



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Lukas Jonuška**

**LAKTOZĖS ANTRINIUOSE PIENO PRODUKTUOSE  
BIOKONVERSIJA Į LAISVĄSIAS RIEBALŲ RŪGŠTIS IR  
SUSIDARUSIŲ METABOLITŲ ANTIMIKROBINIS  
AKTYVUMAS**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovė**

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

**KAUNAS, 2018**

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**LAKTOZĖS ANTRINIUOSE PIENO PRODUKTUOSE  
BIOKONVERSIJA Į LAISVĄS RIEBALŲ RŪGŠTIS IR  
SUSIDARUSIŲ METABOLITŲ ANTIMIKROBINIS  
AKTYVUMAS**

Baigiamasis magistro projektas  
Pramoninė biotechnologija (621J70004)

**Vadovė**

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

**Recenzentė**

Doc. Ilona Jonuškienė

**Projektą atliko**

Lukas Jonuška

**KAUNAS, 2018**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Lukas Jonuška

(Studento vardas, pavardė)

Pramoninė biotechnologija, 621J70004

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Laktozės antriniuose pieno produktuose biokonversija į laisvasias riebalų rūgštis ir susidariusių metabolitų antimikrobinis aktyvumas“

**AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

20 \_\_\_\_ m. \_\_\_\_\_ d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Luko Jonuškos**, baigiamasis projektas tema „Laktozės antriniuose pieno produktuose biokonversija į laisvasias riebalų rūgštis ir susidariusių metabolitų antimikrobinis aktyvumas“ 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.

\_\_\_\_\_  
(vardas ir pavardė)

\_\_\_\_\_  
(parašas)

# TURINYS

SANTRAUKA .....	6
SANTRUMPOS .....	9
ĮŽANGA .....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	12
1.1. Maisto pramonės antrinių produktų ir / ar atliekų apibūdinimas lakiųjų riebalų rūgščių gamybai .....	12
1.2. Substratų paruošimas laisvųjų riebalų rūgščių gamybai .....	13
1.3. Lakiųjų riebalų rūgščių gamybai įtakos turintys faktoriai .....	15
1.4. Lakiųjų riebalų rūgščių panaudojimo sritys .....	16
1.6.1. Bionuotekų valymas .....	16
1.6.2. Polihidroksialkanoatai .....	17
1.6.3. Bioenergetika .....	19
1.6.4. Mikrobiniai kuro elementai .....	19
1.6.5. Biodujos .....	20
1.6.6. Biodyzelinas .....	21
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI .....	22
2.1. Tyrimo objektai .....	22
2.1.1. Fermentacijoms naudojami substratai ir jų paruošimas .....	22
2.1.2. Pieno rūgšties bakterijos ir jų dauginimas mitybinėje terpėje .....	23
2.2. Galaktozidazės aktyvumų tyrimas .....	24
2.3. Acto rūgšties nustatymas .....	25
2.4. Pieno rūgšties L(+) ir D(-) izomerų tyrimas .....	26
2.5. Lakiųjų riebalų rūgščių nustatymas dujų chromatografiniu metodu .....	28
2.6. Antigrybinio aktyvumo nustatymas .....	30
2.6.1. Indikatorinių mikroskopinių grybų dauginimas .....	30
2.6.2. Antigrybinio aktyvumo nustatymo eiga .....	30
2.7. Duomenų apdorojimas tyrimų patikimumui įvertinti .....	31
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	32
3.1. Galaktozidazinių aktyvumų pokyčiai laktozės melasos ir išrūgų PRB fermentacijos metu .....	32
3.3.1. <i>Lactobacillus brevis</i> LUHS140 fermentacijos įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui .....	35
3.3.2. <i>Lactobacillus plantarium</i> LUHS18 fermentacijos įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui .....	37
3.3.3. <i>Lactobacillus plantarium</i> LUHS135 fermentacijos įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui .....	39
3.3.4. <i>Pediococcus pentosaceus</i> LUHS22 fermentacijos įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui .....	40

3.3.5. <i>Lactobacillus paracasei</i> LUHS244 fermentacijos įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui .....	42
3.4. Pirminiai pieno rūgšties bakterijų fermentacijos metabolizmo produktai ir jų įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui .....	44
3.4.1. Pieno rūgšties bakterijų padermės įtaka organinių rūgščių susidarymui.....	44
3.4.2. Acto rūgšties susidarymas PRB fermentacijos metu.....	45
3.4.3. Pieno rūgšties L(+) ir D(-) izomerų kitimo dinamika PRB fermentacijos metu ....	47
3.5. Pieno rūgšties bakterijų fermentacijos metu susidarančių metabolizmo produktų antigrybinai aktyvumai .....	48
3.6. Laisvųjų riebalų rūgščių ryšys su antigrybiniais aktyvumais .....	52
REKOMENDACIJOS .....	53
IŠVADOS .....	54
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	56
PRIEDAI.....	64

Jonuška, Lukas. Laktozės antriniuose pieno produktuose biokonversija į laisvąsias riebalų rūgštis ir susidariusių metabolitų antimikrobinis aktyvumas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: technologijos mokslų sritis, biotechnologija.

Reikšminiai žodžiai: laisvosios riebalų rūgštys, laktozės melasa, sūrinės išrūgos, fermentacija, pieno rūgšties bakterijos, galaktozidazinis aktyvumas, laktozė.

Kaunas, 2018. 95 p.

## SANTRAUKA

Darbas skirtas laktozės antriniuose pieno produktuose (sūrinių išrūgų ir laktozės melasos) biokonversijai į laisvąsias riebalų rūgštis ir susidariusių metabolitų antimikrobinio aktyvumo įvertinimui. Fermentacijai naudotos pieno rūgšties bakterijos: *L. plantarium* LUHS135, *L. brevis* LUHS140, *P. pentosaceus* LUHS22, *L. paracasei* LUHS244, *L. plantarium* LUHS18.

Pradiniame etape tirti β-galaktozidazinio aktyvumo pokyčiai sūrinių išrūgų ir laktozės melasos fermentacijos su įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis metu. Dujinės chromatografijos metodu įvertinta fermentacijoje metu susidarančių laisvųjų riebalų rūgščių kokybinė ir kiekybinė sudėtis: fermentuojant sūrinės išrūgas identifikuota miristino, palmitino, stearino, oleino ir linolo riebalų rūgštis, bendras rūgščių kiekis kito nuo 75,8 mg/l iki 122,19 mg/l; apdorojant laktozės melasą miristino neaptikta ir naujai susidarė linoleino riebalų rūgštis, o bendras rūgščių kiekis kito nuo 73,2 mg/l iki 100,75 mg/l. Fermentacijos metu laisvųjų riebalų rūgščių susidarymas priklausė pieno rūgšties bakterijos padermės: didžiausiu rūgščių susidarymo pajėgumu pasižymėjo *P. pentosaceus* LUHS22 ir *L. paracasei* LUHS244, sąlygojančios didžiausią oleino, linolo, linoleino rūgščių susidarymą. Nustatyta, kad mažėjant pH (sūrinių išrūgų fermentacijos metu iki 4,45, o laktozės melasos – 5,34) ir didėjant acto (nuo 0,48 iki 2,32 mM – sūrinių išrūgų, nuo 1,08 iki 2,2 mM – laktozės melasos) ir pieno (atitinkamai nuo 7,188 iki 35,433 g/l ir nuo 6,136 g/l iki 30,251 g/l) rūgšties koncentracijoms, stebima didesnė laisvųjų riebalų rūgščių susidarymo tendencija. Fermentuota laktozės melasa pasižymėjo antigrybiniu aktyvumu prieš *Fusarium spp.* ir jis buvo didesnis nei fermentuotų sūrinių išrūgų; abu fermentuoti substratai nepasižymėjo antigrybiniu aktyvumu prieš *Aspergillus* ir *Penicillium spp.* Regresinės analizės metodu vertinti ryšiai tarp laisvųjų riebalų rūgščių sudėties (kokybinės ir kiekybinės) ir jų antigrybinio aktyvumo: stiprus teigiamas ryšys aptiktas tarp laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijos ir antigrybinio aktyvumo, o taip pat tarp jų sudėties. Didžiausiu antigrybiniu

aktyvumu pasižymėjo linoleino, oleino, stearino, linolino, ir (atitinkamai buvo 0,995; 0,994; 0,953 ir 0,934). Tuo tarpu miristinas antigrybinio aktyvumo neturėjo  $R^2$  buvo 0,294.

Jonuška, Lukas.. *Master's thesis* / supervisor assoc. prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė. The Faculty of Chemistry technologies, Kaunas University of Technology.

Study field and area: technologies science, biotechnology.

Key words: free fatty acids, lactose molasses, whey, fermentation, lactic acid bacteria, fermentation, bioconversion, galactosidase activity, lactose

Kaunas, 2018. 95 p.

## SUMMARY

The research is based on bioconversion of lactose in dairy by-products (cheese whey and lactose molasses) to free fatty acids and obtained metabolite antimicrobial activities estimation. Lactic acid bacterial strains used for fermentations: *L. plantarium* LUHS135, *L. brevis* LUHS140, *P. pentosaceus* LUHS22, *L. paracasei* LUHS244, *L. plantarium* LUHS18.

At first,  $\beta$ -galactosidase enzymatic activity changes using different bacterial strains in fermentations (whey, lactose molasses) were studied. Qualitative and quantitative analysis of free fatty acids were estimated using gas chromatography method. Myristic, palmitic, stearic, oleic and linolic fatty acids were identified in fermented cheese whey. The total concentration of fatty acids raised from 75,8 mg/l to 122,19 mg/l. In fermented lactose molasses myristic fatty acid was missed but identified another – linolenic acid. The total concentration of fatty acids raised from 73,2 mg/l to 100,75 mg/l. Free fatty acids production volume was related to lactic acid bacterial strains. *P. pentosaceus* LUHS22 and *L. paracasei* LUHS244 demonstrated the best free fatty acids (oleic, linolic, linolenic) production capacity. Lower pH (in cheese whey fermentation to 4,45, lactose molasses – 5,34), higher acetate (from 0,48 to 2,32 mM – in whey, from 1,08 to 2,2 mM – in lactose molasses) and lactic (from 7,188 to 35,433 g/l and from 6,136 g/l to 30,251 g/l respectively) acids concentrations have positive influence for free fatty acid production capacity.

After fermentation antifungal activities were studied. Fermented lactose molasses has antifungal activities against *Fusarium spp.* and it demonstrated better antifungal activities results than using fermented cheese whey. Both of fermented substrates have not antifungal activities against *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.* Relations between free fatty acids compositions (quantitative and qualitative) and their antifungal activities were estimated using regression analysis method. Regression analysis results demonstrated that antifungal activity is related to

linolenic ( $R^2 = 0,995$ ) oleic ( $R^2 = 0,994$ ), stearic ( $R^2 = 0,953$ ) and linolic ( $R^2 = ,934$ ) fatty acids while palmitic fatty acid has no antifungal activity ( $R^2 = 0,294$ )



## SANTRUMPOS

COD – cheminis deguonies suvartojimas (angl. *chemical oxygen demand*).

DNS – dinitro salicilinė rūgštis.

LRR – lakiosios riebalų rūgštys.

MFC – mikrobinis kuro elementas (angl. *microbic fuel cell*).

PDA – bulvių dekstrozės agaras (angl. *potato dextrose agar*).

PHA – polihidroksialkanoatai.

PR – pieno rūgštis.

PRB – pieno rūgšties bakterijos.

## IŽANGA

**Tiriamąo projekto problema.** Staigus žmonių populiacijos ir pasaulio ekonomikos augimas kelia globalią problemą, susijusią su žemės ūkyje ir maisto pramonėje didėjančiais atliekų kiekiais. Tinkamas atliekų tvarkymas itin svarbus, norint minimaliai sumažinti tolesnę aplinkos taršą ir CO<sub>2</sub> emisiją į aplinką, taip pat formuoti teisingą pasaulio visuomenės požiūrį į gamtos tausojimą ir skatinti žmones prisidėti prie ekologinio ūkininkavimo. Pagrindinis maisto pramonės antrinių ir / ar susidarančių atliekų tvarkymo būdas – bioekonominiiais sprendimais pagrįstas biopriemonių taikymas racionaliam jų panaudojimui, laikantis aplinkosaugos reikalavimų. Vadovaujantis šiuo principu, antriniai maisto pramonės produktai gali būti perdirbti į pridėtinės vertės produktus ar komponentus, pavyzdžiui, bioplastikus, biodujas ir kt.

Pieno pramonėje, sūrių gamyboje susidaro dideli antrinių produktų kiekiai (pvz., sūrinių išrūgų, permiato, laktozės melasos), kurie panaudojami neracionaliai ir kelia pavojų aplinkai, nes gali patekti į nutekamuosius vandenius, pavyzdžiui, išrūgų cheminis deguonies suvartojimas – 50 kg O<sub>2</sub>/t. Tai įvertinant, aktualu užtikrinti racionalų pieno pramonės antrinių produktų perdirbimą, pasitelkiant biotechnologinius sprendimus. Vienas jų – pagrindinio komponento, esančio antriniuose pieno produktuose, laktozės biokonversija į pridėtinės vertės komponentus, pavyzdžiui, laisvąsias riebalų rūgštis.

Pagal literatūros šaltinius, laisvąsias riebalų rūgštis galima panaudoti daugelyje sričių, pavyzdžiui, bioplastikų gamyboje, bioenergetikoje. Pastebima, kad jos pasižymi antimikrobinėmis savybėmis, todėl gali būti pritaikytos plačiau, įskaitant ir maisto produktų gamybą, ir biologinių nuotekų valymą.

**Tyrimų aktualumas ir naujumas.** Šiuo metu laisvosios riebalų rūgštys dažniausiai gaminamos cheminiu būdu, todėl aktualu ieškoti pigesnių būdų laisvosioms riebalų rūgštims gauti. Biotechnologiniai sprendimai ir jų inovatyvumas priklauso nuo mikroorganizmų ir jų suderinamumo su fermentacijos terpe bei kitų faktorių, sąlygojančių laktozės biokonversijos į laisvąsias riebalų rūgštis, veiksmingumo. Fermentacija, kai naudojamos atrinktos pieno rūgšties bakterijos, gali padėti išspręsti perteklinių atliekų problemą, taip pat atpiginti gamybą ir maisto pramonėje organizuoti beatliekinius gamybos procesus.

Darbe ieškoma biotechnologinių sprendimų, kaip antrines sūrio gamybos atliekas (laktozės melasą ir sūrines išrūgas), kuriose daug laktozės, perdirbti į laisvąsias riebalų rūgštis.

**Tiriamąo projekto tikslas** – įvertinti laktozės antriniuose pieno produktuose biokonversijos į laisvąsias riebalų rūgštis galimybes, jų susidarymą sąlygojančius faktorius ir antimikrobinį aktyvumą. Šiam tikslui pasiekti keliami tokie **uždaviniai**:

1. Įvertinti pieno rūgšties bakterijų betagalaktozidazinį aktyvumą įvairiuose substratuose.

2. Įvertinti substratų (sūrinių išrūgų ir laktozės melasos) įtaką laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui.
3. Nustatyti laktozę konvertuojančių pieno rūgšties bakterijų savybę gaminti laisvąsias riebalų rūgštis.
4. Nustatyti faktorius, turinčius įtakos laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui, įskaitant pirminius fermentacijos metabolizmo produktus – pieno ir acto rūgštis.
5. Įvertinti pieno rūgšties bakterijų fermentacijos metu susidarantių metabolizmo produktų antigrybinį aktyvumą prieš indikatorinius mikroskopinius grybus.
6. Vadovaujantis regresinės analizės principais, nustatyti ryšius tarp laisvųjų riebalų rūgščių ir jų antigrybinio aktyvumo.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Maisto pramonės antrinių produktų ir / ar atliekų apibūdinimas lakiųjų riebalų rūgščių gamybai

Dumbliai, maisto atliekos ir organinės kietosios komunalinės atliekos – trys labiausiai ištirtos kietosios atliekos, iš kurių gaminamos laisvosios riebalų rūgštys (LRR). Žemės ūkio nuotekos, pienas, celiuliozė ir popierius yra skystosios atliekos, kurios taip pat dažnai naudojamos LRR gamybai. Be to, siekiant padidinti LRR gamybą, įvairių rūšių atliekų mišiniai taip pat ištirti ir naudojami [1].

Pirminiai dumbliai ir aktyviųjų dumblių atliekos iš komunalinių nuotekų valymo įrenginių dažniausiai tiriami, nes gali būti naudojami LRR gaminti [2]. Tiek pirminiuose dumbliuose, tiek aktyviųjų dumblių nuotekose yra labai daug organinių medžiagų, kurių bendras cheminis deguonies sunaudojimas svyruoja nuo 14,800 mg/l iki 23,000 mg/l [3, 4]. Būtent todėl šios atliekos tinkamos LRR gamybai. Visgi pabrėžtina, kad tirpaus dumblo cheminis deguonies sunaudojimas yra nuo 10 iki 100 kartų mažesnis nei jo bendras cheminis deguonies sunaudojimas, o tai sulėtina LRR gamybos procesą [4]. Atsižvelgiant į tai, reikėtų gerinti hidrolizę, pavyzdžiui, taikyti išankstinį apdorojimą.

