tirpalo. Po 45 min. išmatuojama mėginių absorbcija spektrofotometru esant 515 nm bangos ilgiui. Spektrofotometras nusikalibruojamas naudojant DPPH<sup>\*</sup> tirpalą, o absorbcijos nulinis taškas išmatuojamas naudojant metanolį. Pagal gautas trokso reikšmes paskaičiuojamas DPPH<sup>\*</sup> radikalų surišimo procentinis aktyvumas ir nubraižoma kalibracinė kreivė (6 pav.). Pagal gautą kalibracinės kreivės lygtį ir turimas ekstraktų išeigas, apskaičiuojamas antioksidacinis aktyvumas. Rezultatai išreiškiami kaip trokso ekvivalentai tenkantys vienam gramui sausos ekstrakto masės.

DPPH procentinė inhibicija apskaičiuojama pagal lygtį:

$$\% = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100, \text{ kai}$$

$A_B$  – tuščio mėginio absorbcija (pradinio DPPH<sup>\*</sup> tirpalo);

$A_A$  – tiriamojo mėginio absorbcija.



6 pav. Trokso kalibracinė kreivė antioksidaciniam aktyvumui nustatyti DPPH<sup>\*</sup> metodu

### 2.6.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal ABTS<sup>•+</sup> radikalų-katijonų surišimo metodą

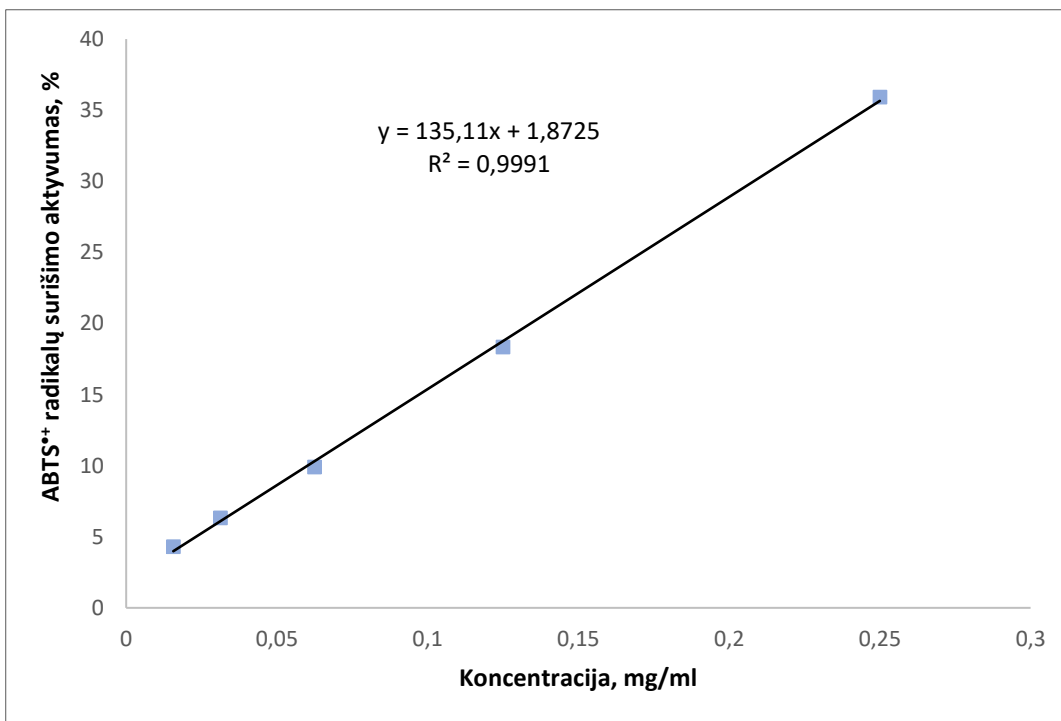
Tyrimas atliekamas analogiškai pagal DPPH<sup>•</sup> metodiką, tik nustatant absorbcijos reikšmes imama po 0,03 ml. mėginio ir pilama 3 ml. ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfo rūgštis)) reagento. Po 45 min. išmatuojama mėginių absorbcija esant 734 nm bangos ilgiui. Spektrofotometras nusikalibruojamas naudojant ABTS<sup>•+</sup> tirpalą, o absorbcijos nulinis taškas išmatuojamas naudojant reagento tirpiklį PBS (fosfatinį buferį).

ABTS<sup>•+</sup> inhibicija skaičiuojama analogiškai DPPH<sup>•</sup>:

$\% = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$ , kai

$A_B$  – tuščio mėginio absorbcija (pradinio ABTS<sup>•+</sup> tirpalo);

$A_A$  – tiriamojo mėginio absorbcija.



7 pav. Trolokso kalibracinė kreivė antioksidaciniam aktyvumui nustatyti ABTS<sup>•+</sup> metodu



## 2.7. Bendrojo antocianinų kiekio nustatymas pH diferenciniu metodu

Tyrimas atliktas remiantis Lee ir kt. (40). Metodas yra paremtas dviejų monomerinių antocianinų pigmentų grįžtamą spalvos pokyčiu varijuojant pH vertei. Spalvota pigmento oksonio forma dominuoja pH vertei esant 1.0, o nespalvota hemiketalio forma egzistuoja pH vertei esant 4.5. Pigmentų absorbcijų ties 520 nm. bangos ilgiu skirtumai yra proporcingi pigmento koncentracijai. Rezultatai yra išreiškiami kaip standartą naudojant cianidino-3-gliukozido pagrindą.

Yra pasigaminami dviejų pH verčių buferiai: pH=1.0 buferis – kalio chlorido 0,025 M koncentracijos tirpalas ir pH=4.5 buferis – natrio acetato 0,4 M koncentracijos tirpalas. Buferių pH vertės matuojamos pH-metru ir pervedamos iki norimos vertės naudojant druskos rūgšties tirpalą.

Naudojant pagamintus buferius, yra ruošiami tiriamųjų mėginių tirpalai – vienas su pH=1.0 buferiu ir vienas su pH=4.5 buferiu. Paruošus tirpalą su pH=1.0 buferiu yra nustatomas praskiedimo faktorius: jeigu reikia, atliekami atitinkami skiedimai kol spektrofotometro parodymai bangos ilgiui esant 520 nm. yra tarp 0,2 ir 1,4. Taip tiriamieji mėginiai buvo pagaminti 1,25 mg/ml koncentracijos. Po to yra matuojama tiriamųjų mėginių absorbcija bangos ilgius nustatant 520 nm. ir 700 nm.

Antocianinų pigmentų koncentracija išreiškiama cianidino-3-gliukozido ekvivalentais mg/L, vėliau konvertuojant į mg/1g ekstrakto ir yra apskaičiuojama pagal formulę:

$$\frac{A \cdot MW \cdot DF \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot l};$$

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH=1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH=4.5};$$

*MW* (angl. k. *molecular weight*) – cianidino-3-gliukozido molekulinė masė = 449,2 g/mol;

*DF* (angl. k. *dillution factor*) – praskiedimo faktorius (1);

*l* – spindulio skriejimo ilgis centimetrais (kiuvetes plotis) (1 cm.);

$\varepsilon$  – molinis ekstinkcijos koeficientas cianidino-3-gliukozidui (26 900);

$10^3$  – gramų konversijai į miligramus.