Siekiant pagerinti ir pagreitinti LRR gamybą, vietoj vieno tipo dumblių pasiūlyta naudoti dumblių mišinio kofermentaciją. Pavyzdžiui, didžiausia LRR gamyba, naudojant tik pirminį dumblą, siekia 85 mg COD/g VSS, bet, naudojant ir aktyviojo dumblo atliekas, gamyba išauga 40 proc., t. y. iki 118 mg COD/g VSS, kai VSS santykis 1:1 [4]. Manytina, kad LRR gamyba padidėja dėl geresnės dumblių mišinio hidrolizės [4].

Maisto atliekos dėl galimybės naudoti jas LRR gamyboje tiriamos dėl dviejų priežasčių. Pirma, maisto atliekos yra dominuojančios didžiulės komunalinių skystųjų ir kietųjų atliekų sudedamosios dalys (22–54 proc.) [8]. Antra, maisto atliekos turi didelį COD kiekį, kuris yra 91,900–166,180 mg /l [11]. Nepaisant to, labai svarbu veiksmingai atskirti maisto atliekas nuo kietųjų dalelių, nes jos gali sumažinti LRR gamybą. Šiai problemai spręsti galima įrengti medžiagų atsinaujinimo centrą, skirtą atskirti kietąsias organinių junginių, stiklo, plastiko ir juodųjų metalų daleles. Kitas galimas LRR gamybos šaltinis – organinės kietosios komunalinės atliekos, kurių bendras COD yra 600–347 000 mg/kg [12–14]. Kaip ir dumblių panaudojimas LRR gamybai, taip ir organinių kietųjų komunalinių atliekų hidrolizė gali padidinti laiko sąnaudas, todėl reikėtų taikyti išankstinio apdoravimo metodus.

Norint LRR gaminti iš skystųjų atliekų, dažniausiai naudojamos žemės ūkio [15], pieno [10, 18], celiuliozės ir popieriaus pramonėje [10, 20] susidaranti nuotekos. Pavyzdžiui, palmių

aliejaus nuotekų valymo įrenginiai yra žemės ūkio nuotekos, kurių COD – 88 000 mg/l, dėl to gali susidaryti LRR, kurių koncentracija yra 15,300 mg/l [15]. Sūrio išrūgų permeatas ir popieriaus gamyklos nuotekos taip pat yra tinkamos, nes jų organinės medžiagos labai lengvai fermentuojasi [10]. Kalbant apie naftos pramonės nuotekas, pabrėžiama, kad nepaisant to, jos turi didelę COD vertę (11,500 mg/l) [21], jos netinkamos LRR gamybai, nes yra toksiškos ir kenksmingos mikroorganizmams. Palyginus su pramoninėmis nuotekomis, buitinėse nuotekose yra mažai organinių medžiagų, kurių tipinis COD yra 175–600 mg/l [22], todėl jis netinkamas LRR gamybai.

Apskritai vis dar neaišku, kokios rūšies atliekos yra tinkamesnės LRR gamybai, nes skiriasi darbo sąlygos ir LRR gamybos našumo vertinimo kriterijai. Tačiau dažniausiai LRR gamybai naudojamos atliekos, kuriose gausu organinių medžiagų, t. y., kai COD yra didesnis nei 4000 mg/l. Tai galėtų būti pirminis atliekų parinkimo vadovas. Pabrėžtina, kad, norint išvengti LRR gamybos slopinimo, amonio kiekis atliekose turi būti mažesnis nei 5000 mg/l [19], nepaisant to, kad tai pagrindinis mikroorganizmų augimo azoto šaltinis. Norint užtikrinti stabilų ir nuolatinį atliekų tiekimą LRR gamybai, reikia atsižvelgti ne tik į atliekų charakteristikas, bet ir į jų kiekį [23].

## **1.2. Substratų paruošimas laisvųjų riebalų rūgščių gamybai**

LRR gamybai naudojant kietąsias atliekas, hidrolizę smarkiai apriboja sudėtinga kietųjų atliekų struktūra ir sandara [24]. Pavyzdžiui, ląstelių sienelės ir ekstraląstelinės polimerinės dumblių medžiagos neigiamai veikia medžiagų hidrolizę ląstelėje [25]. Kalbant apie lignoceliuliozės medžiagas, riebalus ir baltymus maisto atliekose, jie mažina organinių medžiagų biologinio skilimo lygį [26]. Taigi, mokslininkai, siekdami tobulinti kietųjų atliekų solubilizavimą, ištyrė įvairius išankstinio apdorojimo metodus. Minėtina, kad išankstinis cheminis apdorojimas yra veiksmingas, kai norima pagerinti hidrolizę kietosiose atliekose. Reagentai, dažniausiai naudojami išankstiniam cheminiam apdorojimui, yra rūgštis [10], šarmai [10, 26], ozonas [29] ir vandenilio peroksidas [31, 32]. Rūgštis ir šarmo panaudojimas išankstiniam apdorojimui naudingas dėl dviejų priežasčių: sustiprina solubilizaciją iš polimerinių medžiagų dumblių [27] ir suardo ląstelių sieneles, dėl to iš ląstelės išsiskiria organinės medžiagos [28]. Be dumblo, šie du išankstiniai suardymo metodai taip pat skatina ir maisto atliekų solubilizaciją [10]. Vienintelis trūkumas susijęs su ekstremaliomis pH reikšmėmis – brangios ir korozijai atsparios įrangos poreikis [10, 27]. Antra vertus, dar vienas sprendimas šioje situacijoje – ozonas, kuris yra stiprus oksidatorius, galintis skaldyti hidroksilo radikalus [30], pradėti solubilizaciją. Nepaisant to, ozonas šiam tikslui naudojamas retai, nes jo išgavimo

kaina yra didelė [29]. Pabrėžtina, kad vandenilio peroksidas – puiki alternatyva, nes yra pigesnis, tačiau jo oksidacinis potencialas (1,8 V) yra mažesnis nei ozono (2,1 V) [31].

Biologiniai veiksniai, pavyzdžiui, hidrolitiniai fermentai [11] (*Cellulomonas uda*, *C. Biazotea*) [34], natūralus kompostas ir aktyvieji dumbliai iš komunalinių nuotekų valymo įrenginių [24] taip pat naudojami kietųjų atliekų solubilizacijai pagerinti. Atliekant išankstinį fermentinį apdorojimą ir dozuojant skirtingų fermentų mišinį, poveikis hidrolizei yra daug geresnis nei apdorojant tik vienos rūšies fermentu [11, 33]. Manytina, kad taip yra todėl, nes skirtingi fermentai hidrolizuoja skirtingus atliekų komponentus. Nepaisant to, išankstinis apdorojimas, naudojant fermentus bei grynąsias kultūras, gali būti brangus. Būtent todėl teigiama, kad nebrangios medžiagos, pavyzdžiui, brandus kompostas arba aktyvieji dumbliai turi būti naudojami dažniau. Palyginus su kitais cheminiais-fizikiniais metodais, kitas ne mažiau reikšmingas veiksnys – ilgesnė pirminio apdorojimo proceso trukmė [1].

Pirminis apdorojimas mikrobangomis [27, 32] skatina kietųjų atliekų hidrolizę per terminį ir aterminį poveikį. Šiluminis poveikis priskiriamas šilumos generavimui, kurį sukelia elektromagnetiniame lauke besisukančios dipolinės molekulės (pvz., vandens) [25]. Aterminis poveikis susijęs su makromolekulių (pvz., baltymų) poliarizuotų šoninių grandinių derinimu, su elektromagnetinio lauko poliais. Taip pat suardo vandenilinius ryšius ir destabilizuoja molekulės struktūrą [57]. Pirminis apdorojimas mikrobangomis yra labai intensyvus ir gali suformuoti ugniai atsparius junginius, pavyzdžiui, melanoidinų ir humino rūgštis, kurios mažina apdorotų atliekų biologinį skaidomumą. Vietoj pirminio apdorojimo mikrobangomis, gali būti taikomas terminis apdorojimas 60–180 °C laipsnių diapazone [10]. Esant aukštesnėms temperatūroms, apdorojimo poveikis būna panašus į pirminio apdorojimo mikrobangomis poveikį, taip pat gali daryti įtaką tirpių organinių medžiagų susidarymui [35]. Esant žemesnei nei 70 laipsnių temperatūrai, termofilinės hidrolitinės bakterijos pagerina kietųjų atliekų solubilizaciją.

Ultragarso taikymas kietųjų atliekų solubilizacijai ištirtas daugelio mokslininkų [10]. Pirminis apdorojimas ultragarsu suformuoja kavitacijos burbulus, o jų sprogdimas generuoja hidromechanines šlyties jėgas, kurios yra gana stiprios, kad suskaidytų atliekų makromolekules [36]. Be to, šiems burbulams sprogdus, pakyla ir temperatūra, ir slėgis, dėl kurio susidaro reaktyvūs hidroksilo radikalai ir kietųjų atliekų terminė destrukcija. Į pirminį apdorojimą mikrobangomis apdorojimas ultragarsu yra panašus, nes abu apdorojimai energetiškai labai intensyvūs [28].

Literatūroje rašoma apie kelis skirtingus pirminio kietųjų atliekų apdorojimo procesus, kuriuos galima derinti tarpusavyje ir taip skatinti sinergetinę hidrolizę [10, 24]. Atliekant apdorojimą ultragarsu ir kartu naudojant šarmą, pagerėja nuotekų skaidymas [28]. Pirminis apdorojimas su šarmu silpnina ląstelių sienelę, kuri tampa pažeidžiamesnė ultragarso poveikiui.

Kitu atveju gali būti naudojamas ozono ir ultragarso derinys [30], kai, naudojant ultragarą, pagerėja ozono skilimas į hidroksilo radikalus ir ozono mikroburbulai skatina akustinių kavitacijų susidarymą. Yra ir daugiau kombinuoto pirminio apdorojimo galimybių, tačiau jos neištirtos.

Renkantis bet kurį iš anksčiau paminėtų pirminių apdorojimų derinimą tarpusavyje, svarbu atsižvelgti į kietųjų atliekų kiekį, nes su juo susijęs kapitalas ir energijos sąnaudos. Todėl, norint nustatyti, kuris metodas yra geriausias, išankstinis apdorojimas įvertinamas techniškai ir ekonomiškai. Literatūroje yra keletas mažai aptartų techno-ekonominių vertinimų pavyzdžių [37]. Pavyzdžiui, Dharas ir kt. [37] atliko technoekonominį ultragarsinio, terminio bei jų kompleksinio apdorojimo vertinimą.

### 1.3. Lakiųjų riebalų rūgščių gamybai įtakos turintys faktoriai

**Substrato pH.** LRR gamybai pH reikšmė svarbi, nes daugelis rūgščių negali išgyventi labai rūgštinėje (pH 3) arba šarminėje (pH 12) aplinkoje [42]. Optimaliausias pH rodiklis, norint gaminti LRR, yra 5,25–11, tačiau tikslus rodiklis priklauso nuo naudojamų atliekų rūšies. Pavyzdžiui, kai naudojami dumbliai, optimali pH reikšmė yra 8–11. Minėtina, kad, esant šarminėms sąlygoms, yra daugiau tirpių substratų, reikalingų LRR gamybai [5, 6]. Šarmas sukelia stiprų atostūmį tarp ekstraląstelių polimerinių medžiagų, dėl kurių į aplinką išsiskiria angliavandeniai ir baltymai [43]. Tai reiškia, kad yra daugiau tirpių substratų, norint pagaminti LRR šarminėmis sąlygomis [5, 6]. Be to, šarminė aplinka nepalanki metanogenezei, o tai reiškia, kad iš pagamintų LRR neišsiskirs metanas [6]. Kita vertus, pH 7 laikyta optimaliausia maisto atliekų hidrolizei ir rūgštingumui nustatyti, nes šis rodiklis sudaro didžiausią angliavandenių, baltymų ir lipidų solubilizacijos procentą ir didžiausią LRR koncentraciją palyginus su pH 5,9 ir 11 [9]. LRR gamyba iš nuotekų dažniausiai vykdoma rūgštinėje aplinkoje, kur pH svyruoja nuo 5,25 iki 6. Remiantis šia informacija, galima teigti, kad šarminė aplinka palankiausia, kai LRR gaminamos iš dumblių, o neutrali ir rūgšti aplinkos skatina LRR gamybą iš maisto atliekų ir nuotekų. Be to, pH taip pat gali turėti įtakos LRR rūšims, kurios gaunamos rūgštiniame fermentacijos procese, ypač actui, propionui ir aviario rūgštims [10, 44].

**Temperatūra.** Mokslininkai LRR gamybą iš atliekų vykdė skirtingomis temperatūros sąlygomis: psichrofilinėmis (4–20 °C) [7], mezofilinėmis (20–50 °C) [7, 45], termofilinėmis (50–60 °C) [2, 45, 48] ir hipertermofilinėmis (60–80 °C) [49]. Padidėjusi temperatūra psichrofilinėje ir mezofilinėje temperatūrų diapazone naudinga, nes didina LRR gamybos ir išėigos koncentraciją [7, 46, 81]. Pavyzdžiui, padidinus temperatūrą nuo 10 °C iki 35 °C laipsnių, LRR, pagamintų iš aktyviųjų dumblių, koncentracija padidėja net 300 proc. [47].

Padidėjimas atsiranda dėl didesnio tirpių angliavandenių ir baltymų kiekio, kuris yra aukštesnėje temperatūroje pagerintos dumblo hidrolizės rezultatas. LRR gamyba iš pirminio dumblo fermentacijos metu gali padidėti šešis kartus, jeigu temperatūra pakyla nuo 8 iki 25 °C laipsnių [7].

S. Jiangas ir kt. teigia, kad termofilinėmis temperatūros sąlygomis (60 °C) galima sukelti greitesnę biologinę aklimatizaciją ir didesnę rūgščių išsiskyrimą, palyginus su mezofilinėmis temperatūros sąlygomis (35 °C), todėl padidėja LRR išeiga [2]. Taip pat LRR gamyba, esant hipertemofilinėms temperatūros sąlygoms (70–80 °C), yra didesnė negu termofilinėmis sąlygomis (55–60 °C) [50]. Nepaisant to, Yu ir kt. pabrėžia, kad 45–70 °C laipsnių temperatūra neturi įtakos LRR gamybai [49]. Zhuo ir kt. nustatė priešingai, t. y., kad rūgštingumą skatinančių fermentų aktyvumas termofilinėje temperatūroje (55 °C) buvo mažesnis negu mezofilinėje temperatūroje (37 °C) [48]. Dėl šios priežasties bendra LRR koncentracija, pasiekta 55 °C laipsnių temperatūroje, buvo 40 proc. mažesnė negu 37 °C laipsnių temperatūroje [48]. Manytina, kad išvadų prieštaravimas atsirado, nes tyrimuose naudotos skirtingos mikroorganizmų rūšys.

Skirtingai nuo pH, temperatūros poveikis gaminamam LRR tipui yra nedidelis. Yuanas ir kt. aptarė aktyviųjų dumblių atliekų fermentaciją, kuri vykdyta esant 4 °C, 14 °C ir 24,6 °C laipsnių temperatūroms. Pastebėta, kad temperatūra padidėjo nuo 4 °C iki 14 °C laipsnių, acetato procentas sumažėjo nuo 55 iki 43 proc., bet propionato ir sviesto rūgšties procentinė dalis padidėjo atitinkamai nuo 20 iki 29 proc. ir nuo 11 iki 16 proc. Tačiau tolesnis temperatūros padidėjimas iki 24,6 °C laipsnių nepakeitė LRR sudėties [46].

#### **1.4. Lakiųjų riebalų rūgščių panaudojimo sritys**

LRR, gautos rūgštinės fermentacijos metu, yra puikus substratas įvairioms reikmėms, pavyzdžiui, biologiškai skaidžių plastikų gamybai. Atliekant fermentaciją, ne tik utilizuojamos atliekos, bet ir iš jų cheminės sudėties išgaunamos LRR. Kai kuriais atvejais fermentuotos atliekos turi būti apdorojamos toliau, kad jų veikimas būtų veiksmingesnis. Norint pateikti rekomendacijas ir optimizuoti rūgštinę fermentaciją, kurios metu gaminamos LRR, pagrindinis dėmesys skiriamas konkrečiai LRR ir jos pritaikymui anksčiau minėtose srityse.