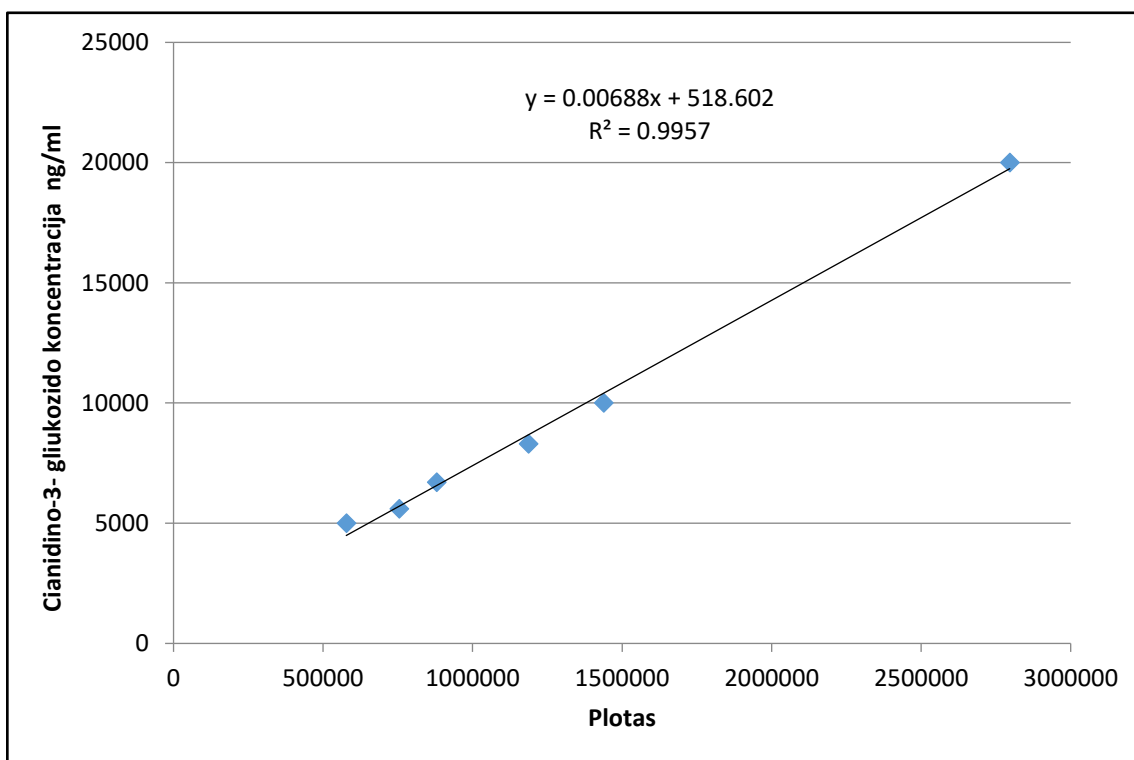
## **2.8. Antocianinų sudėties nustatymas efektyvios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos (ESCh-MS) metodu**

Antocianinų ekstrakcija buvo atliekama tokia eiga: buvo pasveriami 2 g išspaudų, kurios supilamos į plokščiadugnę kolbą. Ant išspaudų užpilama 20 ml, 0,1M koncentracijos druskos rūgštimi parūgštinto, metanolio/vandens (santykiu 1:1) tirpalo. Vykdoma mišinio ekstrakcija kolbą 5 min. įdėjus į ultragarso vonelę ir po to 30 min. intensyviai maišant magnetine maišykle (90 aps/min). Gauta ištrauka filtruojama per popierinį filtrą ir 5 min. dedama centrifuguoti 2200 aps/min greičiu. Liekanos ekstrakcija kartojama taip pat dar 2 kartus. Gautas supernatantas apjungiamas ir dedamas sukonzentruoti rotaciniame garintuve (25 °C temp.). Gavus koncentruotą mišinį, supilama į 25 ml matavimo kolbutę ir mišinys praskiedžiamas parūgštintu metanoliumi iki žymės. Mišinys nufiltruojamas svirkštu ir supilamas į gintarinės spalvos buteliukus saugojimui. Iki naudojimo gauti ekstraktai patalpinami į šaldiklį. Prieš atliekant chromatografinę analizę, paimamas 1 ml ekstrakto ir supilamas į kitą buteliuką, kuris nešamas garinimui azoto dujomis, siekiant išgryninti turimą ekstraktą. Atlikus išgarinimą, ekstraktas praskiedžiamas chromatografinio grynumo metanoliumi ir filtruojamas į chromatografinius buteliukus.

ESCh-MS chromatografinė analizė buvo atliekama remiantis *Waters Acquity* sistema, sujungus ją su hibridiniu kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru. Buvo naudojama atvirkščių fazių analitinė kolonėlė, kurioje palaikoma 40 °C temperatūra. Sorbento dalelių dydis – 1,7 μm. Eliuentų sistema buvo sudaryta iš (A) – 1% koncentracijos skruzdžių rūgšties ir (B) – 100 % acetonitrilo. Eliucijos trukmė – 17 min, įleidžiamo mėginio tūris – 2 μl. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius veikė neigiamos elektrinės jonizacijos režimu.

Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal standartinių junginių masių spektrus, tokias pat eliucijos trukmes bei remiantis literatūros duomenimis.

Kiekybinė analizė buvo atlikta naudojant turimą komercinį cianidino-3-gliukozido standartą. Buvo gaminami standartiniai 5000, 5600, 6700, 8300, 10000 ir 20000 ng/ml koncentracijų tirpalai ir pagal gautus chromatografinius plotus braižoma kalibracinė kreivė pagal cianidino-3-gliukozidą (8 pav.). Identifikuotų junginių koncentracija apskaičiuojama naudojant kalibracinės kreivės lygtį bei remiantis tiriamojo mėginio naudota mase bei išeiga.



8 pav. Cianidino-3-gliukozido kalibracinė kreivė

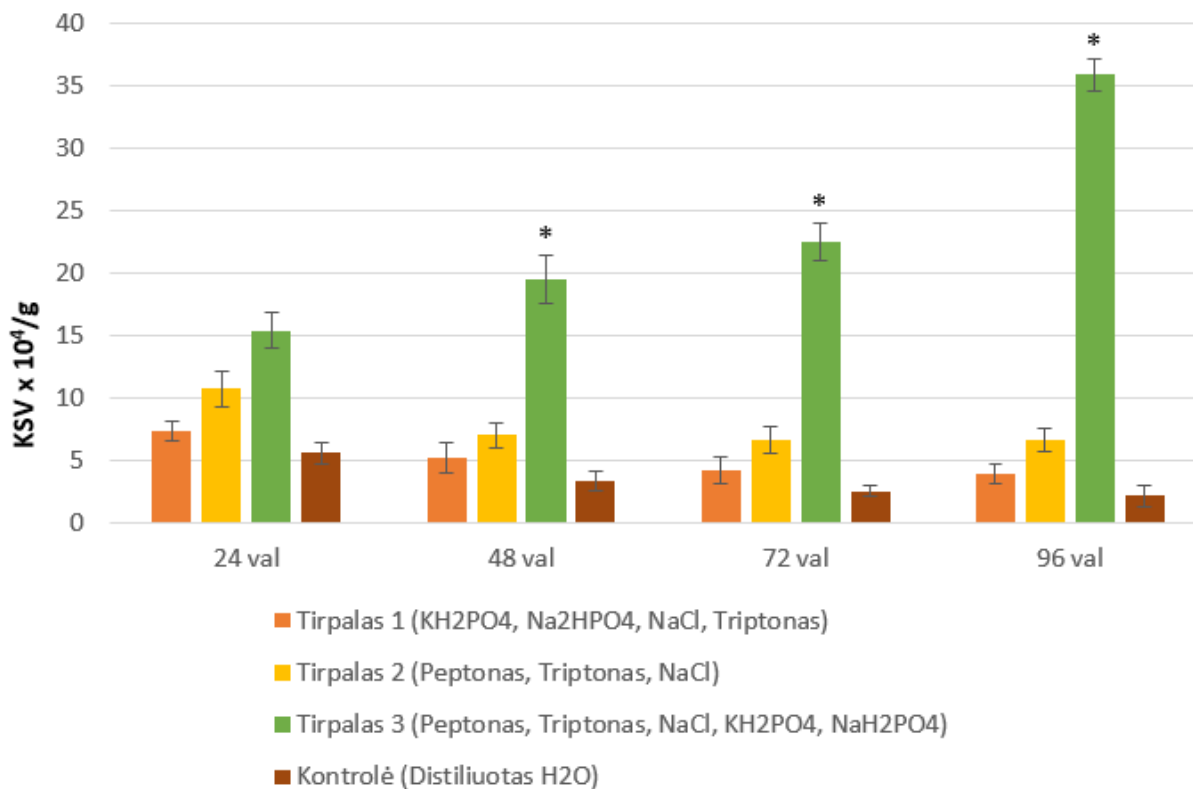
## 2.9. Statistinė analizė

Kiekvienam eksperimentui buvo skiriami 3 pakartojimai, diagramose pateikiant vidurkius ir vidutines standartines paklaidas, apskaičiuotus Microsoft Excel 2013 kompiuterine programa. Patikimumai skaičiuoti SigmaPlot 11.0 kompiuterine programa, taikant Stjudento t-testą nepriklausomoms imtims. Statistiškai patikimas skirtumas tarp lyginamų vidurkių buvo laikomas, kai  $p \leq 0,05$ .

### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Kietafazės fermentacijos sąlygų optimizavimo rezultatai

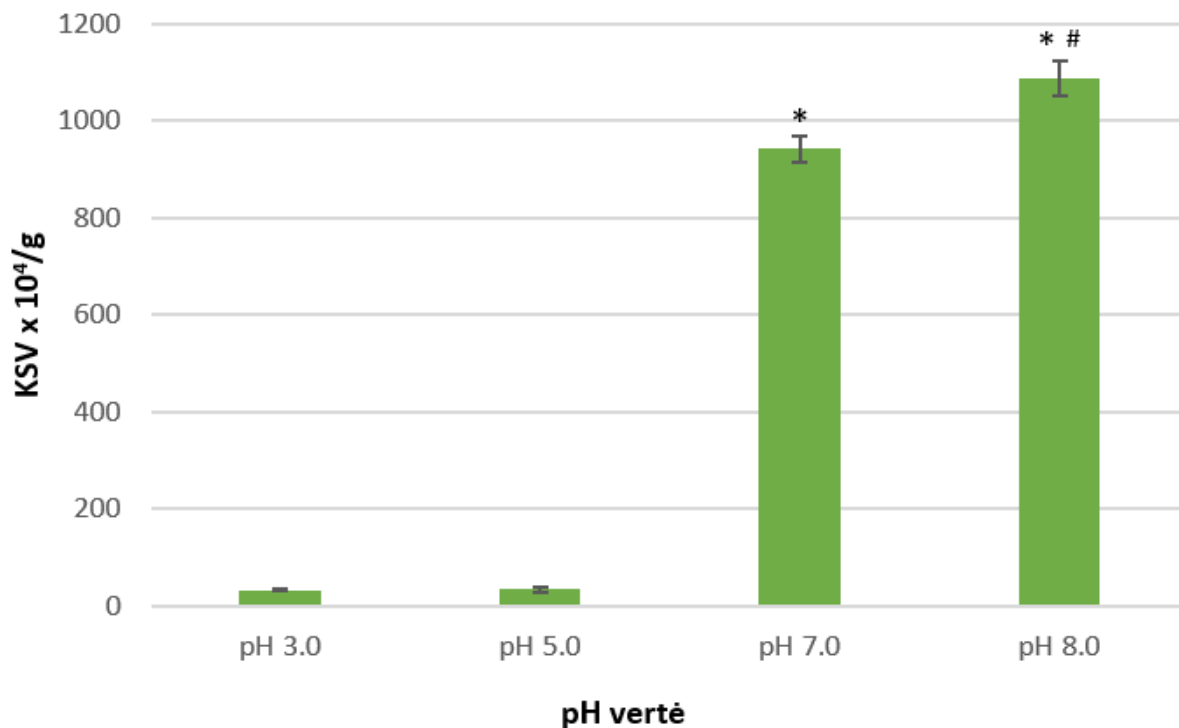
##### 3.1.1. *B.megaterium* augimo priklausomybė nuo mitybinių faktorių



9 pav. Bakterinio augimo priklausomybė nuo mitybinių faktorių

Eksperimentas parodė, jog *B.megaterium* kultūra augo tik su **Tirpalu 3** (g/l: 5 Peptono, 5 Triptono, 5 NaCl, 9 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Naudojant šią mitybinę terpę buvo stebimas eksponentinis bakterinis augimas visą fermentacijos periodą. Buvo stebimas statistiškai reikšmingas skirtumas po 48, 72 ir 96 val., lyginant su kitomis terpėmis ir kontrole. Remiantis gautais rezultatais, buvo nutarta eksperimentus tęsti naudojant būtent šią terpę. Fermentacinio periodo pabaigoje bakterinis skaičius išaugo iki  $35,82 \times 10^4$  KSV, tačiau tokia reikšmė dar buvo per maža, jog tai būtų galima vadinti sėkminga fermentacija, todėl pasirinkta toliau tirti kitus faktorius. (8 pav. \* - statistiškai patikimas skirtumas, lyginant su kitais tirpalais ir kontrole, kai  $p \leq 0,05$ )

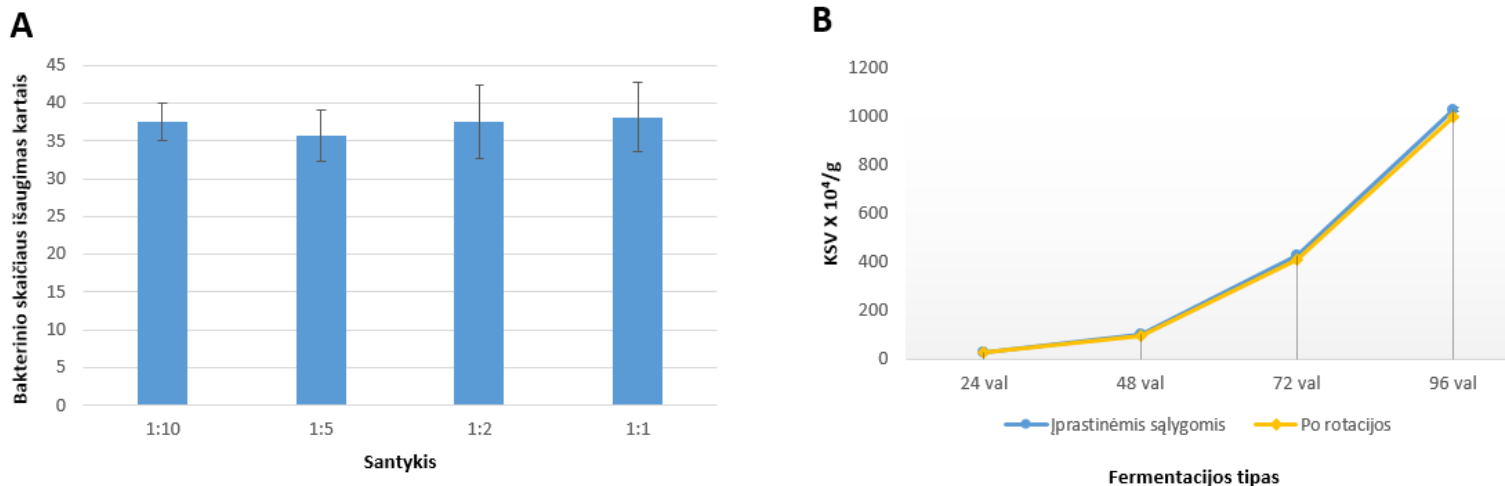
### 3.1.2. *B.megaterium* augimo priklausomybė nuo pH vertės terpėje