##### **1.4.1. Bionuotekų valymas**

LRR yra puikus anglies substratas, kuris užtikrina biologinio azoto ir fosforo pašalinimą iš nuotekų. Yra žinoma, kad azoto pašalinimas yra atliekamas aerobinėmis sąlygomis (nitrifikacijos



būdu), po anaerobinės denitrifikacijos [1]. Kalbant apie fosforą, jį galima pašalinti sustiprinto biologinio fosforo šalinimo proceso metu alternatyviomis aerobinėmis ir anaerobinėmis sąlygomis. Azoto ir fosforo šalinimas tuo pačiu metu yra įmanomas, jeigu užtikrinamos alternatyvios aerobinės ir anaerobinės sąlygos. Daugeliu atvejų LRR naudojamos kaip papildomas anglies šaltinis biologinėms nuotekoms valyti, nes anglies kaip substrato pagrindo koncentracija nuotekose yra nepakankama. Norint pašalinti 1 mg azoto, reikia, kad anglies cheminio deguonies suvartojimo lygis būtų 5–10 mg [81], o norint pašalinti 1 mg fosforo reikia, kad cheminis deguonies suvartojimas būtų 7,5–10,7 mg [40]. Naudoti susintetintas LRR gali būti brangu, todėl ekonomiškai naudingesnis sprendimas yra naudoti iš atliekų susidarancias LRR.

Remiantis kelių tyrimų duomenimis, naudojant LRR, biologinių maistinių atliekų šalinimo našumas didesnis nei naudojant sintetinį acetatą. Manytina, kad taip yra dėl sinergetinio kitų komponentų poveikio [5, 82]. Minėtina, kad, šalinant fosforą, didesnis veiksmingumas pasiekiamas naudojant LRR, gautas iš aktyviųjų dumblo atliekų (98,7 proc.) palyginus su acetatu (71,1 proc.) [82]. Didesnis veiksmingumas susijęs su mažesne glikogeno sinteze ir didesniu įsisavinto fosforo kiekiu kiekvienam polihidroksialkanoatui. Zhengas ir kt. palygino azoto ir fosforo šalinimo veiksmingumą, naudodamas LRR, gautas iš aktyviųjų dumblių atliekų ir sintetinį acetatą alternatyviomis anaerobinėmis-aerobinėmis-anoksinėmis-aerobinėmis-anoksinėmis-aerobinėmis sąlygomis [5]. Pastebėta, kad azoto ir fosforo šalinimo veiksmingumas padidėja atitinkamai 82 ir 95 proc. Tyrėjai teigia, kad, esant propionatui, fosforas šalinamas veiksmingiau. Azotas pašalinamas veiksmingiau išoriniu denitrifikacijos būdu. Didelis azoto ir fosforo šalinimo veiksmingumas patvirtina, kad LRR yra puikus ir veiksmingas anglies šaltinis biologinėms maisto medžiagoms šalinti.

Skirtinga LRR turi skirtingą biologinio maisto medžiagų šalinimo veiksmingumą. Azoto šalinimo procesuose denitrifikuojančios bakterijos pirmenybę teikia mažesnės molekulinės masės LRR. Pirmiausia, bakterija kaip substratą sunaudoja acetatą, tada propionatą ir butiratą, galiausiai valeratą. LRR sunaudojimo tvarka gali būti susijusi su paprastesniais metaboliniais keliais, kuriuos renkasi denitrifikuojančios bakterijos [83]. Be to, vidutinis denitrifikacijos greitis, naudojant acetatą, yra du kartus didesnis nei naudojant propionatą [83]. Tyrimai rodo, jog LRR pritaikant denitrifikacijos procese reikėtų padidinti acetato koncentraciją.

#### **1.4.2. Polihidroksialkanoatai**

Polihidroksialkanoatai (PHA) – tai biologiškai skaidūs polimerai, kuriuos sintezuoja mikroorganizmai, naudojantys atsinaujinančius išteklius, pavyzdžiui, LRR [1]. PHA naudojami

daugelyje pramonės šakų, nes yra ekologiški. Visgi pabrėžtina, kad dėl didelių gamybos sąnaudų jų pakaitalas iš naftos chemijos pagaminto plastiko naudojamas ribotai [58]. Tai susiję su brangaus ir gerai apibrėžto anglies substrato naudojimu, kuris sudaro apie 31 proc. visų veiklos sąnaudų [59]. Atsižvelgiant į tai, pigios medžiagos, pavyzdžiui, LRR, gautos iš atliekų, yra puiki alternatyva PHA gaminti.

Prieš fermentuojant atliekas, kuriose yra daug LRR, svarbu sureguliuoti amonio ir fosforo kieki, nes, kai yra pernelyg daug maistinių medžiagų, atsiranda daugiau mikroorganizmų, mažėja LRR pasikeitimas į PHA [60]. Be to, ištirta, kad, esant ribotam azoto ir fosforo kiekiui, gali padidėti PHA kiekis ir išeiga [35]. Fermentuotuose atliekose esantį per didelį azoto ir fosforo kiekį galima pašalinti kartu su nuosėdomis. Įrodyta, kad, siekiant greitai pašalinti amonį ir fosforą iš fermentuotų aktyviojo dumblo atliekų, šis metodas yra veiksmingas, o LRR nuostoliai yra nereikšmingi [2]. Pabrėžtina, kad tiesioginis fermentuotų atliekų su dideliu dumblo kiekiu tiekimas į PHA gamybos reaktorių nerekomenduojamas, nes tai gali sutrikdyti PHA gamybą [61]. Apskritai, fermentuotos atliekos prieš naudojimą turėtų būti filtruojamos [57, 60]. Galima pagalvoti apie kompleksinį filtravimą ir garinimo sistemą, jeigu, gaminant PHA, pageidautina naudoti grynąsias LRR [62]. Nepaisant to, grynosios LRR naudojamos retai, t. y. tada, kai PHA gaminti naudojami grynieji mikroorganizmai [15].

PHA, gautų iš grynujų mikroorganizmų, kiekis didesnis, tačiau turi būti sterilios sąlygos. Minėtina, kad tai prieštarautų pagrindiniam PHA gamybos sąnaudų mažinimo tikslui, nes reikėtų papildomos energijos ir įrangos. PHA gamyboje, naudojant mišrias mikroorganizmų kultūras, nereikia sterilios aplinkos, todėl šis būdas ekonomiškėnis su LRR, gautomis iš atliekų. PHA kiekis, gaunamas iš mišrios kultūros, gali būti padidintas, jeigu optimizuojamos PHA kaupiančių organizmų auginimo sąlygos [20, 63]. Tai padaryti galima naudojant tinkamą LRR tipą [64] ir (arba) koreguojant PHA gamybos sąlygas [66]. Naudojant šias strategijas, PHA kiekis 40–77 proc. diapazone yra pasiekiamas su mišriomis mikroorganizmų kultūromis, kurios maitinasi fermentuotomis maisto [66], aktyviojo dumblo [65], cukranendrių melasos [63], popieriaus gamyklų nuotekų atliekomis [20].

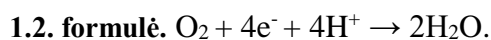
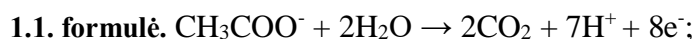
LRR molekulių grandinės ilgis daro didelę įtaką sudėčiai, mechaninėms savybėms, taip pat gautiems PHA. Gaminant PHA, kai naudojamos mišrios mikroorganizmų kultūros, acto ir sviesto rūgštis skatina 3-hidroksibutirato (3HB) gamybą, o propiono ir valerikų rūgštys skatina 3-hidroksivalerato (3HV) sintezę [60, 64]. 3-polihidroksibutiratas (P (3HB)) yra trapus ir standus, todėl jo pritaikymas ribotas [67]. Be to, palyginus su komerciniu polietilenu ir polipropilenu, jis mažiau pralaidus deguoniui, todėl tai tinkama maisto pakavimo medžiaga [23]. Būtent todėl, norint palengvinti PHA gamybą, labai svarbu reguliuoti LRR sudėtį acidogeninės fermentacijos metu.

### 1.4.3. Bioenergetika

Naftos kainų augimas ir jos atsargų išsekėjimas – tai auganti energetinė krizė, kuri tapo dideliu iššūkiu XXI amžiuje. Atsižvelgiant į tai, svarbu sukurti alternatyvų energijos gamybos būdą, t. y. surasti alternatyvų energijos šaltinį dabartinėje rinkoje. Iš atliekų gautos LRR yra nebrangus energijos šaltinis, kuris gali būti naudojamas skirtingiems energijos šaltiniams išgauti, taip pat generuojant įvairias energijos formas. Naudojant mikrobinį kuro elementą, galima tiesioginė elektros energijos gamyba iš LRR, Be to, LRR gali būti naudojamos įvairiems vertingiems degalams, pavyzdžiui, biodujoms, vandeniliui ir biodyzelinui gaminti [1].

### 1.4.4. Mikrobiniai kuro elementai

Mikrobinis kuro elementas (MFC) – tai bioelektrocheminė sistema, kai mikroorganizmai panaudoja cheminę energiją, gaunamą iš organinio substrato, kaip elektros šaltinį. Mikrobinis kuro elementas susideda iš anaerobinės anodo kameros ir aerobinės katodo kameros, kurios atskirtos membrana (pro membraną vyksta protonų mainai) [68]. Anode susiformuoja biofiltras ant kurio mikroorganizmai oksiduoja LRR, o tai skatina elektronų, protonų ir anglies dioksido gamybą. Protonai kryptingai juda pro protonų mainų membraną ir patenka į katodo kamerą, tuo metu elektronai juda išorine grandine katodo link. Ant katodo elektronai jungiasi su protonais ir deguonimi, todėl gaminasi vandens molekulės. Tuo užbaigiama elektros grandinė ir atsiranda elektros srovė. Anodinė ir katodinė reakcijos yra pateiktos 1.1. ir 1.2. formulėse (acetatas naudojamas kaip organinis substratas).



Skirtinga LRR rūšis turi skirtingą pajėgumą elektros energijos gamyboje. Srovės kiekis, pagamintas MFC naudojant acetatą, yra du kartus didesnis nei bet kuri kita, didesnės molekulinės masės LRR. Tai leidžia pasiekti ir didžiausią kulonominį veiksmingumą [69]. Taip pat MFC naudojant acetatą, buvo pasiekta ir didesnė srovės galia [70]. Didesnė galia pasiekama, kai MFC naudoja acetato, propionato ir butirato LRR mišinį, kuriame daugiausia yra acetato. Keletas tyrimų parodė, kad anodiniai organizmai pirmenybę teikia mažesnės molekulinės masės LRR [4, 69]. Acetato ir propionato MFC sunaudojimas su fermentuotomis maisto atliekomis buvo greitesnis nei bet kurios kitos didesnės molekulinės masės LRR [4]. Taip pat acetato ir

propionato sunaudojimas MFC su LRR mišiniu buvo didesnis, tačiau valeratas buvo beveik pašalintas po 20 sav. [69]. Tai reiškia, kad, norint didesnės elektros gamybos, reikia padidinti acetato koncentraciją iš atliekų gautame LRR mišinyje.

#### **1.4.5. Biodujos**

Biodujos dažnai naudojamos šilumos ir elektros energijai gaminti, nes jose yra daug metano (65–70 proc.) [38]. Biodujos gaminamos anaerobinėmis sąlygomis, naudojant pirmojo etapo LRR. Biodujas galima gaminti iš atliekų naudojant anaerobinį reaktorių, kuriame LRR yra tarpinis produktas. Šis procesas vadinamas vienfaziu anaerobiniu skaidymu. Tačiau optimalios mikroorganizmų, atsakingų už rūgštingumą ir metanogenezę, augimo ir funkcionavimo sąlygos yra labai skirtingos. Sunku sukurti optimalias sąlygas abiem mikroorganizmų grupėms viename reaktoriuje, todėl nepakanka vienfazio anaerobinio skaidymo [71]. Šią problemą galima išspręsti taikant dvifazį anaerobinį skaidymą, kurio metu dvi mikroorganizmų grupės patenka į atskirus reaktorius. Pirmasis reaktorius veikia rūgštinėje pH ir esant trumpai kietųjų dalelių sulaikymo trukmei, kad galėtų sparčiau auginti acidogenus, o antrasis reaktorius veikia neutralioje pH, kai kietųjų dalelių sulaikymo trukmė ilgesnė. Šios sąlygos praturtina lėtai augančius metanogenus [40]. Dvifazis anaerobinis skaidymas, palyginus su vienfaziu anaerobiniu skaidymu, gali veikti esant didesnei organinės įkrovos normai ir taip padidinti biodujų gamybą [72]. Dar viena patraukli dvifazio anaerobinio skaidymo ypatybė – tuo pačiu metu pirmajame reaktoriuje išgaunamas vandenilis, o antrajame – metanas [73]. Ši savybė užtikrina didesnę energijos našumą, t. y. net 25 proc. didesnę nei taikant vienfazį anaerobinį skaidymą [74]. Tiek vienfazio, tiek dvifazio anaerobinio skaidymų pranašumas yra tai, kad pagamintoms LRR nereikia tolesnio apdorojimo, todėl procesas yra labai ekonomiškasis.

Tarp visų LRR, propiono rūgštis labiausiai slopina metano genetines bakterijas [75, 76]. Visiškas propionato slopinimas prasideda esant 5000 mg/l koncentracijai, o tai yra net penkis kartus mažesnė koncentracija nei acetato arba butirato [75]. Be to, metanogeninių bakterijų koncentracija sumažėja nuo  $6 \cdot 10^7$  1/ml iki  $1 \cdot 10^7$  1 ml, kai propiono rūgšties koncentracija pasiekia 900 mg/l [76]. Pabrėžtina, kad mokslininkai nepastebėjo intensyvesnio slopinimo esant didesnei acetato (2400 mg/l) arba butirato (1800 mg/l) koncentracijai. Pabrėžtina, kad, norint išvengti metanogenezės slopinimo, labai svarbu išlaikyti mažą propionato koncentraciją iš atliekų gautame LRR mišinyje.

#### 1.4.6. Biodyzelinas

Biodyzelinas – tai ilgalaikių grandžių riebalų rūgščių metilo esteris, kuris gali būti pagamintas iš lipidų per transesterifikavimo procesą [1]. Biodyzelinas yra atsinaujinantis energijos šaltinis, tačiau dėl didelių gamybos išlaidų juo neprekiuojama, nes gamybos žaliavos yra labai brangios ir sudaro netgi 70–75 proc. visų išlaidų [77]. Šiuo metu biodyzelino gamybai dažniausiai naudojami iš žemės ūkio produktų gauti maistiniai lipidai, pavyzdžiui, rapsų, palmių ir sojos pupelių aliejai [78]. Gaminant biodyzeliną taip pat kyla susirūpinimas dėl maisto vartojimo degalams gaminti, todėl ieškoma nevalgomų ir nebrangių lipidų. Mikroorganizmų lipidai, sintetinami iš LRR, kurios gautos iš atliekų – pagrįsta alternatyva [79]. Be to, kai kurie iš LRR sintezuotų mikroorganizmų lipidai panašūs į sojos pupelių ir jatrofos aliejus, todėl tinka biodyzelino gamybai [80].

Iki šiol atlikta nedaug mokslinių tyrimų, kurių metu tikrinta mikroorganizmų lipidų gamyba iš LRR, gautų iš atliekų [79], daugelyje tyrimų naudotos sintetinės LRR [80]. Lipidų koncentracija, gauta maisto atliekas fermentuojant su *Cryptococcus curvatus*, buvo labai maža – 13,8 proc. (kaip substratas naudotos LRR). Mažesnis lipidų kiekis dažnai susijęs su mažu anglies ir azoto santykiu (3,2:1) fermentuotose maisto atliekose, kuris ir sumažina lipidų gamybą [79]. Todėl, norint gauti daugiau lipidų, rekomenduojama pašalinti azoto junginius iš fermentuotų atliekų. Dar viena lipidų kiekio padidinimo alternatyva – manipuliavimas skirtingomis LRR kompozicijomis [80].

## 2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

### 2.1. Tyrimo objektai

#### 2.1.1. Fermentacijoms naudojami substratai ir jų paruošimas

Fermentacijoms bus naudojami du substratai: sūrinės išrūgos ir laktozės melasa. Substratai gauti iš įmonės AB „Rokiškio sūris“. AB „Rokiškio sūris“ – didžiausia įmonių grupė Baltijos šalyse, pagal pieno perdirbimo kiekį. Sūrinės išrūgos ir laktozės melasa – labiausiai rūgštimis užterštos nuotekos, tačiau savo sudėtyje turi daug potencialaus anglies šaltinio – pieno cukraus, kuris biokonversijos metu gali būti verčiamas į LRR.

Iš įmonės gavus substratus, jie buvo užšaldyti. Pabrėžtina, kad tik prieš eksperimentą atšildomas reikalingas šių substratų kiekis. Substratus būtina užšaldyti, nes šilumoje natūraliai prasideda anaerobinė fermentacija, o tai lemtų rezultatų netikslumus.