10 pav. Bakterinio augimo priklausomybė nuo pH vertės terpėje

Priklausomybės nuo pH tyrimas (9 pav.) parodė, jog aronijų išspaudose *B.megaterium* bakterinė kultūra geriausiai augo terpės pH vertei esant neutraliai arba lengvai šarminei. Terpėje su pH=7.0 bakterijų skaičius išaugo iki  $942,22 \times 10^4$  KSV po fermentacinio periodo, o terpėje su **pH=8.0** – iki  $1088 \times 10^4$  KSV. Buvo stebimas statistiškai reikšmingas bakterinio augimo skirtumas pH vertėms esant 7.0 ir 8.0, lyginant su rūgštinėmis pH vertėmis. Taip pat, *B. megaterium* KSV skaičius pH=8.0 terpėje statistiškai reikšmingai skirėsi sulyginus su pH=7.0 terpės skaičiumi. Dar labiau padidinus pH vertę, tai yra, šarminant terpę, lėmė bakterinio skaičiaus nukritimą iki 0. Rezultatai sutampa su literatūroje esančiais duomenimis, teigiančiais, jog *Bacillus* gentis geriausiai auga pH vertei esant 7.0-8.0. Tolimesnei tyrimų eigai buvo pasirinkta pH priedinėti iki 8.0 vertės. (9 pav. \* - statistiškai patikimas skirtumas, lyginant su pH=3.0 ir pH=5.0, kai  $p \leq 0,05$ ; # - statistiškai patikimas skirtumas, lyginant su pH=7.0, kai  $p \leq 0,05$ )

### 3.1.3. Priklausomybė nuo substrato ir bakterinio inokulumo tūrinio santykio bei rotacijos

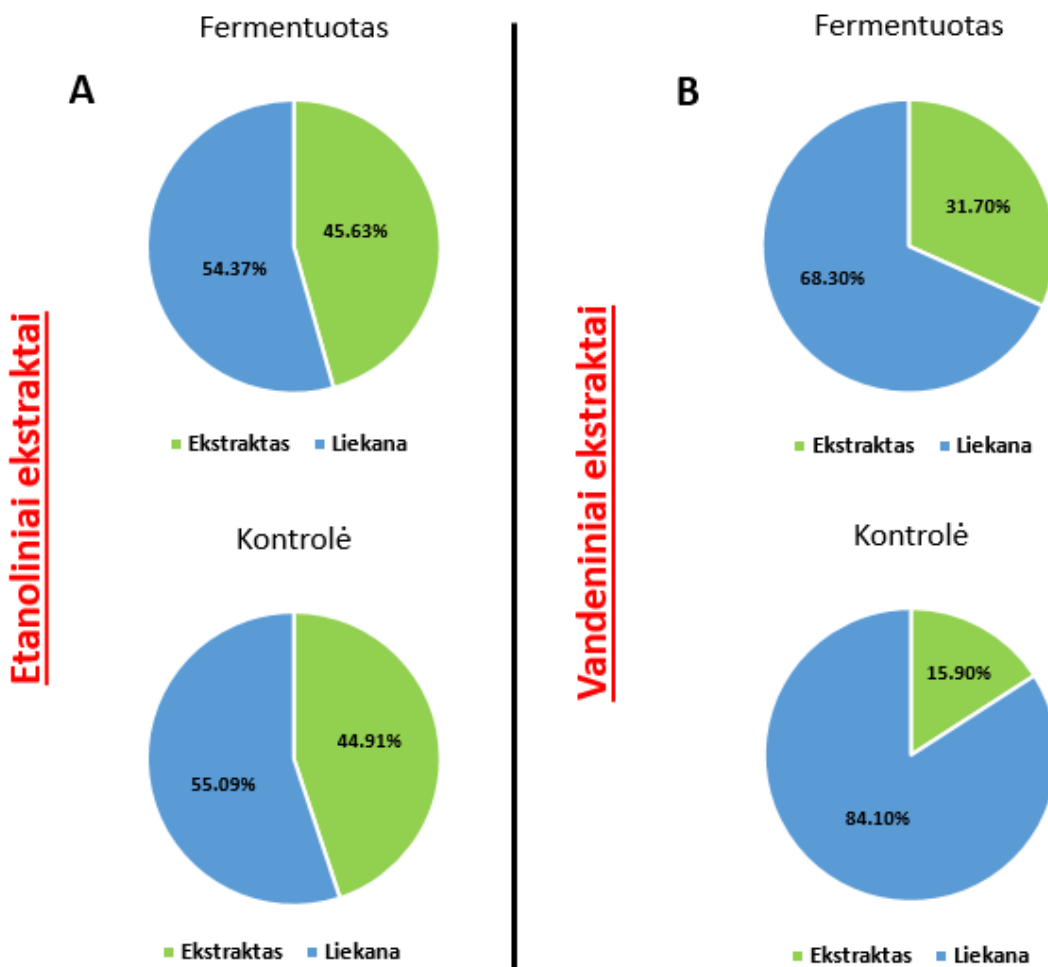


**11 pav.** Bakterinio augimo priklausomybė nuo tūrinio substrato ir bakterinio inokulumo santykio (A) ir rotacijos (B)

Rezultatai tiriant *B. megaterium* augimo priklausomybę nuo substrato ir inokulumo tūrinio santykio (10 pav. A) parodė, jog santykinis skirtumas neturi įtakos bakteriniam augimui. Po fermentacinio periodo (96 val.) visų tiriamųjų mėginiuose bakterinis skaičius išaugo vidutiniškai 37 kartus, statistiškai reikšmingo skirtumo tarp mėginių nebuvo.

Rotacijos tyrimo rezultatai (10 pav. B) taip pat neparodė statistiškai reikšmingo skirtumo tarp mėginių, buvusių ant rotacinės purtyklės, bei įprastomis sąlygomis, t.y. termostate inkubuotų, fermentuotų mėginių. Remiantis nauja literatūra (20), rotacija turėtų padidinti substrato homogeniškumą ir geresnę deguonies perdavimą mikroorganizmui, tačiau šiuo atveju šie efektai rezultatuose neatsispindėjo.

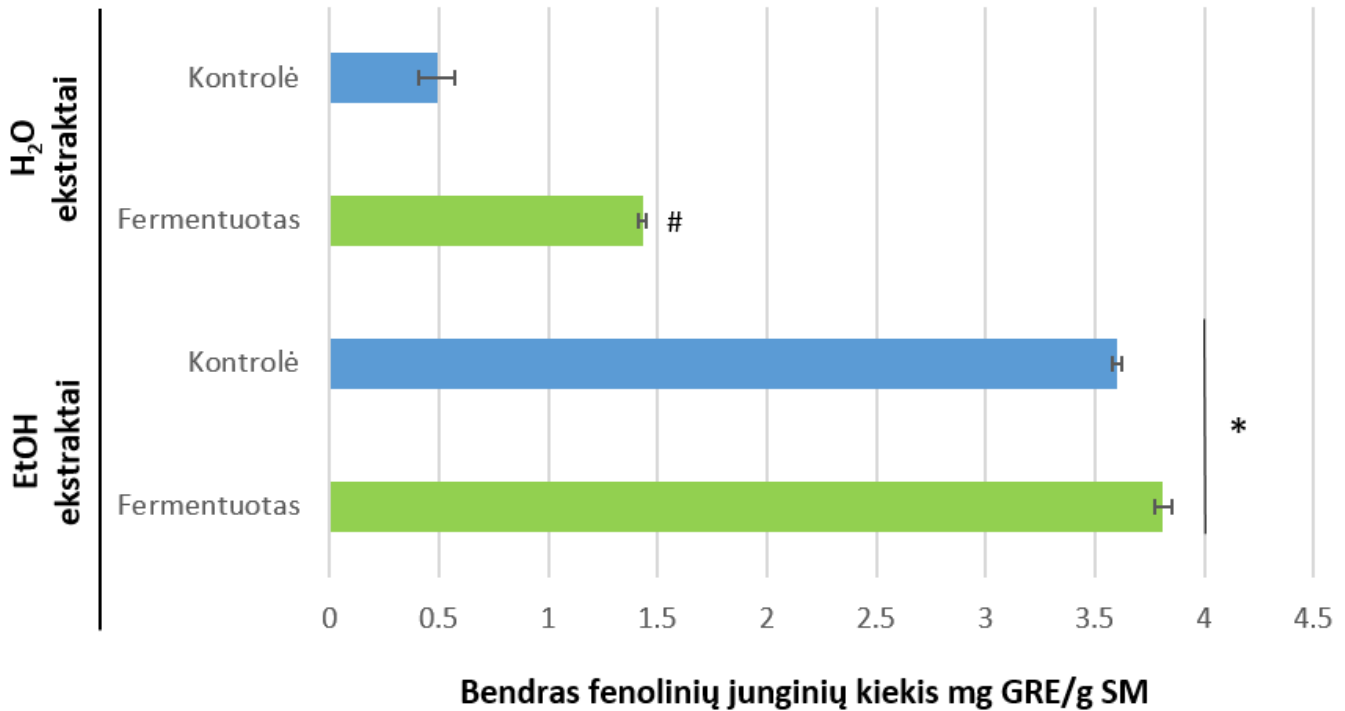
### 3.2. Kietafazės fermentacijos įtaka ekstraktų išeigoms



12 pav. Kietafazės fermentacijos įtaka etanolinių (A) ir vandeninių (B) ekstraktų išeigoms

Įvykdžius aronijų išspaudų kietfazę fermentaciją buvo atliekamos etanolinė ir vandeninė ekstrakcijos bei apskaičiuojamos ekstraktų išeigos. Etanolinės ekstrakcijos rezultatai (11 pav. A) parodė, jog kietfazę fermentacija įtakos ekstrakto išeigai neturėjo – fermentuoto ir kontrolinio mėginio ekstraktų išeigos buvo apie 45%, lyginant su pradine substrato mase. Atlikus vandeninę ekstrakciją, fermentuoto mėginio ekstrakto išeiga buvo beveik dvigubai didesnė nei kontrolinio (11 pav. B). Tokį rezultatą būtų galima sieti su literatūroje aptariamu *Bacillus* genties potencialu kietfazėje fermentacijoje (29,31,39), kai eksperimentiniai modeliai taip pat yra paremti vandenine ekstrakcija ir galutinio produkto praturtinimu fermentais.

### 3.3. Bendras fenolinių junginių kiekis ekstraktuose



13 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis ekstraktuose po fermentacijos, išreikštas mg. galo rūgšties ekvivalentais (GRE) vienam gramui ekstrakto sausos masės (SM)

3.1. lentelė. Bendrojo fenolinių junginių kiekio parodymai mg GRE/g SM; RSD – vidutinė standartinė paklaida

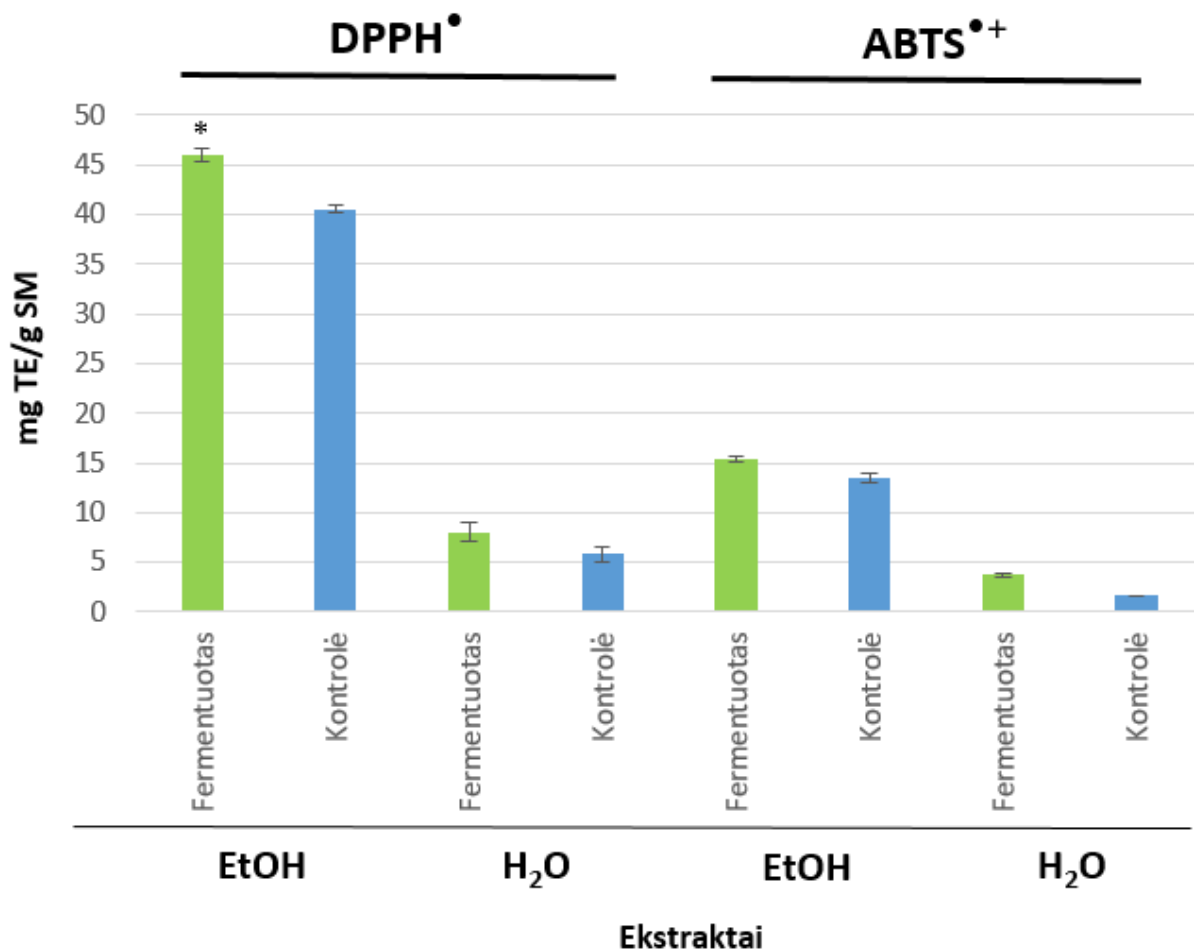
mg GRE/g SM ± RSD			
EtOH		H <sub>2</sub> O	
Fermentuotas	Kontrolė	Fermentuotas	Kontrolė
3.81±0.04	3.6±0.02	1.43±0.018	0.49±0.08

Atlikus bendrojo fenolinių junginių kiekio tyrimą paaiškėjo, jog etanoliniuose ekstraktuose junginių kiekis buvo nuo 3 iki 6 kartų didesnis nei vandeniniuose ekstraktuose. Kietafazė fermentacija fenolinių junginių kiekiui etanoliniuose ekstraktuose įtakos neturėjo – ir



fermentuotame, ir kontroliniame mėginiuose buvo apie 3,5 mg. GRE/g. ekstrakto sausos masės. Tuo tarpu vandeniniuose ekstraktuose, fermentuotame mėginyje buvo beveik 3 kartus daugiau fenolinių junginių. (12 pav. \* - statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su vandeniniais ekstraktais, kai  $p \leq 0,05$ ; # - statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontroliniu mėginiu, kai  $p \leq 0,05$ ).

### 3.4. Antioksidacinio aktyvumo rezultatai



**14 pav.** Tiriamųjų mėginių antioksidacinio aktyvumo parodymai, naudojant DPPH• ir ABTS•+ radikalų surišimo metodus. Rezultatai išreikšti mg. trolokso ekvivalentais (TE) vienam gramui ekstrakto sausos masės (SM)

**3.2. lentelė.** Antioksidacinio aktyvumo parodymai mg TE/g SM; RSD-vidutinė standartinė paklaida

mg TE/g SM±RSD							
DPPH				ABTS <sup>•+</sup>			
EtOH		H <sub>2</sub> O		EtOH		H <sub>2</sub> O	
Fermentuotas	Kontrolė	Fermentuotas	Kontrolė	Fermentuotas	Kontrolė	Fermentuotas	Kontrolė
46.08±0.68	40.55±0.42	8.06±0.88	5.8±0.74	15.36±0.23	13.44±0.46	3.78±0.2	1.64±0.054

Abiejų metodų rezultatai parodė, jog etanolinių ekstraktų antioksidacinis potencialas yra keletą kartų didesnis. Visuose fermentuotuose mėginiuose antioksidacinis aktyvumas buvo didesnis už kontrolinių mėginių. Ekstraktai DPPH<sup>•</sup> radikalą surišinėjo geriau, o etanolinis ekstraktas po kietafazės fermentacijos DPPH modelinėje sistemoje turėjo didžiausią radikalo surišimo gebą (46,08±0,68 mg. TE/g. ekstrakto SM). Šis rezultatas statistiškai reikšmingai skirėsi nuo kontrolinio mėginio etanolinio ekstrakto, todėl galima teigti, jog aronijų išspaudų kietafazė fermentacija naudojant *B.megaterium* padidina substrato radikalų surišimo gebą ir antioksidacinį aktyvumą visumoje. (13 pav. \* - statistiškai patikimas skirtumas, lyginant su kontroliniu etanoliniu ekstraktu, kai  $p \leq 0,05$ ). Rezultatai iš dalies sutampa su Dulf ir kt. (19) atlikto tyrimo rezultatais, kai kietafazė fermentacija, naudojant *Aspergillus niger* ir *Rhizopus oligosporus* padermes, padidino aronijų išspaudų antioksidacinį aktyvumą bei praturtino substrato biologiškai aktyvių medžiagų kompoziciją.