Tiek sūrinėse išrūgose, tiek laktozės melasoje vyrauja dvi medžiagos fazės: nuosėdos ir skystis. Eksperimentams naudojama skystoji fazė, nes joje yra ištirpęs fermentacijai reikalingas pieno cukrus. 2.1. lentelėje pateikiamos laktozės melasos charakteristikos.

**2.1. lentelė.** Laktozės melasos charakteristikos. AB „Rokiškio sūris“ duomenys

Laktozės melasa	
Spalva	Nuo šviesiai geltonos iki šviesiai rudos
Skonis, kvapas	Būdingas išrūgoms
Konsistencija	Vienalytis skystis, gali būti laktozės kristalų
Sausos medžiagos, proc.	29
Laktozės koncentracija, proc.	≥ 17
Riebumas, proc.	0
Baltymai, proc.	≥ 1,8
pH	≥ 4,2
Pelenai, proc.	3–9

Naudojamas 0,1 N NaOH tirpalas, kuriuo abiejų substratų terpės pH keičiamas, kol pasiekiamos optimalios sąlygos. Fermentacijas su PRB geriausiai pradėti tada, kai terpės pH 7. Po terpės pH stabilizavimo, naudojant karštį, iš sūrinių išrūgų bei laktozės melasos pašalinami baltymai. Substratai kaitinami iki užvirimo, o atvėsus filtruojami ir centrifuguojami atskiriant nuosėdas. Tuomet paruošti substratai pilami į „Erlenmeyer“ kolbas, kurios uždengiamos aliuminio folija ir autoklavuojamos 121 °C laipsnių temperatūroje, 15 min. Po atliktos sterilizacijos, substratai atvėsinami iki 35–40 °C laipsnių ir tinkami PRB fermentacijai pradėti.

## 2.1.2. Pieno rūgšties bakterijos ir jų dauginimas mitybinėje terpėje

Tyrimui naudojamos penkios skirtingos pieno rūgšties bakterijos (PRB), gebančios fermentuoti laktozę. 2.2. lentelėje pateikiama svarbiausia informacija apie naudojamas pieno rūgšties bakterijas ir jų išskyrimą.

2.2. lentelė. Informacija apie fermentacijoje naudojamas pieno rūgšties bakterijas

Išskirta iš	Pirminis pavadinimas	PRB pavadinimai, naudojami publikacijose ir pan.
Avižos	Lactobacillus plantarum JCM 1149	<i>L. plantarum</i> LUHS135
Miežiai	Lactobacillus plantarum WCFS1	<i>L. plantarum</i> LUHS18
Ryžiai	Lactobacillus brevis ATCC 367	<i>L. brevis</i> LUHS140
Prieskrandis	Lactobacillus paracasei NBRC 15889	<i>L. paracasei</i> LUHS244
Ryžiai	Pediococcus pentosaceus ATCC 25745	<i>P. pentosaceus</i> LUHS22

Šiame tyrime PRB pagausinimui naudota MRS BROTH WITH TWEEN 80 mitybinė terpė (žr. 2.1. pav.). Terpei pasigaminti imta 55,2 g terpės miltelių, kurie ištirpinti 1000 ml vandens. Paruošta terpė (išpilstyta į buteliukus) sterilizuota autoklave („Vapor matic 770“) 121 °C temperatūroje, trukmė - 15 min. Kartu su terpe buvo sterilizuotos ir automatinės pipetės antgaliai, kurie bus naudojami tolesniame eksperimento etape. Po autoklavavimo paruošta terpė ataušinta iki 35–40 °C temperatūros.



2.1. paveikslas. Pieno rūgšties bakterijų dauginimui naudota mitybinė terpė

Pieno rūgšties bakterijos (PRB) laikomos „Ependorf“ mėgintuvėliuose (žr. 2.2. pav.) užšaldytos žemoje (< -10°C) temperatūroje, Mėgintuvėliai žymimi skaičiais, kiekvienas skaičius

žymi tam tikrą PRB padermę. Bakterijos išimamos iš šaldiklio ir atšildomos. Toliau bakterijos yra dauginamos.

Bakterijų dauginimas vykdytas aseptinėmis sąlygomis naudojant laminarą. Prieš pradėdant dirbti su laminaru, jis buvo dezinfekuojamas (15 min. įjungiamo UV spinduliuotė). Po laminaro sterilinimo UV, galima pradėti tyrimus.

Eksperimentui paimamas „Ependorf“ mėgintuvėlis su atšildyta bakterija, iš jo automatiškai pipete paimama 20 µl PRB ir nedelsiant supilama į buteliuką su maitinamąja terpe, o buteliukas užsukamas. Analogiški veiksmai kartojami kiekvienai PRB padauginai. Svarbu dirbti greitai ir atsargiai, kiekvienam veiksmui keisti pipetės antgalius, kad į maitinamąją terpę nepatektų kitų pašalinių mikroorganizmų.

Po darbo laminare, „Ependorf“ mėgintuvėliai su bakterijų kultūromis pakartotinai buvo užšaldomi, o buteliukai su terpe ir joje esančiomis pasėtomis PRB sudedami į termostatą („Cernusco s/n (MI)“, Italija), kuriame palaikoma pastovi 35 °C temperatūra. Po 48 val. pagausintos PRB padermės naudotos fermentacijai.



**2.2. paveikslas.** Užšaldyti pieno rūgšties bakterijų mėginiai

## **2.2. Galaktozidazės aktyvimų tyrimas**

Laktozės koncentracijai nustatyti naudojamas DNS (3,5-dinitrosalicilinės rūgšties) metodas. Laktozė yra redukuojantis disacharidas, kurio kiekis nustatomas kolorimetriniu metodu pagal spalvoto tirpalo, kuris susidaro redukuojantiems sacharidams reaguojant su 3,5-dinitrosalicilinės rūgšties reagentu, optinį tankį. Šiuo atveju, laktozės disacharidas sudarytas iš gliukozės ir galaktozės. Vieno monosacharido glikozidinis hidroksilas reaguoja su kito monosacharido alkoholiniu hidroksilu. Vienas iš dviejų monosacharidų, sudarančių disacharido molekulę, turi laisvą glikozidinę hidroksigrupę, kuri gali sudaryti tautomerinę pusiausvyrą su



oksogrupe. Todėl laktozė, kaip ir kiti redukuojantys sacharidai, pasižymi aldozių savybėmis: redukuoja varį ir sidabrą iš jų kompleksinių junginių.

Paruošti substratai fermentuojami, naudojant skirtingas PRB. Darbas vyksta laminare aseptinėmis sąlygomis, naudojant pipetes su autoklavuotais antgaliais. Imama po 50 ml kiekvieno paruošto substrato (laktozės melasos, sūrinių išrūgų) į „Erlenmeyer“ kolbą ir pridedama 2 proc. bakterijų (1 ml) mėginio tūrio. Mėginiai dedami į termostatą stabilią temperatūrą 37 °C Fermentacija vyksta 48 val. Mėginiai analizei paimami po 12, 24 ir 48 val. nuo fermentacijos pradžios.

Laktozės koncentracijos pokyčių fermentacijos metu nustatymui į stiklinius mėgintuvėlius paimta po 1 ml kiekvieno mėginio ir sumaišyta su 1 ml DNS reagento. Mėgintuvėlių mišinys kaitinamas vandens vonelėje, 15 min. (80 °C laipsnių temperatūroje). Po kaitinimo tirpalai atvėsunami iki kambario temperatūros, į juos įpilama po 8 ml distiliuoto vandens. Gautas tirpalų optinis tankis matuojamas su spektrofotometru (bangos ilgis 540 nm). Palyginamajam tirpalui naudojami 9 ml distiliuoto vandens ir 1 ml DNS reagento. Jei matuojant absorbcijas vertės viršija 0,999, atliekami dešimtkartiniai mėginių skiedimai su distiliuotu vandeniu.

Laktozės kiekiui nustatyti sudaryta kalibracinė kreivė. Jai sudaryti naudotas 1 proc. laktozės tirpalas. Paruošiama 10 mėgintuvėlių, į kuriuos pilama 1 ml skirtingos koncentracijos laktozės tirpalo (nuo 0 iki 0,2 proc.) ir 1 ml DNS reagento. Mėgintuvėlių turinys kaitinamas vandens vonioje, 15 min. (80 °C temperatūroje). Gauti tirpalai šalto vandens srove atvėsunami iki kambario temperatūros, vėliau į juos įpilama po 8 ml distiliuoto vandens. Gautų skirtingų spalvų tirpalų optinis tankis matuojamas spektrofotometru ( $OD_{540}$ ). Iš gautų duomenų, sudaroma kalibracinė kreivė, kurios X ašyje pažymėta absorbcija atitiktą Y ašyje pažymėtą laktozės koncentraciją. Iš gautos kalibracinės kreivės užrašoma lygtis ir nustatomas kreivės koreliacijos koeficientas – R, pagal kurį bus sprendžiama, ar kalibracinė kreivė gali būti naudojama, siekiant įvertinti laktozės koncentraciją. Pabrėžtina, kad kalibracinė kreivė tiksčiausia, kai R vertė būna arčiausiai vienetui.

### 2.3. Acto rūgšties nustatymas

**Medžiagos.** Iš koncentruotos 96 proc. sieros rūgšties pagaminamas 5 proc. sieros rūgšties tirpalas. Iš natrio hidroksido druskos pagaminamas 0,1 N NaOH tirpalas. Distiliavimui naudotas „Behr S4“ įrenginys (*Behr Labor Technik GmbH*, Vokietija) ir stiklinės biuretės.

**Ekspirimentų eiga.** Acto rūgšties nustatymui fermentuoti laktozės melasos, sūrinių išrūgų mėginiai (po 100 ml kiekvieno mėginio) įpilama į „Erlenmeyer“ kolbą, pridedant 2 proc. PRB (2 ml) nuo mėginio tūrio. Po to mėginiai dedami į termostatą, kuriame palaikoma 37 °C

temperatūra. Acto rūgšties nustatymui, po 24 ir 48 val. fermentacijos, analizei paimta po 25 ml tiriamų mėginių. Mėginių paruošimas distiliavimui atliktas taip:

- 1) į distiliavimo kolbą įpilama 25 ml mėginio;
- 2) tada įpilama 50 ml distiliuoto vandens;
- 3) vėliau pridedama 3 ml 5 proc. sieros rūgšties (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Kolba su turiniu dedama į distiliavimo įrenginį ir pradedama distiliavimo procedūra, pasirinkus tinkamą distiliavimo programą (80 proc. galia, trukmė – 540 sek.). Vėliau distiliatas titruojamas 0,1 N natrio hidroksidu (NaOH), naudojant kaip indikatorių 1 proc. fenolftaleiną (3-4 lašus). Svarbu, kad tirpalas pasidarytų rožinis ir spalva neišnyktų distiliuojant bent 1 min.

Apskaičiuojant acto rūgšties koncentraciją, buvo naudojamos žemiau pateiktos formulės (žr. 2.1., 2.2. formules).

$$\mathbf{2.1. formulė.} \quad X = \frac{a \cdot K \cdot 100 \cdot 0,06}{m} \cdot g \text{ AcOH}/100 \text{ ml}$$

a – 0,1 N NaOH kiekis, sunaudotas distiliato titravimui, ml;

K – titracijos koeficientas;

m – naudotas mėginio tūris, ml.

$$\mathbf{2.2. formulė.} \quad Y = \frac{X}{M} \cdot 1000, mM$$

M – AcOH, molekulinė masė, g/mol.

#### **2.4. Pieno rūgšties L(+) ir D(-) izomerų tyrimas**

Pieno rūgšties (PR) L(+) izomero ir D(-) izomero koncentracijos nustatomos pagal fermentinį testą (Megazyme International Ireland, Bray Business Park, Bray, Co, Wicklow, IRELAND 2012). PR izomerų nustatymas atliekamas nuo 0,5 iki 30 μg L(+) arba D(-) PR diapazone. Mėginio tūris – 1,50 ml, tai atitinka PR L(+) ir D(-) izomerų koncentracijas (0,107–0,214 mg/l). Aptikimo riba – 0,214 mg/l, ji gaunama iš absorbcijos 0,010 ir didžiausio mėginio tūrio 1,50 ml skirtumo. Šio tyrimo metu paruošti tuščias ir tiriami mėginiai.

*Analizės atlikimo tvarka ir parametrai:* bangos ilgis – 340 nm; kiuvetės – 1 cm šviesos kelias (iš stiklo arba plastmasės); temperatūra apie 25 °C; galutinis tūris – 2,26 ml L(+) pieno rūgščiai ir 2,24 ml D(-) pieno rūgščiai; tirpalo mėginys – 0,5–30 μg bendrai PR kiuvetėje (0,1–1,5 ml mėginio tūryje).

Tyrimui mėginys paruošiamas šia tvarka (žr. 2.3. lent.):

1. Į kiuvetę įpilama 1,5 ml distiliuoto vandens, 0,1 ml tiriamojo mėginio ir Megazyme testo reagentai: 1 tirpalas (buferis) – 0,5 ml, 2 tirpalas (NAD<sup>+</sup>) – 0,1 ml, 3 suspensija (D-GPT) – 0,02 ml). Turinys, esantis kiuvetėje, sumaišomas ir laikomas 3 min.
2. Tada matuojama absorbcija (A<sub>1</sub>).
3. Toliau į tą pačią kiuvetę įpilama 5 suspensija (D-LDH) – 0,02 ml, vėl sumaišoma ir laikoma dar 5 min.
4. Vėl matuojama absorbcija (A<sub>2</sub>).
5. Išmatavus antrą absorbciją, į kiuvetę įpilama paskutinė 4 suspensija (L-LGH) Po antros absorbcijos matavimo į kiuvetę įpilamas paskutinis reagentas – 4 suspensija (L-LGH) – 0,02 ml. Kiuvetė dar kartą gerai sumaišoma ir laikoma 10–15 min.
6. Trečią kartą matuojama absorbcija (A<sub>3</sub>).
7. Paruošiamas tuščias mėginys, tačiau vietoj tiriamojo mėginio įpilama 0,1 ml distiliuoto vandens.

**2.3. lentelė.** Tiriamojo ir tuščio mėginių paruošimo tvarka

I kiuvetę pilama	Tuščias mėginys	Tiriamas mėginys
Distiliuotas vanduo (~ 25 °C)	1,60 ml	1,50 ml
Tiriamas mėginys	–	0,10 ml
Tirpalas 1 (buferis)	0,50 ml	0,50 ml
Tirpalas 2 (NAD <sup>+</sup> )	0,10 ml	0,10 ml
Suspensija 3 (D-GPT)	0,02 ml	0,02 ml
Sumaišoma, praėjus 3 min. matuojama absorbcija (A <sub>1</sub> ). Eksperimentas tęsiamas:		
Suspensija 5 (D-LDH)	0,02 ml	0,02 ml
Sumaišoma, praėjus 5 min. matuojama absorbcija (A <sub>2</sub> ). Eksperimentas tęsiamas:		
Suspensija 4 (L-LGH)	0,02 ml	0,02 ml
Sumaišoma, praėjus 10–15 min. matuojama absorbcija (A <sub>3</sub> )		

Apskaičiuojamas absorbcijų skirtumas (A<sub>2</sub>–A<sub>1</sub>) tarp tiriamojo mėginio (sūrinių išrūgų, laktozės melasos) ir tuščiojo mėginio. Iš absorbcijų skirtumo, atėmus tuščio mėginio absorbciją, gaunama ΔA<sub>D</sub>-pieno rūgštis.

Apskaičiuojamas absorbcijų skirtumas (A<sub>3</sub>–A<sub>2</sub>) tarp tiriamojo mėginio (sūrinių išrūgų, laktozės melasos) ir tuščio mėginio. Iš absorbcijų skirtumo atėmus tuščio mėginio absorbciją, gaunama ΔA<sub>L</sub>-pieno rūgštis.

D (-) ir L (+) pieno rūgšties stereoizomerų koncentracijos yra apskaičiuojamos pagal žemiau pateiktą formulę (žr. 2.3. formulę):

$$\text{2.3. formulė. } c = \frac{V \cdot MW}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A_{D\text{-pieno rūgštis}} \quad \text{g/l}$$

V – galutinis tūris, ml

MW – pieno rūgšties molekulinė masė, g/mol

$\epsilon$  – ekstinkcijos koeficientas NADH 340 nm

d – šviesos kelias, cm

v – tiriamo mėginio tūris, ml

D(-) pieno rūgščiai nustatyti naudota tokia formulė:

$$\mathbf{2.4. formulė.} \quad c = \frac{2,24 \cdot 90,1}{6300 \cdot 1,0 \cdot 0,1} \cdot x = 0,3204 \cdot \Delta A_{D-\text{pieno rūgštis}} \text{ g/l}$$

L(+) pieno rūgščiai nustatyti naudota tokia formulė

$$\mathbf{2.5. formulė.} \quad \frac{2,26 \cdot 90,1}{6300 \cdot 1,0 \cdot 0,1} \cdot x = 0,3232 \times \Delta A_{L-\text{pieno rūgštis}} \text{ [g/l]}$$

Jei eksperimento metu buvo atlikti skiedimai, rezultatas dauginamas iš skiedimo koeficiento (10, 100, 1000 ir t.t.).

## **2.5. Lakiųjų riebalų rūgščių nustatymas dujų chromatografiniu metodu**

LRR nustatymui fermentacijos metu, įpilama 100 ml kiekvieno tiriamo substrato (fermentuotos laktozės melasos ar fermentuotų sūrinių išrūgų) į „Erlenmeyer“ kolbą ir pridedama 2 proc. bakterijų (2 ml) nuo mėginio tūrio. Po to mėginiai dedami į termostatą, kuriame palaikoma 37 °C temperatūra. Po 48 val. fermentacijos, paimama analizei po 40 ml visų fermentuotų mėginių. Mėginių paruošimas LRR nustatymui chromatografijos metodu atliekamas tokiu nuoseklumu:

1. Į kiekvieną mėgintuvėlį su fermentuotais mėginiais įpilama po 5 ml heksano, nes jis yra geras lipidų tirpiklis. Mišiniai intensyviai plakami 2 minutes
2. Suplakti mėginiai centrifuguojami 5 min. x 6000 rpm.
3. Jei po centrifugavimo neatsiskiria skaidrus heksano tirpalas, nusiurbus 7 ml skysčio nuo paviršinio mėginio sluoksnio, centrifuguojama dar kartą 5 min. x 14000.
4. Paimami užsukami plastikiniai mėgintuvėliai, išmatuojama jų masė be kamštelių ( $m_1$ ), jie taip pat ženklinami.
5. Po centrifugavimo su pipete nuo mėginių nusiurbiami skaidrūs vandeninio heksano sluoksniai su ištirpusiais lipidais ir supilami į plastikinius mėgintuvėlius.
6. Heksanas išgarinamas, naudojant skystą azotą. Tirpiklis pašalinamas, o lipidai lieka ant mėgintuvėlio dugno (kaip nuosėdos).

7. Dar kartą nustatoma mėgintuvėlių masė ( $m_2$ ) ir apskaičiuojama lipidų, tiriamuose mėginiuose, koncentracija.
8. Ant nuosėdų užpilama 0,5 ml metanolinio NaOH (2g/l). Vėliau mėginiai purtomi ir dedami į 60 °C laipsnių termostatą. Po 15 min. mėginiai papildomai purtomi ir dedami į termostatą dar 15 min.
9. Į mėgintuvėlius įpilama po 4 ml sotos NaCl ir 1 ml heksano. Centrifuguojama 5 min. x 14000. Po centrifugavimo nusiurbiamas 1 ml skysčio nuo mėginių paviršiaus ir atliekama analizė maisto mokslo ir technologijos katedroje esančiu dujų chromatografu („HRGC 5300 mega series“, Italija).

**Dujų chromatografijos eiga.** Prieš atliekant analizę dujų chromatografu, svarbu turėti tinkamai paruoštą kolonėlę, kurioje nebūtų priemaišų. Norint užtikrinti kolonėlės sterilumą, ją reikia 2–3 kartus praplauti grynu heksanu ir tik tada įdėti mėginį. Praplovus kolonėlę, galima atlikti paruoštų mėginių chromatografinę analizę.

Tam tikslui su chromatografijai skirtu švirkštu paimama 1  $\mu$ l mėginio. Svarbu mėginį paimti taip, kad nepatektų oro burbuliukų, nes jie gali iškraipyti rezultatus. Mėginys suleidžiamas į chromatografą ir paleidžiama iš anksto nustatyta analizės programa (žr. 2.3. pav.).

```

MN= 0.      REM FE= 1.      CH= "A" PS= 1.
NM  = "RIEBA"   NM(1)= "LU R "   NM(2)= "METIL"
NM(3)= "ESTER"  NM(4)= "IAI  "
PW  = 6.        PT  = 250.      RN  = 17.
IX  = 18.       OD  = 1.        PH  = 0.
TB  = 0.        MA  = 500.      LS  = 0.
SI  = 0.

TT(1)= 0.      TF(1)="AZ"      TV(1)= 1.
TT(2)= 0.02    TF(2)="II"      TV(2)= 1.
TT(3)= 11.     TF(3)="II"      TV(3)= 0.
TT(4)= 66.     TF(4)="ER"      TV(4)= 1.

```

**2.3. paveikslas.** Programa, kuri taikyta LRR chromatografinėi analizei

Įleidus mėginį, švirkštas plaunamas grynu heksanu. Gautos chromatogramos analizuotos, vertinant smailių išėjimų laikus ir koncentracijas. Gautos skirtingų chromatogramų smailės gali skirtis, esant skirtingoms tiriamuose mėginiuose lipidų koncentracijoms, todėl svarbu įvertinti tiriamuose mėginiuose lipidų mases prieš ir po fermentacijos. Analizuojamose chromatogramose smailės pateikia procentinę junginio mėginyje išraišką. Tiriamų mėginių tūris – 40 ml, todėl, norint apskaičiuoti junginių koncentracijas mg/l, svarbu gautą rezultatą padauginti 25 kartus.

## 2.6. Antigrybinio aktyvumo nustatymas

Pradiniame antigrybinio aktyvumo vertinimui etape, atliktas indikatorinių mikroskopinių grybų pagausinimas sąlygose, pateiktose (žr. 2.4. lent.).

**2.4. lentelė.** Indikatoriniai mikroskopiniai grybai, naudojami antigrybinio aktyvumo nustatymui ir jų dauginimuisi optimalios temperatūros bei terpės

Pelėsinis grybas	Optimali temperatūra	Augimo terpė
<i>Fusarium graminearum C</i>	25 °C	PDA
<i>Fusarium graminearum D</i>	25 °C	PDA
<i>Fusarium graminearum E</i>	25 °C	PDA
<i>Fusarium graminearum F</i>	25 °C	PDA
<i>Fusarium culmorum</i>	25 °C	PDA
<i>Fusarium avenaceum</i>	20–25 °C	PDA
<i>Fusarium nivale</i>	22 °C	PDA
<i>Mucor mucedo</i>	25 °C	PDA
<i>Rhizopus oryzae</i>	28–30 °C	SDA
<i>Penicillium viridicatum</i>	25 °C	SDA
<i>Penicillium spinulosum</i>	25 °C	SDA
<i>Penicillium palitans</i>	25 °C	SDA
<i>Alternaria alternate</i>	25 °C	SDA
<i>Cladosporium herbarum</i>	18–28 °C	SDA
<i>Aspergillus terreus</i>	35–40 °C	SDA
<i>Aspergillus versicolor</i>	22–26 °C	SDA
<i>Aspergillus funigatus</i>	25 °C	SDA

### 2.6.1. Indikatorinių mikroskopinių grybų dauginimas

Indikatorinių mikroskopinių grybų dauginimas vykdytas aseptinėse sąlygose, tačiau ne laminare (vengiant užkrėtimo), o naudojant spiritą ir liepsnelę. Dezinfekavus metalinę lopetėlę, nedidelis mikroskopinio grybo kiekis perkeltas ant naujos Petri lėkštelės su PDA terpe, lėkštelė buvo greitai uždengiama. Kiekviena kultūra dauginta tokiu pačiu principu ir po to dedama į termostatą („Sheldon Manufacturing“, Inc.), kuriame buvo kultivuojami septynias paras.

### 2.6.2. Antigrybinio aktyvumo nustatymo eiga

Pagausinti indikatoriniai mikroskopiniai grybai ruošti eksperimentui. Tam tikslui buvo naudojamas peptono tirpalas (200 ml vandens ištirpinti 2 g peptono ir 1 g NaCl). Tirpalas išpilstytas į mėgintuvėlius (po 10 ml), kurie buvo autoklavuojami 121 °C temperatūroje 15 min.

Apartas tyrimas vykdytas aseptinėmis sąlygomis, sterilizuojant įrankius prieš kiekvieną tolesnį veiksmą. Peptono tirpalas (esantis viename mėgintuvėlyje) supilamas į vieną Petri

lėkštelę su pagausintu indikatoriniu mikroskopiniu grybu. Labai atsargiai, naudojant vienkartinę kilpelę, grybas atskiriamas nuo terpės, o gautas tirpalas supilamas atgal į mėgintuvėlį. Ant naujų Petri lėkštelių su PDA terpe, sėjami nauji indikatoriniai mikroskopiniai grybai, esantys peptono tirpale. Iš mėgintuvėlių paimama po 100 μl tirpalo ir pilama į Petri lėkšteles. Su stikliniu sklaidytuvu turinys paskirstomas po visą terpės paviršių. Tada metaliniu vamzdeliu padaroma po 4 šulinėlius kiekvienoje terpėje (maždaug 5 mm skersmens). Į šulinėlius pipete įpilama po 100 μl tiriamojo mėginio (fermentuotos laktozės melasos ar sūrinių išrūgų), tada lėkštelės dedamos į termostatą, kuriame palaikoma 25 °C temperatūra.

Per 24 val. dalis mėginio išgaruoja, todėl į šulinėlius įpilama papildomai 100 μl tiriamojo mėginio, kuris iškart vėl dedamas į termostatą. Po 48 val. inkubacijos lėkštelės išimamos iš termostato ir apverčiamos. Su liniuote matuojama esanti aplink šulinėlį inhibicijos zona. Kuo didesnė inhibicijos zona, tuo tiriamas mėginys pasižymi didesniu antigrybiniu aktyvumu.

## **2.7. Duomenų apdorojimas tyrimų patikimumui įvertinti**

Duomenys apdoroti statistiškai, naudojant „Microsoft Excel 2010“ programą. Vidutinių verčių patikimumas įvertintas naudojant *TTEST* funkciją. Skirtumas patikimas, kai  $p < 0,5$ . Taip pat įvertinta *Pearson* koreliacija tarp nustatytų rodiklių. Koreliacijos koeficientas –  $r$ . Jei  $r > 0$ , koreliacija teigiama, nes didėjant vienoms reikšmėms didėja ir kitos reikšmės, jei  $r < 0$ , koreliacija neigiama, nes, mažėjant vieniems atsitiktiniams dydžiams, kiti taip pat mažėja. Jei  $r = 0$ , tiesinio ryšio nėra.

### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Galaktozidazinių aktyvumų pokyčiai laktozės melasos ir išrūgų PRB fermentacijos metu

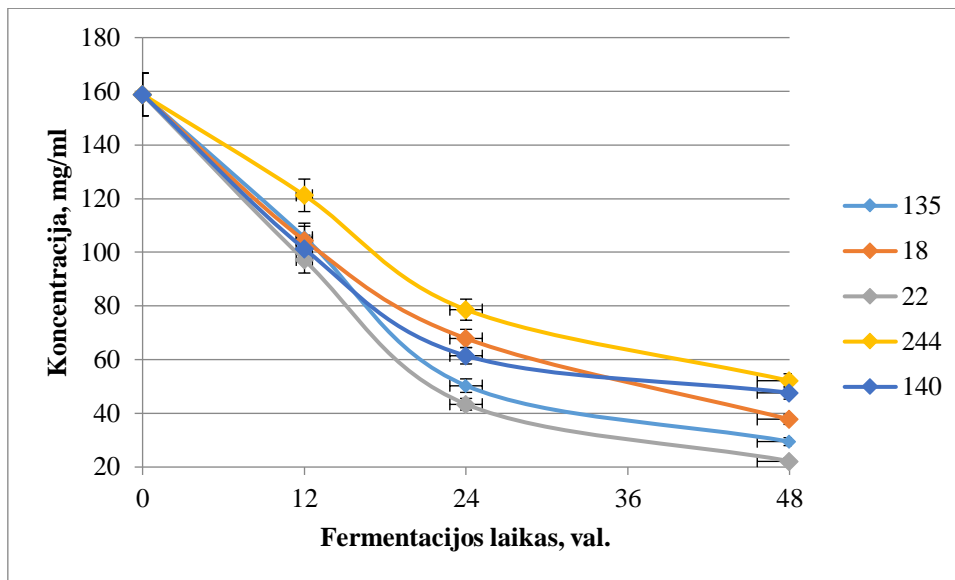
Laktozės koncentracijos sūrinių išrūgų ir laktozės melasos PRB fermentacijos metu (naudojant įvairias PRB) analizuotos tiriamuose mėginiuose, periodiškai imtuose kas 12, 24 ir 48 valandas), ir vertintos pagal formulę, gautą iš sudarytos laktozės kalibracinės kreivės:  $y = 101,19x - 0,5929$  ( $x$  – absorbcija,  $y$  – laktozės koncentracija) (žr. 1 priedą).

Eksperimento metu analizuotas skirtingų PRB gebėjimas skaidyti laktozę į monosacharidus, kurie fermentacijos metu naudojami įvairių metabolizmo produktų, įskaitant LRR, susidarymui.

Pradiniame etape analizuota laktozės koncentracija substratuose prieš fermentaciją. Nustatyta, kad laktozės melasoje esti didesni laktozės kiekiai nei sūrinėse išrūgose ir jie sudaro atitinkamai 184,79 mg/ml ir 158,84 mg/ml (žr. 3 priedą).

Gauti laktozės koncentracijos pokyčių sūrinių išrūgų fermentacijos metu tyrimų rezultatai pateikti 3.1. pav. Iš gautų rezultatų, matoma, kad sparčiausiai laktozės koncentracija mažėjo *P. pentosaceus* LUHS22 fermentuojamuose mėginiuose (nuo 158,84 mg/ml iki 22,22 mg/ml). Be to, geru galaktozidaziniu aktyvumu, sprendžiant pagal laktozės koncentracijos sumažėjimą, pasižymėjo *L. plantarium* LUHS135. Fermentuojant sūrinės išrūgas su šia bakterija, laktozės koncentracija sumažėjo iki 29,47 mg/ml. Vidutiniu gebėjimu skaidyti laktozę į monosacharidus pasižymėjo *L. plantarium* LUHS18 ir *L. brevis* LUHS140. Fermentuojant su šiomis bakterijomis, laktozės koncentracija sumažėjo atitinkamai iki 37,78 mg/ml ir 47,68 mg/ml. Lėčiausiai laktozę į monosacharidus skaido *L. paracasei* LUHS244. Naudojant šią PRB, laktozės koncentracija fermentacijai sumažėjo nuo 158,84 mg/ml iki 52,14 mg/ml.

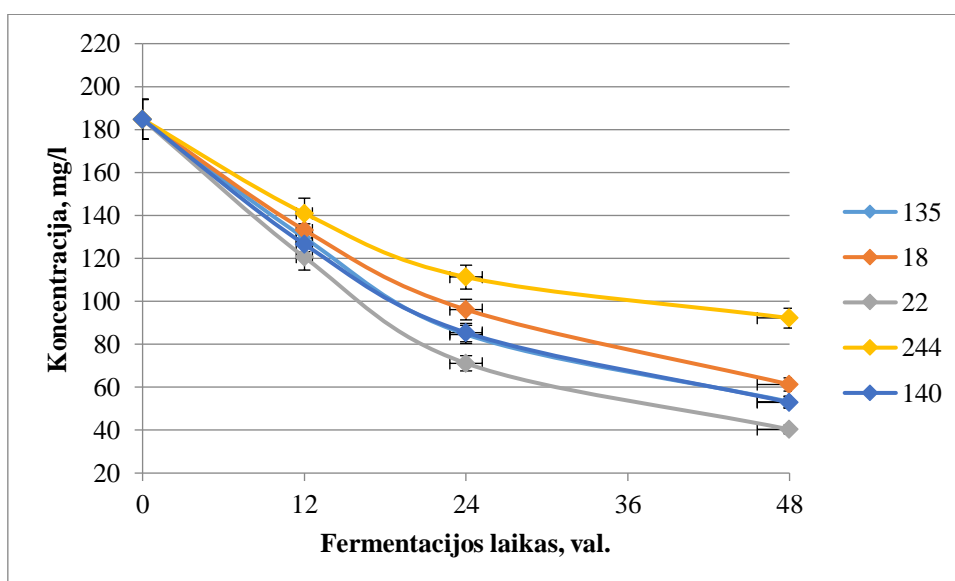




**3.1. paveikslas.** Laktozės koncentracijos pokyčiai sūrinių išrūgų PRB fermentacijos metu

Laktozės melasos PRB fermentacijos metu analogiškai buvo tiriami laktozės koncentracijos pokyčiai.