### 3.5. Bendrasis antocianinų kiekis

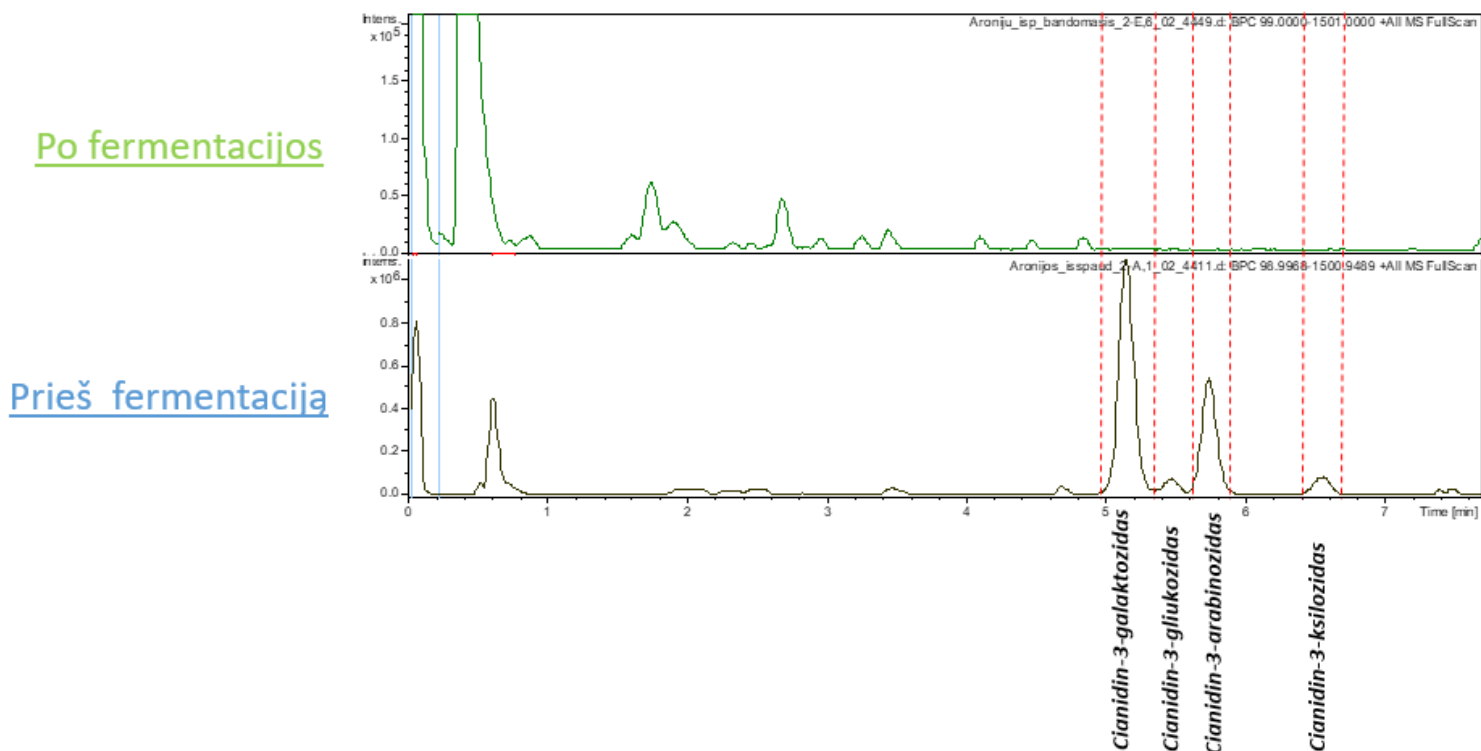
Remiantis antioksidacinio aktyvumo parodymais bei literatūros duomenims ir atliktų eksperimentų rekomenduojama metodika, nuspręsta tolimesniems antocianinų tyrimo eksperimentams naudoti tik etanolinius ekstraktus.

3.3. lentelė. Bendrojo antocianinų kiekio tyrimo parodymai

	Spektrofotometriniai parodymai				A	Rezultatai (mg cianidino-3-gliukozido ekvivalentais/g ekstrakto)
	pH=1.0		pH=4.5			
	520 nm	700 nm	520 nm	700 nm		
<b>Kontrolė</b>	0.381	0.198	0.326	0.16	0.017	7.849 mg/g
<b>Fermentuotas</b>	0.357	0.175	0.408	0.232	0.006	0.284 mg/g

Apskaičiavus bendrąjį antocianinų kiekį kontrolėje buvo gauta 7,849 mg., o fermentuotame mėginyje – 0,284 mg. cianido-3-gliukozido ekvivalentų vienam gramui ekstrakto. Tyrimo rezultatai atspindi tai, jog kietafazė aronijų išspaudų fermentacija lemia bendro antocianinų kiekio sumažėjimą beveik iki neaptinkamo lygio (3.1. lentelė). Dulf ir kt. (19) aptaria tokį patį kietafazės fermentacijos efektą aronijų išspaudoms naudojant filamentinių mikroskopinių grybų kultūras.