Gauti laktozės koncentracijos pokyčių laktozės melasos PRB fermentacijos metu, naudojant įvairias PRB padermes, tyrimų rezultatai pateikti 3.2. pav. Rezultatai rodo, kad didžiausiu galaktozidaziniu aktyvumu pasižymėjo *P. pentosaceus* LUHS22 (laktozės koncentracija sumažėja nuo 184,79 mg/ml iki 40,32 mg/ml), o blogiausiai laktozę skaido – *L. paracasei* LUHS244 (laktozės koncentracija sumažėja iki 92,16 mg/ml). Statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta, naudojant fermentacijai *L. plantarium* LUHS135, *L. plantarium* LUHS18, ir *L. brevis* LUHS140 padermes.



**3.2. paveikslas.** Laktozės koncentracijos kitimas, fermentuojant laktozės melasą skirtingomis pieno rūgšties bakterijomis

Lyginant tyrimų rezultatus, gautus naudojant skirtingus substratus stebima tendencija, kad, esant didesnei disacharidų substrate koncentracijai, visoms PRB juos sunkiau skaidyti. Fermentacijos metu susidaro mažiau monosacharidų, mažesnė jų dalis manoma, kad gali būti panaudojama biokonversijai į kitus produktus fermentacijos proceso metu.

### 3.2. Substratų įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui, jų kokybinei ir kiekybinei sudėčiai

Šiame skyriuje aptariami chromatografiniai laisvųjų riebalų rūgščių (LRR) tyrimų rezultatai, siekiant išsiaiškinti substratų įtaką šių komponentų susidarymui, naudojant fermentacijai skirtingas PRB padermes. Atlikus nefermentuotų substratų (sūrinių išrūgų ir nefermentuotos laktozės melasos) LRR analizę, gautos chromatogramos pateiktos 4, 5 prieduose. Palyginus gautus šių mėginių analizės metu smailių išėjimo laikus su standartinės chromatogramos smailių išėjimo laikais (žr. 6 priedą), identifikuotos LRR ir apskaičiuotos jų koncentracijos tiriamuose mėginiuose (žr. 7 priedą). PRB fermentacijos efektyvumo (pagal LRR susidarymą) vertinimui atrinktos didžiausią koncentraciją tirtuose mėginiuose turinčios LRR (žr. 3.1. lentelę). Išrūgose daugiausiai nustatyta miristino, palmitino, stearino, oleino ir linolo, o laktozės melasoje - palmitino, stearino, oleino, linolo ir linoleino. Kitų riebalų rūgščių neaptikta arba rasti tik jų pėdsakai, todėl išsamiau šios riebalų rūgštys tolesnio eksperimento metu nepriimtos dėmesiui.

**3.1. lentelė.** Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijos prieš PRB fermentaciją

Substratas	Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijos, mg/l					
	Miristinas	Palmitinas	Stearinas	Oleinas	Linolas	Linoleinas
Sūrinės išrūgos	4,05	19,275	7,725	27,875	16,875	–
Laktozės melasa	–	11,725	3,773	29,7	25,6	2,4

LRR analizuotos chromatografiškai tiriamų substratų PRB fermentacijos metu (po 48 val.), naudojant įvairias PRB padermes. Gautos chromatogramose junginių smailės bei jų išėjimo laikai pateikti 8 priede. Pagal junginių smailių plotį ir jų kiekį tiriamajame mėginyje, apskaičiuotos LRR koncentracijos tirtuose mėginiuose po PRB fermentacijos (žr. 3.2., 3.3. lenteles).

**3.2. lentelė.** Pagrindinių laisvųjų riebalų rūgščių, esančių PRB fermentuotoje laktozės melasoje (po 48 val.), koncentracijos

Kultūra	Laisvosios riebalų rūgšties koncentracija mg/l				
	Palmitinas	Stearinas	Oleinas	Linolas	Linoleinas
140	10,7	2,36	28,825	27,5	6,425
18	10,375	2,59	35,325	25,9	4,3
135	8,6	2,575	19,8	20,7	11,495
22	10,1	2,025	36,8	32,95	4,73
244	15,1	2	34,525	46,15	2,975

**3.3. lentelė.** Pagrindinių laisvųjų riebalų rūgščių, esančių PRB fermentuotose sūrinėse išrūgose (po 48 val.), koncentracijos

Kultūra	Laisvosios riebalų rūgšties koncentracija, mg/l				
	Miristinas	Palmitinas	Stearinas	Oleinas	Linolas
140	2,725	12,425	14,725	29,325	40,9
18	5,7	8,975	6,175	28,075	25,875
135	2,55	8,5	3,575	32,375	19,275
22	2,55	21,575	10,275	49,65	11,55
244	0,64	14,8	9,4	41,35	56

Iš rezultatų matyti, kad skirtingi substratai sąlygoja skirtingą laisvųjų riebalų rūgščių kokybinę ir kiekybinę sudėtį. Chromatografiniai tyrimų rezultatai rodo, kad sūrinėse išrūgose aptinkama daugiau miristino, palmitino ir stearino, o laktozės melasoje – linolo ir linoleino. Pažymėtina, kad oleino koncentracija abiejuose substratuose yra panaši (sūrinėse išrūgose 27,875 mg/l, o laktozės melasoje 29 mg/l). Kitame etape išsamiau bus vertinama PRB padermių įtaka LRR susidarymui.

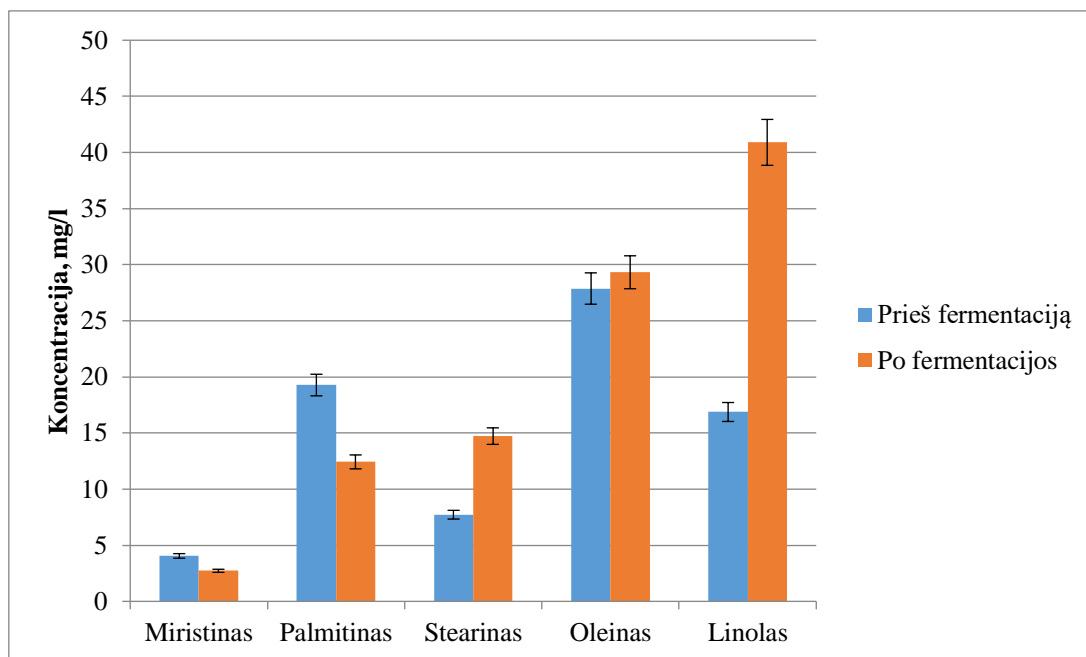
### **3.3. Laktozę konvertuojančių pieno rūgšties bakterijų savybės gaminti laisvasias riebalų rūgštis**

#### **3.3.1. *Lactobacillus brevis* LUHS140 fermentacijos įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui**

*L. brevis* LUHS140 sūrinių išrūgų fermentacijos metu gautos chromatogramos pavyzdys pateiktas 9 priede. Išanalizavus chromatogramas, gautos LRR koncentracijos palygintos su koncentracijomis prieš fermentaciją (žr. 3.3. pav.).

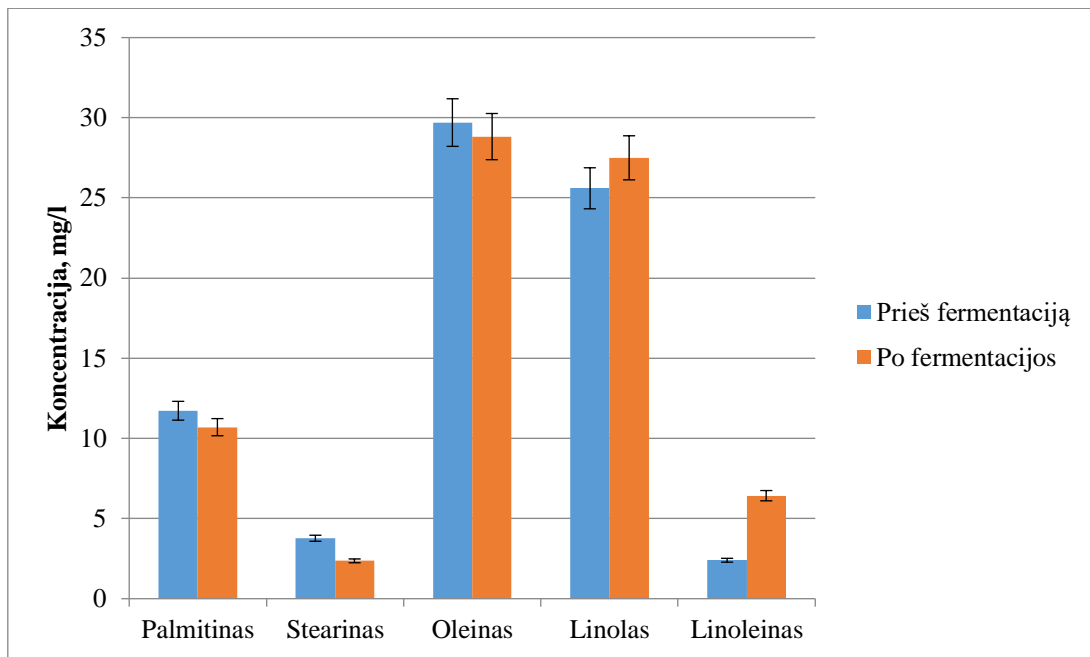
Nustatyta, kad fermentacijos metu stebima miristino bei palmitino rūgščių koncentracijos mažėjimo tendencija. Tuo tarpu stearino koncentracija po fermentacijos padidėjo dvigubai, t. y. nuo 7,725 mg/l iki 14,725 mg/l. Didžiausias po fermentacijos fiksuotas linolo rūgšties

koncentracijos padidėjimas (nuo 16,875 mg/l iki 40,9 mg/l). Oleino rūgštis gamybai fermentacija įtakos neturėjo.



**3.3. paveikslas.** Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijų sūrinėse išrūgose prieš fermentaciją ir po fermentacijos *L. brevis* LUHS140 palyginimas

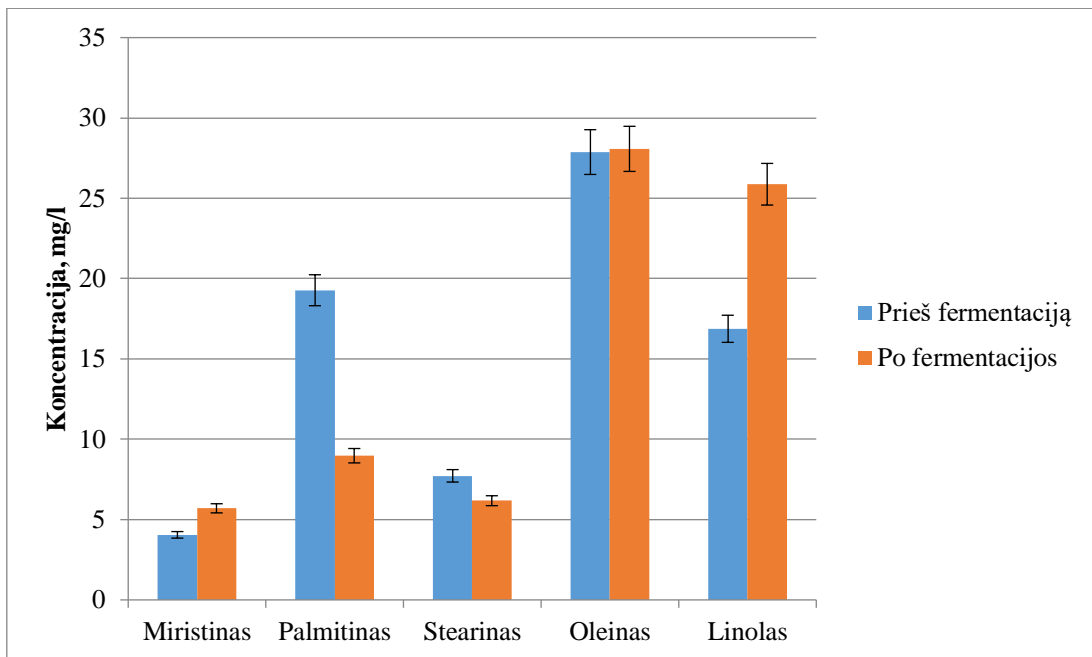
*L. brevis* LUHS140 fermentuotuose laktozės melasos mėginiuose gauti chromatografiniai LRR tyrimų duomenys pateikti 10 priede. Iš gautų rezultatų ( $p > 0,05$ ) išryškėjo LRR koncentracijų fermentuotoje laktozės melasoje, lyginant su sūrinėmis išrūgomis, skirtumai (žr. 3.4. pav.). Pažymėtina, kad laktozės melasos fermentacijos metu stebima palmitino ir oleino rūgščių koncentracijų mažėjimo tendencija, o linolo rūgštis koncentracijos didėjimas. Tačiau šių trijų riebalų rūgščių koncentracijų skirtumai statistiškai yra nereikšmingi. Reikšmingus koncentracijų skirtumus fermentacijos metu galima konstatuoti tik vertinant stearino ir linoleino rūgštis. Stearino koncentracija fermentacijos metu sumažėja iki 2,36 mg/l, o linoleino - padidėja iki 6,425 mg/l.



**3.4. paveikslas.** Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijų laktozės melasoje prieš fermentaciją ir po fermentacijos *L. brevis* LUHS140 palyginimas

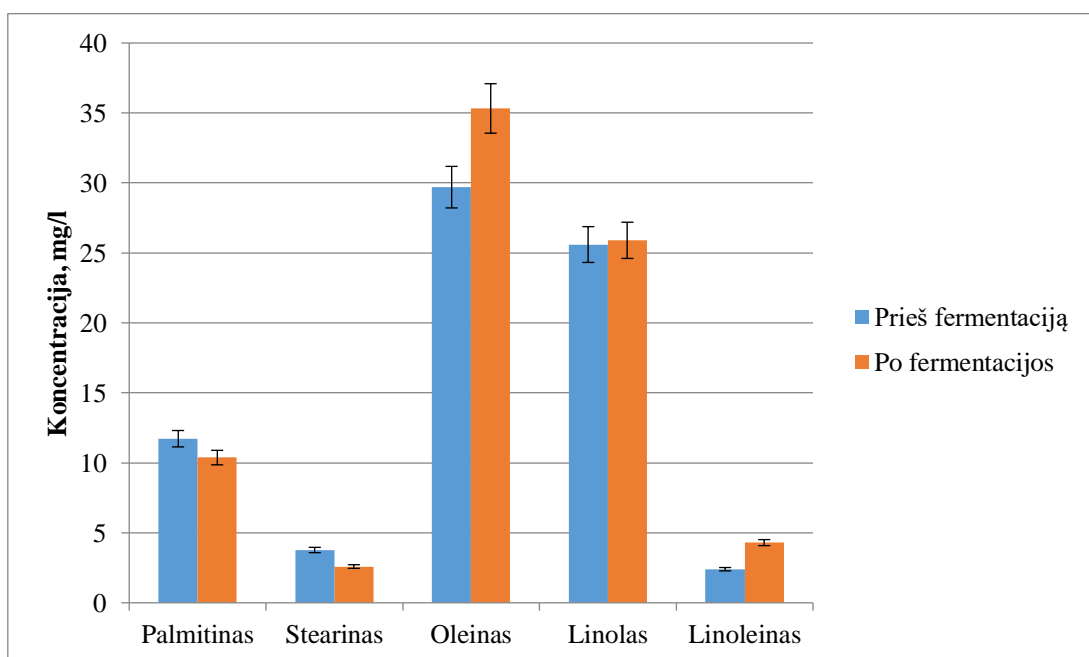
### 3.3.2. *Lactobacillus plantarium* LUHS18 fermentacijos įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui

*L. plantarium* LUHS18 fermentuotose sūrinėse išrūgose gautas LRR tyrimų chromatogramos pavyzdys pateiktas 11 priede. Gauti LRR tyrimų rezultatai ( $p > 0,05$ ) rodo, kad (žr. 3.5. pav.) PRB fermentuojant sūrinės išrūgas, miristino, stearino ir oleino koncentracijos po fermentacijos kinta nežymiai. Miristino riebalų rūgšties koncentracija nežymiai padidėja, o stearino – sumažėja. Po fermentacijos daugiausiai sumažėja palmitino koncentracija. Pažymėtina, kad prieš fermentaciją šios rūgšties koncentracija buvo 19,275 mg/l, o po fermentacijos – 8,975 mg/l. Oleino koncentracijos pokyčiai fermentacijos metu nustatyti statistiškai nereikšmingi.