### 3.6. Antocianinų identifikavimas



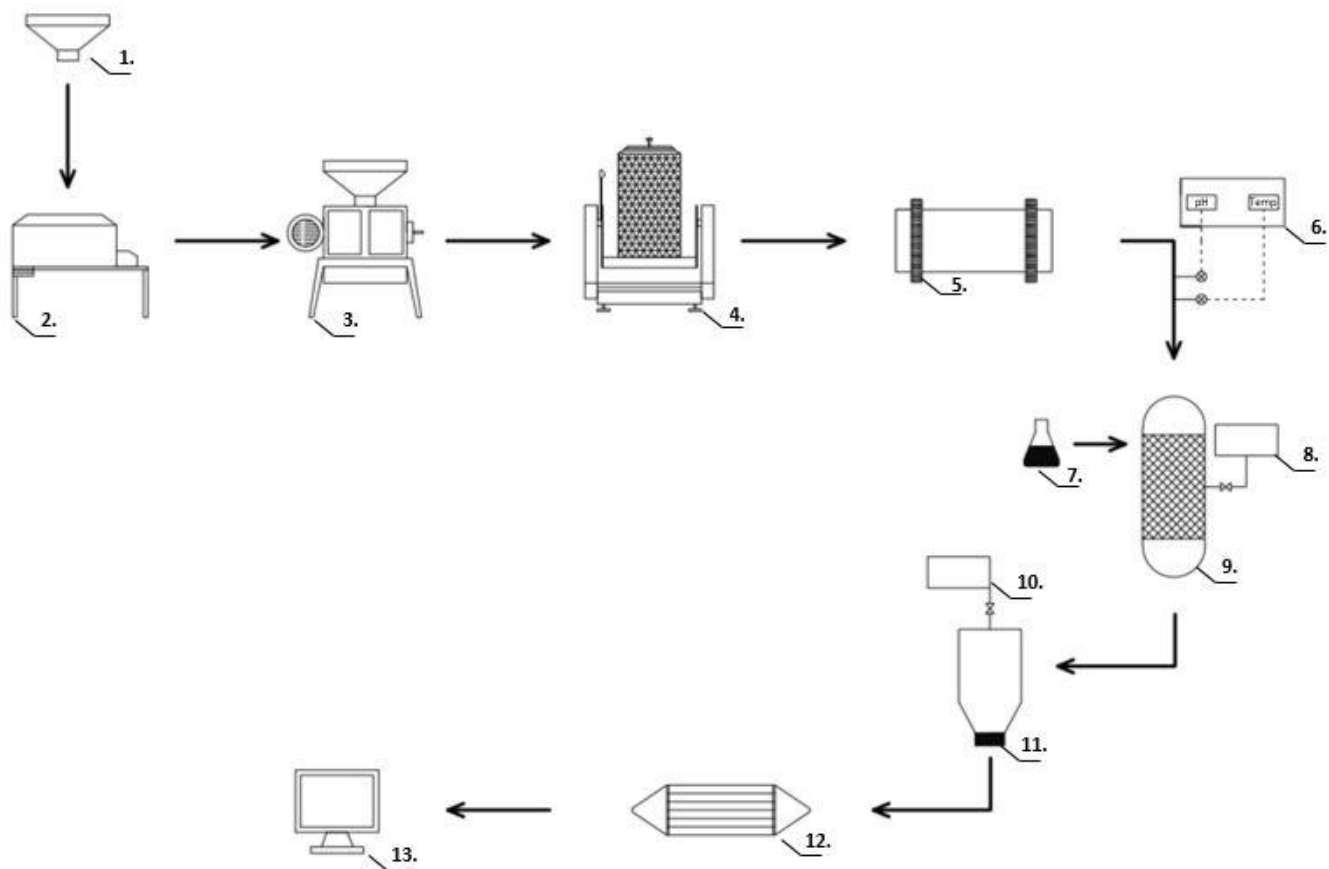
**15 pav.** ESCh-MS gautos chromatogramos, reprezentuojančios antocianinų aptikimą aronijų išspaudose prieš ir po kietafazės fermentacijos.

Atlikus antocianinų identifikacijos ESCh-MS tyrimą, aronijų išspaudose prieš kietafazę fermentaciją identifiukuoti 4 antocianinai (3.4. lentelė) – cianidin-3-galaktozidas ( $27.676 \pm 3.87$  mg/g SM), cianidin-3-gliukozidas (2.391 mg/g SM), cianidin-3-arabinozidas ( $13.017 \pm 2.74$  mg/g SM) ir cianidin-3-ksilozidas ( $2.595 \pm 0.61$  mg/g SM). Junginių charakterizavimas buvo atliekamas remiantis moksline literatūra bei katedroje jau atliktais moksliniais tyrimais (12). Praleidus ekstraktą po kietafazės fermentacijos paaiškėjo, jog kietafazė fermentacija antocianinų kiekį aronijų išspaudose sumažina iki nedetektuojamo lygio. Šie rezultatai taip pat sutampa su Dulf ir kt. (19) atlikta aronijų išspaudų kietafaze fermentacija ir gautų produktų charakteristikomis.

**3.4. lentelė.** *Identifikuotų junginių aronijų išspaudose prieš fermentaciją charakteristikos; RSD – vidutinė standartinė paklaida*

<b>Junginys</b>	<b>Formulė</b>	<b>Sulaikymo trukmė, min</b>	<b>Molekulinė masė, <i>m/z</i></b>	<b>Kiekis mg/100g SM±RSD</b>
Cianidin-3-galaktozidas	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	5.2	449.1083	69.191±9.682
Cianidin-3-gliukozidas	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	5.4	449.1076	5.979±1.162
Cianidin-3-arabinozidas	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	5.8	419.0974	32.545±6.856
Cianidin-3-ksilozidas	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	6.5	419.0971	6.489±1.513

#### 4. REKOMENDACIJŲ DALIS



**16 pav.** Rekomenduojama principinė aronijų išspaudų apdirbimo kietafaze fermentacija technologinė schema

Juodavaisių aronijų uogos iš rezervuaro [1] patenka į plovimo bei atrinkimo sistemą [2]. Iš ten, uogos keliauja į smulkinimo aparatą [3], iš kurio susmulkintos patenka į sulčių spaudimo sistemą [4]. Iš smulkintų uogų išspaudus sultis, lieka didelis kiekis išspaudų, kurios talpinamos į smulkinimo ir džiovinimo sistemą [5], iš kurios patenka tiesiai į bioreaktorių [9]. Prieš patenkant į bioreaktorių, valdymo blokas [6] reguliuoja išspaudų pH ir temperatūrą. Į bioreaktorių tiekiamas *B.megaterium* bakterinis inokulumas [7] ir iš rezervuaro [8] yra paduodamos mitybinės medžiagos. Bioreaktoriuje atlikus kieatafazę fermentaciją, medžiagos

yra tiekiamos į ekstrakcijos sistemą [11], į kurią iš rezervuaro [10] yra paduodamas pastovus kiekis etanolio, reikalingo ekstrakcijai atlikti. Gautas ekstraktas paduodamas į etanolio bei vandens išgarinimo rotacinę sistemą [12]. Gauta sauso ekstrakto savybės toliau yra tiriamos sukurtose modelinėse sistemose [13].

Tai yra rekomenduojama principinė technologinė schema, kuri nubraižyta remiantis projekto eksperimentine eiga bei gautais rezultatais ir padarytomis išvadomis. Industriniame lygmenyje, pasiekus didelį aronijų išspaudų praturtinimą bioaktyviomis medžiagomis naudojant kietafazę fermentaciją, technologinė schema galėtų būti praplečiama iki papildų ar kito vartojamo produkto gamybos lygmens.

## IŠVADOS

1. Kietafazės fermentacijos sąlygų optimizavimo tyrimas parodė, jog *B.megaterium* bakterinis augimas aronijų išspaudose tiesiogiai priklauso nuo naudojamų mitybinių medžiagų ir pH vertės terpėje.
2. Kietafazė fermentacija padidina aronijų išspaudų vandeninės, bet ne etanolinės ekstrakcijos išėigos dydį.
3. Kietafazė fermentacija tris kartus padidina bendrąjį fenolinių junginių kiekį vandeniniuose aronijų išspaudų ekstraktuose. Etanoliniuose ekstraktuose bendrasis fenolinių junginių kiekis yra apie 5 kartus didesnis nei vandeniniuose ekstraktuose, tačiau kietafazė fermentacija reikšmingos įtakos tam neturi.
4. Kietafazė fermentacija padidina etanolinių aronijų išspaudų ekstraktų antioksidacinį potencialą. Vandeninių ekstraktų radikalų surišimo geba yra maža ir kietafazė fermentacija tam tiesioginės įtakos neturi.
5. Kietafazė fermentacija, naudojant *B.megaterium*, aronijų išspaudose antocianinų kiekį sumažina iki beveik neaptinkamo lygio. Šis efektas buvo identifikuotas ir pH diferenciniu, ir ESCh-MS metodais.

3, 4 ir 5 išvados iš dalies sutampa su jau esama literatūra, kurioje analizuojamas kietafazės fermentacijos įtaka aronijų išspaudoms (19).

Apibendrinant galima teigti, jog, optimizavus augimo sąlygas, *B.megaterium* bakterijos yra tinkama mikroflora juodavaisių aronijų išspaudų kietafazei fermentacijai atlikti. Projekto metu gauti rezultatai parodė nežymius skirtumus, todėl negalima drąsiai teigti, jog kietafazė fermentacija reikšmingai praturtina aronijų išspaudas bioaktyviais junginiais. Tačiau tai įrodo kietafazės fermentacijos, kaip modelinės sistemos, potencialą ir ryškesni pokyčiai galimai galėtų būti stebimi pritaikius šį metodą industriniame lygmenyje.



## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Duffy VB, Rawal S, Park J, Brand MH, Sharafi M, Bolling BW. Characterizing and improving the sensory and hedonic responses to polyphenol-rich aronia berry juice. *Appetite*. 2016;107:116–25.
2. Veberic R, Slatnar A, Bizjak J, Stampar F, Mikulic-Petkovsek M. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT - Food Sci Technol*. 2015;60(1):509–17.
3. Vagiri M, Jensen M. Influence of juice processing factors on quality of black chokeberry pomace as a future resource for colour extraction. *Food Chem*. 2017;217:409–17.
4. Thomas L, Larroche C, Pandey A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J*. 2013;81:146–61.
5. Kuhad RC, Deswal D, Sharma S, Bhattacharya A, Jain KK, Kaur A, et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renew Sustain Energy Rev*. 2016;55:249–72.
6. Yoon LW, Ang TN, Ngoh GC, Chua ASM. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*. 2014;67:319–38.
7. Farinas CS. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renew Sustain Energy Rev*. 2015;52:179–88.
8. Kulling SE, Rawel HM. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med*. 2008;74(13):1625–34.
9. Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M. Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *J Med Food*. 2010;13(2):255–

69.

10. Denev PN, Kratchanov CG, Ciz M, Lojek A, Kratchanova MG. Bioavailability and Antioxidant Activity of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Polyphenols: In vitro and in vivo Evidences and Possible Mechanisms of Action: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2012;11(5):471–89.
11. Kitrytė V, Kraujalienė V, Šulniūtė V, Pukalskas A, Venskutonis PR. Chokeberry pomace valorization into food ingredients by enzyme-assisted extraction: Process optimization and product characterization. *Food Bioprod Process.* 2017;105:36–50.
12. Grunovaite L, Pukalskiene M, Pukalskas A, Venskutonis PR. Fractionation of black chokeberry pomace into functional ingredients using high pressure extraction methods and evaluation of their antioxidant capacity and chemical composition. *J Funct Foods.* 2016;24:85–96.
13. Mcdougall GJ, Austin C, Van Schayk E, Martin P. Salal (*Gaultheria shallon*) and aronia (*Aronia melanocarpa*) fruits from Orkney: Phenolic content, composition and effect of wine-making. *Food Chem.* 2016;205:239–47.
14. Cebova M, Klimentova J, Janega P, Pechanova O. Effect of Bioactive Compound of *Aronia melanocarpa* on Cardiovascular System in Experimental Hypertension. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017.
15. Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, et al. Fruits of black chokeberry *aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases. *Molecules.* 2017;22(6):1–23.
16. Stanisavljević N, Samardžić J, Janković T, Šavikin K, Mojsin M, Topalović V, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during in vitro simulated digestion in the presence of food matrix. *Food Chem.* 2015;175:516–22.
17. Lee KP, Choi NH, Kim HS, Ahn S, Park IS, Lee DW. Anti-neuroinflammatory effects of

- ethanolic extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) in lipopolysaccharide-stimulated BV2 cells and ICR mice. *Nutr Res Pract.* 2018;12(1):13–9.
18. Tomić M, Ignjatović Đ, Tovilović-Kovačević G, Krstić-Milošević D, Ranković S, Popović T, et al. Reduction of anxiety-like and depression-like behaviors in rats after one month of drinking: *Aronia melanocarpa* berry juice. *Food Funct.* 2016;7(7):3111–20.
  19. Dulf FV, Vodnar DC, Dulf EH, Diaconeasa Z, Socaciu C. Liberation and recovery of phenolic antioxidants and lipids in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace by solid-state bioprocessing using *Aspergillus niger* and *Rhizopus oligosporus* strains. *LWT - Food Sci Technol.* 2018;87:241–9.
  20. Soccol CR, Costa ESF da, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LP de S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol Res Innov.* 2017;1(1):52–71.
  21. Nagel FJJI, Tramper J, Bakker MSN, Rinzema A. Model for on-line moisture-content control during solid-state fermentation. *Biotechnol Bioeng.* 2001;72(2):231–43.
  22. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* 2000;35(10):1153–69.
  23. Krishna C. Solid-state fermentation systems - An overview. *Crit Rev Biotechnol.* 2005;25(1–2):1–30.
  24. Gowthaman MK, Krishna C, Moo-Young M. Fungal solid state fermentation - an overview. *Appl Mycol Biotechnol.* 2001;1(C):305–52.
  25. Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gomez S de J, Díaz-Godínez G, Augur C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J.* 2003;13(2–3):157–67.
  26. Hu Y, Du C, Leu SY, Jing H, Li X, Lin CSK. Valorisation of textile waste by fungal solid

- state fermentation: An example of circular waste-based biorefinery. *Resour Conserv Recycl.* 2018;129(September 2017):27–35.
27. Oliveira F, Moreira C, Salgado JM, Abrunhosa L, Venâncio A, Belo I. Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state fermentation. *J Sci Food Agric.* 2016;96(10):3583–9.
  28. Ballardo C, Abraham J, Barrena R, Artola A, Gea T, Sánchez A. Valorization of soy waste through SSF for the production of compost enriched with *Bacillus thuringiensis* with biopesticide properties. *J Environ Manage.* 2016;169:126–31.
  29. Kaur SJ, Gupta VK. Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. *Ann Microbiol.* 2017;67(4):333–42.
  30. Slivinski CT, Mallmann E, De Araújo JM, Mitchell DA, Krieger N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochem.* 2012;47(12):1848–55.
  31. Abdel-fattah YR, Soliman NA, El-toukhy NM, El-gendi H, Ahmed RS. Production , Purification , and c haracterization of Thermostable -Amylase Produced by *Bacillus licheniformis* Isolate AI20. *J Chem.* 2013;2013:11.
  32. González EA, Agrasar AT, Castro LMP, Fernández IO, Guerra NP. Solid-state fermentation of red raspberry (*Rubus ideaus* L.) and arbutus berry (*Arbutus unedo*, L.) and characterization of their distillates. *Food Res Int.* 2011;44(5):1419–26.
  33. Bhanja Dey T, Chakraborty S, Jain KK, Sharma A, Kuhad RC. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2016;53:60–74.
  34. Robinson T, Singh D, Nigam P. Solid-state fermentation: A promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotechnol.*

- 2001;55(3):284–9.
35. Fekete T. *Bacillus* species (not anthracis). *Clin Microbiol Newsl.* 2009;31(12):87–92.
  36. Cote CK, Heffron JD, Bozue JA, Welkos SL. *Bacillus anthracis and Other Bacillus Species*. Vol. 3, *Molecular Medical Microbiology: Second Edition*. Elsevier Ltd; 2014. 1789-1844 p.
  37. Nalini S, Parthasarathi R, Prabudoss V. Production and characterization of lipopeptide from *Bacillus cereus* SNAU01 under solid state fermentation and its potential application as anti-biofilm agent. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2016;5:123–32.
  38. Ramesh M V, Lonsane BK, Iary SI. M.V. Ramesh and B.K. Lonsane. 1987;9(5):323–8.
  39. Sindhu I, Chhibber S, Capalash N, Sharma P. Production of cellulase-free xylanase from *Bacillus megaterium* by solid state fermentation for biobleaching of pulp. *Curr Microbiol.* 2006;53(2):167–72.
  40. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J AOAC Int.* 2005;88(5):1269–78.

## **PRIEDAS**

### **Padėka**

Norėčiau padėkoti savo baigiamojo projekto vadovui prof. Petrui Rimantui Venskutoniui už suteiktą galimybę atlikti šį darbą. Taip pat, doc. dr. Aušrai Šipailienei už suteiktą pagalbą bei konsultacijas eksperimentų metu. Noriu padėkoti mokslo darbuotojoms Ramutei Maždzierienei, Ritai Kazernavičiūtei už pagalbą atliekant tyrimus bei visam maisto mokslo ir technologijos katedros kolektyvui už gerų emocijų palaikymą viso darbo metu.

### **Pranešimai**

Dalis šio baigiamojo projekto rezultatų buvo publikuoti pristatant stendinį pranešimą „Optimization and evaluation of solid-state fermentation of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace using *Bacillus megaterium*” 2018.05.17-2018.05.18 tarptautinėje mokslinėje konferencijoje *FoodBalt 2018*, Kaune.