**3.5. paveikslas.** Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijų sūrinėse išrūgose prieš fermentaciją ir po fermentacijos *L. plantarium* LUHS18 palyginimas

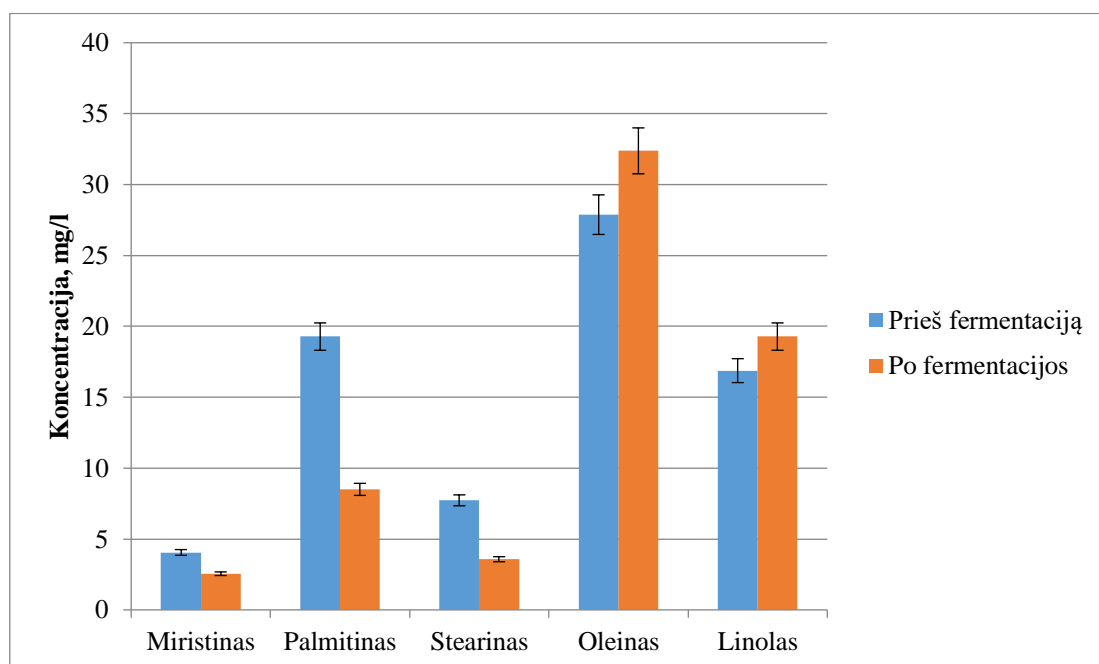
Išanalizavus kito substrato – laktozės melasos po fermentacijos LRR tyrimų rezultatus ( $p < 0,05$ ) (žr. 3.6. pav. ir chromatogramą 12 priede), matoma, kad *L. plantarium* LUHS18 fermentacija LRR susidarymui labai panaši į sūrinėse išrūgose fiksuotus šių komponentų pokyčius. Po fermentacijos palmitino ir stearino LRR koncentracijos nežymiai sumažėjo, o oleino ir linoleino riebalų rūgščių koncentracijos padidėjo, o linolo nepakito.



**3.6. paveikslas.** Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijų laktozės melasoje prieš fermentaciją ir po fermentacijos *L. plantarium* LUHS18 palyginimas

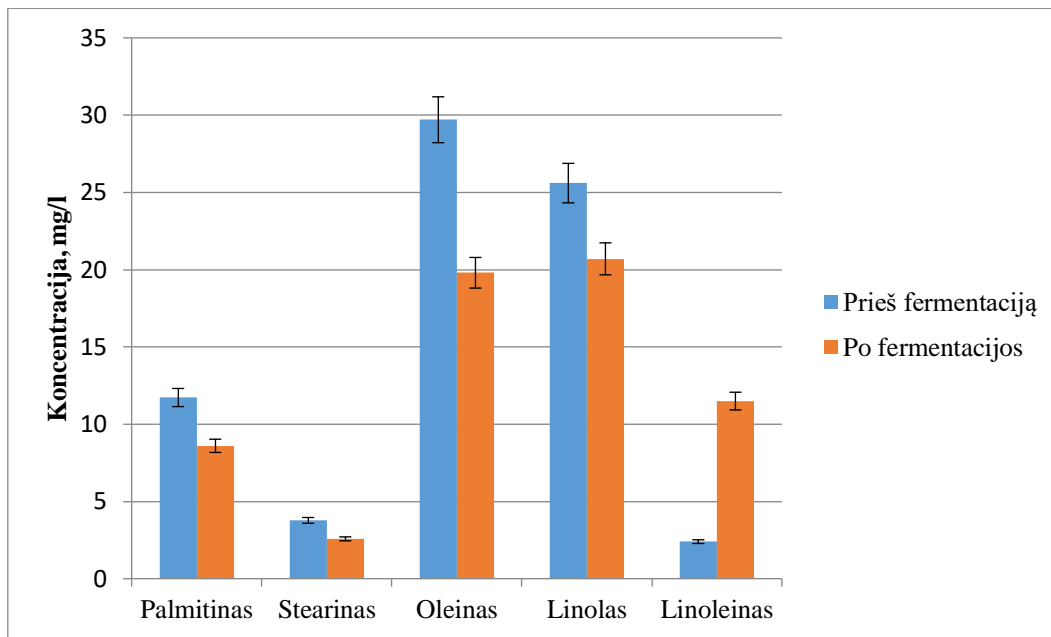
### 3.3.3. *Lactobacillus plantarium* LUHS135 fermentacijos įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui

Išanalizavus chromatogramą (žr. 13 priedą), gautą po sūrinių išrūgų *L. plantarium* LUHS135 fermentacijos, pastebėta, kad laike fermentacijos stebima tik oleino ir linolo riebalų rūgščių koncentracijos didėjimo tendencija (žr. 3.7. pav.). Pažymėtina, kad po fermentacijos aptiktas miristino, palmitino ir stearino riebalų rūgščių koncentracijos sumažėjimas. Labiausiai sumažėjo palmitino koncentracija (nuo 19,725 mg/l iki 8,5 mg/l). Oleino rūgšties koncentracija padidėjo nuo 27,875 mg/l iki 32,375 mg/l, o linolo – nuo 16,875 mg/l iki 19,275 mg/l



**3.7. paveikslas.** Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijų pokyčiai laktozės melasos *L. plantarium* LUHS135 fermentacijos metu (prieš ir po fermentacijos)

Iš *L. plantarium* LUHS135 fermentuotos laktozės melasos chromatogramos duomenų (žr. 14 priedą), pastebėta, kad fermentacijos metu intensyviai gaminama linoleninė riebalų rūgštis (žr. 3.8. pav.). Jos koncentracija padidėjo nuo 2,4 mg/l iki 11,495 mg/l. Tuo tarpu visų kitų riebalų rūgščių koncentracijos fermentacijos metu mažėjo.

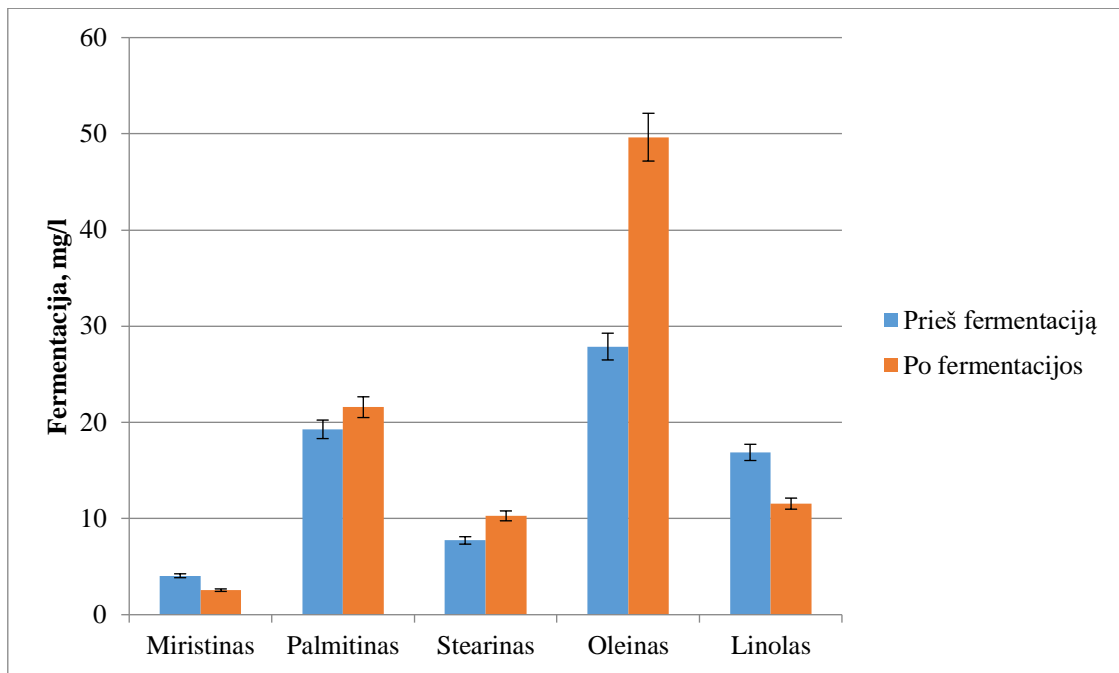


**3.8. paveikslas.** Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijų laktozės melasoje prieš fermentaciją ir po fermentacijos *L. plantarium* LUHS135 palyginimas

### 3.3.4. *Pediococcus pentosaceus* LUHS22 fermentacijos įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui

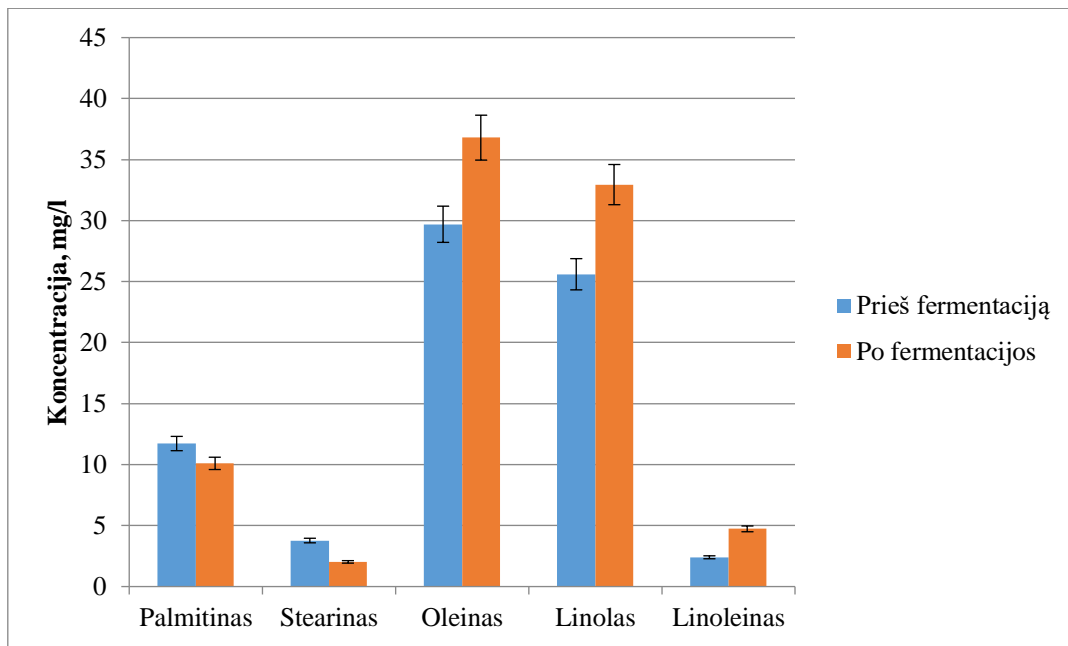
Išanalizavus *P. pentosaceus* LUHS22 fermentuotų sūrinių išrūgų LRR tyrimų chromatogramą (žr. 15 priedą), matyti, kad tai vienintelė (iš tiriamų) PRB, kuri fermentacijos metu gamina palmitino riebalų rūgštį (žr. 3.9. pav.) . Pastebėta, kad ši padermė taip pat gamina ir stearino riebalų rūgštį. Po fermentacijos, labiausiai padidėja oleino koncentracija, t. y. nuo 27,875 mg/l iki 49,65 mg/l. Visgi rezultatai rodo, kad miristino ir linolo riebalų rūgščių koncentracijos fermentacijos metu sumažėja. Palyginus LRR tyrimų rezultatus, gautus su kitomis PRB padermėmis, galima konstatuoti, kad *P. pentosaceus* LUHS22 yra vienintelė padermė, kurią naudojant linolo koncentracija fermentacijos metu sumažėjo nuo 16,875 iki 11,55 mg/l.





**3.9. paveikslas.** Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijų sūrinėse išrūgose prieš fermentaciją ir po fermentacijos *P. pentosaceus* LUHS22 palyginimas

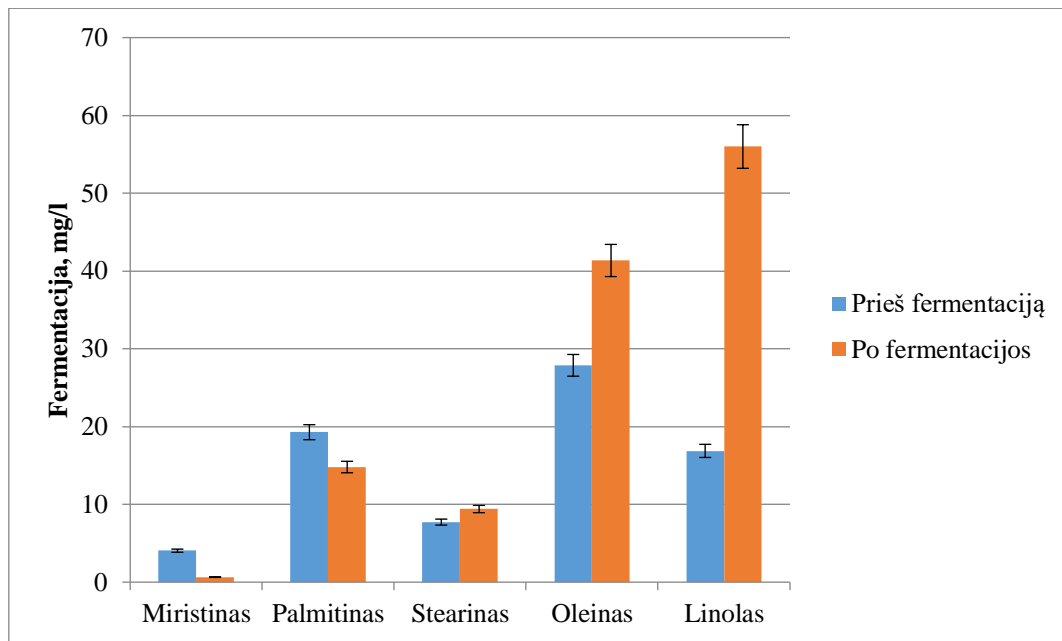
Išanalizuota *P. pentosaceus* LUHS22 fermentuotos laktozės melasos chromatogramos (žr. 16 priedą), rezultatai parodė, kad fermentacijos metu sumažėja palmitino ir stearino riebalų rūgščių koncentracijos (žr. 3.10. pav.). Kitoms trims tiriamoms LRR fermentacija padarė teigiamą poveikį. Oleino riebalų rūgšties koncentracija padidėjo nuo 29,7 mg/l iki 36,8 mg/l, linolo riebalų rūgšties koncentracija – nuo 25,6 mg/l iki 32,95 mg/l, o linoleino – nuo 2,4 mg/l iki 4,73 mg/l. Rezultatai statistiškai skiriasi patikimai ( $p < 0,05$ ).



**3.10. paveikslas.** Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijų laktozės melasoje prieš fermentaciją ir po fermentacijos *P. pentosaceus* LUHS22 palyginimas

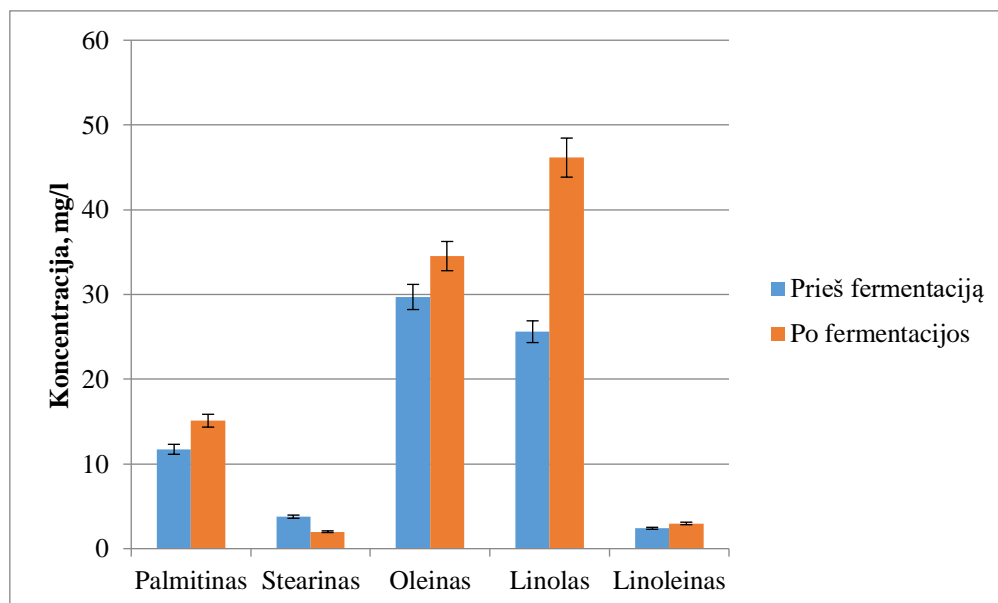
### 3.3.5. *Lactobacillus paracasei* LUHS244 fermentacijos įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui

Fermentuojant sūrinės išrūgas su *L. paracasei* LUHS244, gauta chromatograma (žr. 17 priedą). Išanalizavus duomenis, pastebėta, kad tai viena geriausiai LRR produkuojančių bakterijų (žr. 3.11. pav.). Miristino bei palmitino riebalų rūgščių koncentracijos po fermentacijos sumažėjo, tačiau padidėjo stearino, oleino ir linolo koncentracijos. Stearino koncentracija padidėjo palyginti nedaug, t. y. nuo 7,725 mg/l iki 9,4 mg/l. Oleino koncentracija padidėjo nuo 27,875 mg/l iki 41,35 mg/l, o linolo koncentracija padidėjo labiausiai. Prieš fermentaciją šios riebalų rūgšties koncentracija buvo 16,875 mg/l, o po fermentacijos – 56 mg/l. Atsižvelgiant į tai, teigtina, kad *L. paracasei* LUHS244 geriausiai linolo riebalų rūgštį išrūgose produkuojanti bakterija (iš visų tirtų). Rezultatai statistiškai skiriasi, nes  $p < 0,05$ .



**3.11. paveikslas.** Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijų sūrinėse išrūgose prieš fermentaciją ir po fermentacijos *L. paracasei* LUHS244 palyginimas

Laktozės melasos fermentacijai naudojant *L. paracasei* LUHS244, gauta chromatograma (žr. 18 priedą), kuri parodė, kad rezultatai, palyginus su kitų tirtų PRB rezultatais, yra geresni LRR susidarymo požiūriu. Pastebėta, kad fermentacijos metu daugiausia pasigamino linolo riebalų rūgštis. Jos koncentracija padidėjo beveik dvigubai, t. y. nuo 25,6 iki 41,35 mg/l (žr. 3.12. pav.). Kitų riebalų rūgščių, išskyrus stearino riebalų rūgštį, koncentracijos po fermentacijos taip pat didėjo. Rezultatai skiriasi statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ).



**3.12. paveikslas.** Laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijų laktozės melasoje prieš fermentaciją ir po fermentacijos *L. paracasei* LUHS244 palyginimas

Apžvelgus visų chromatogramų rezultatus, galima teigti, kad naudotos PRB skirtingai fermentuoja substratus ir turi skirtingą įtaką LRR susidarymui. Dauguma rezultatų yra statistiškai patikimi ( $p < 0,05$ ).

Pastebėta, kad PRB fermentacijų laike dažniausiai nebuvo fiksuojama reikšmingų palmitino rūgšties koncentracijos pakitimų. Dvi PRB – *Lactobacillus paracasei* LUHS244 ir *P. pentosaceus* LUHS22 – pasižymėjo didžiausiu LRR susidarymo pajėgumu (rezultatai skiriasi statistiškai t.y.  $p < 0,05$ ). Pažymėtina, kad, nors prieš fermentaciją stearino rūgšties koncentracijos substratuose yra nedidelės, tačiau PRB fermentacijos metu visos padermės šios riebalų rūgšties koncentraciją dar labiau mažino. Rezultatai parodė, kad visos tirtos PRB didžiausią įtaką turėjo linolo riebalų rūgšties koncentracijos didėjimui sūrinėse išrūgose ir linoleninės rūgšties – laktozės melasoje. Daugiausiai linolo riebalų rūgšties susidarė *L. paracasei* LUHS244 fermentacijos metu.

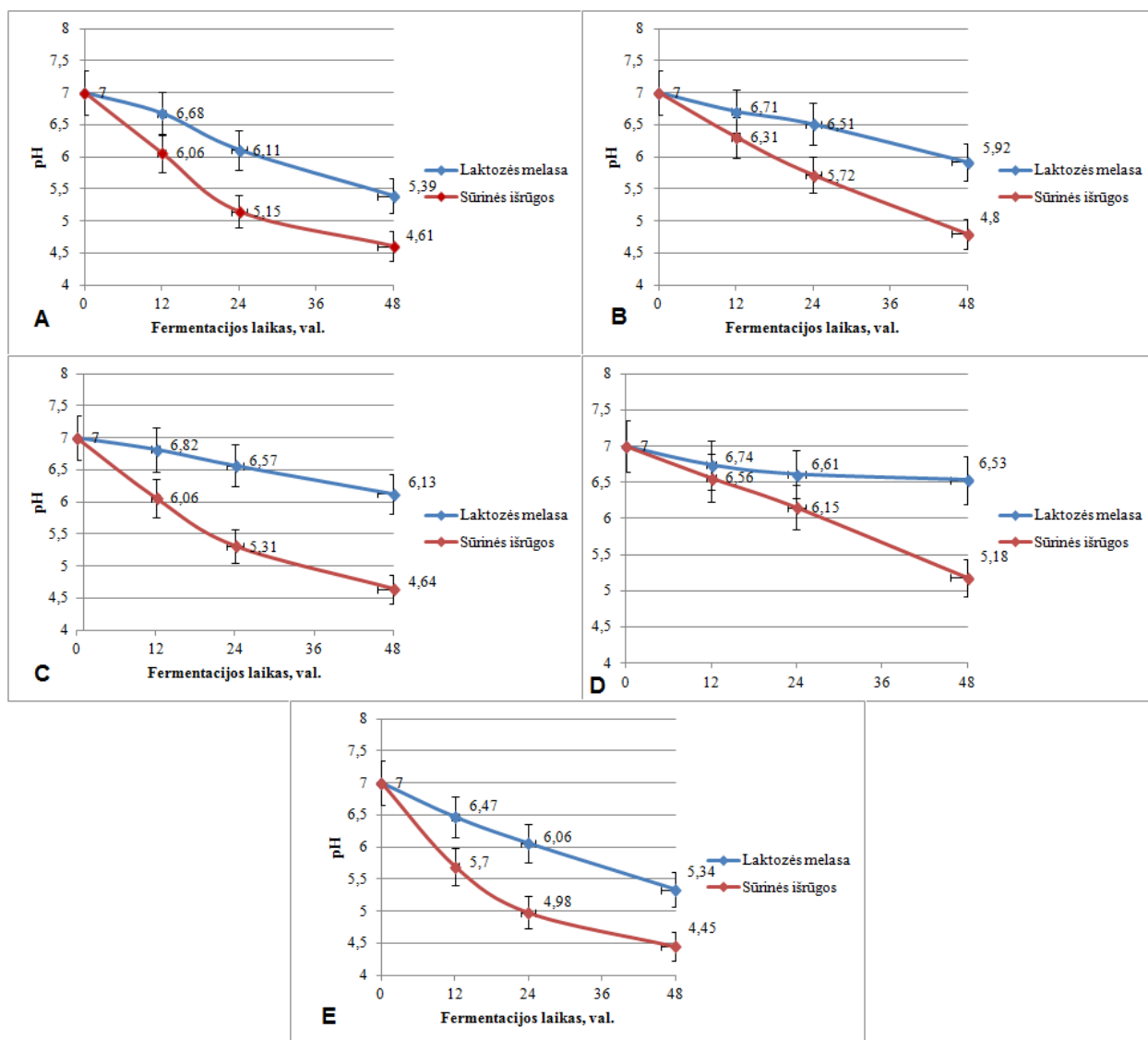
### **3.4. Pirminiai pieno rūgšties bakterijų fermentacijos metabolizmo produktai ir jų įtaka laisvųjų riebalų rūgščių susidarymui**

#### **3.4.1. Pieno rūgšties bakterijų padermės įtaka organinių rūgščių susidarymui**

Šio eksperimento metu buvo tirta, kaip fermentacijos metu skirtingos PRB keičia substratų terpės pH. Pagal pH pokyčius galime sąlyginai prognozuoti, koks pirminių fermentacijos produktų (acto ir pieno rūgšties) bei antrinių (LRR) kiekis biokonversijos būdu buvo pagamintas.

Gautuose, statistiškai reikšminguose rezultatuose, kurie pateikiami diagramose (žr. 3.13. pav.), palyginama, kaip ta pati PRB keičia skirtingų substratų pH. Šiuo atveju buvo palyginta, kaip turimos PRB *P. pentosaceus* LUHS22, *L. paracasei* LUHS244, *L. plantarium* LUHS135, *L. plantarium* LUHS18 ir *L. brevis* LUHS140 keičia sūrinių išrūgų ir laktozės melasos pH fermentacijos eigoje. Žiūrint į diagramas aiškiai matoma, kad visos bakterijos terpę rūgština labiau, kai substratui naudojamos sūrinės išrūgos. Labiausiai terpės pH sumažėja, kai fermentacijai naudojama *P. pentosaceus* LUHS22. Fermentuojant laktozės melasą, kai naudojama ši PRB, melasos pH sumažėja nuo 7 iki 5,34, o fermentuojant sūrinės išrūgas – sumažėja iki 4,45. Mažiausiai pH fermentacijos metu kinta, kai fermentacijai naudojama bakterija *L. paracasei* LUHS244. Naudojant minėtą bakteriją, laktozės melasos pH sumažėja nuo pH 7 iki pH 6,53, o sūrinių išrūgų – nuo pH 7 iki pH 5,18. Pastebėtina, kad keičiantis terpės pH kinta ir fermentacijos greitis. Kaip teigia mokslininkai, LRR gamyba iš nuotekų dažniausiai vykdoma rūgštinėje aplinkoje, kur pH svyruoja nuo 5,25 iki 6 [10, 44]. Be to, pH taip pat gali

turėti įtakos LRR rūgštims, kurios gaunamos rūgštiniame fermentacijos procese, ypač acto, propiono ir aviario rūgštims [10, 74–77].



### 3.13. paveikslas. pH kitimo palyginimas fermentacijos eigoje, naudojant skirtingus substratus.

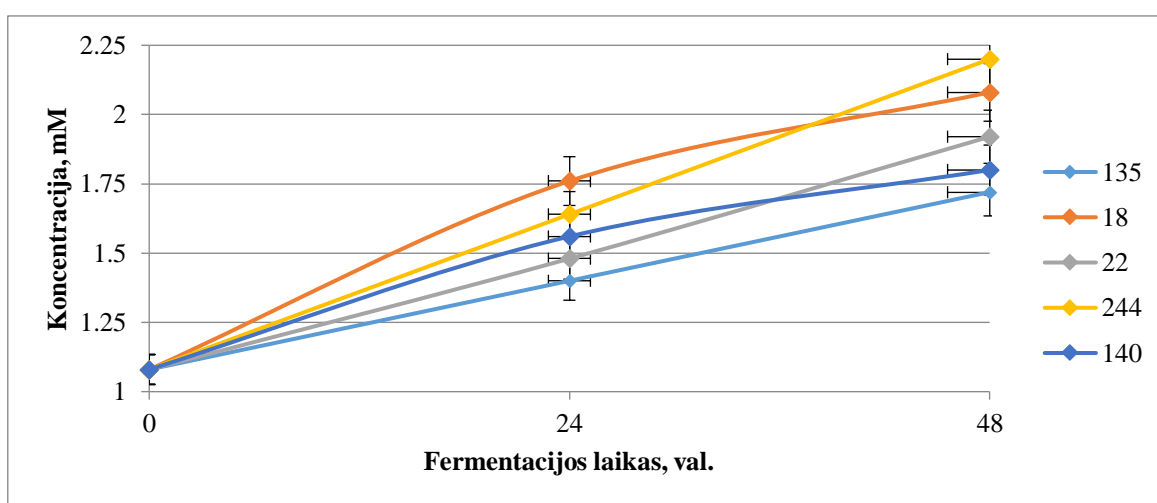
A – *L. plantarium* LUHS135; B – *L. plantarium* LUHS18; C – *L. brevis* LUHS140; D – *L. paracasei* LUHS244; E – *P. pentosaceus* LUHS22

### 3.4.2. Acto rūgšties susidarymas PRB fermentacijos metu

Fermentacijose naudojant PRB, vienas iš fermentacijos produktų yra acto rūgštis. Acto rūgštis – silpna rūgštis, tačiau taip pat gali turėti įtakos substrato pH pokyčiams fermentacijos eigoje. Apskaičiavus rezultatus pagal titravimui sunaudotą 0,1 N NaOH tūrį (žr. 19, 20 priedus), paaiškėjo, kad abu substratai, netgi prieš fermentaciją, natūraliai savo sudėtyje turi acto rūgštis. 21 priede pateikti rezultatų duomenys rodo, kad išrūgos prieš fermentaciją savo sudėtyje turi

0,48 mM acto rūgšties, o laktozės melasa šiek tiek daugiau – 1,08 mM (žr. 22 priedą). Atlikus eksperimentą pastebėta, kad, fermentacijai naudojant tas pačias PRB, tiek laktozės melasos, tiek sūrinių išrūgų fermentacijoms, abejuose substratuose susidaro panašus kiekis acto rūgšties.

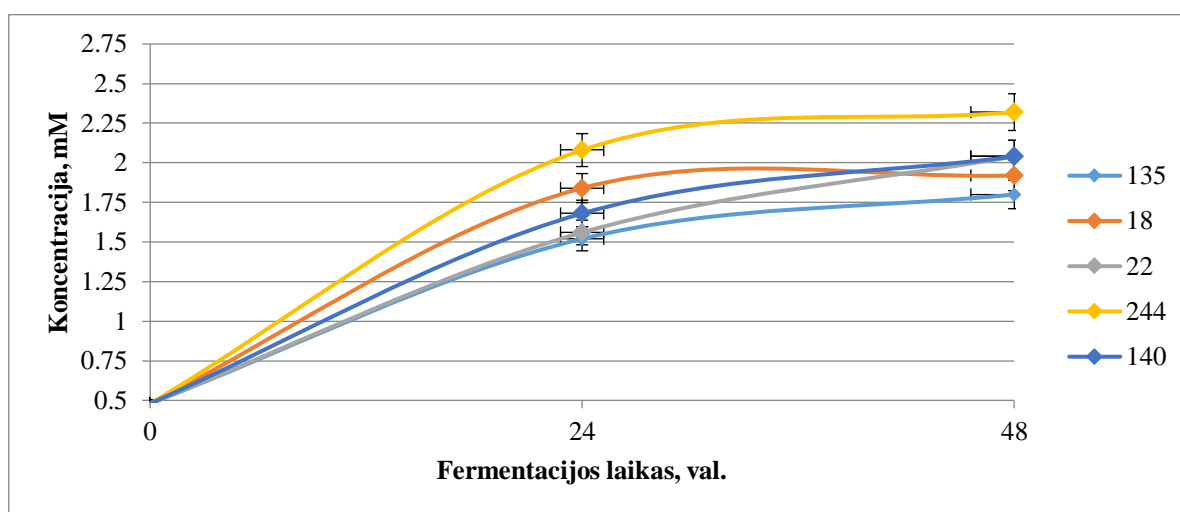
Fermentacijose kaip substratą naudojant laktozės melasą, acto rūgšties koncentracija fermentacijos eigoje svyravo nuo 1,08 mM iki 2,2 mM. Eksperimento rezultatuose ( $p > 0,05$ ) pastebima (žr. 3.14. pav.), kad po 24 val. didžiausia acto rūgšties koncentracija – 1,76 mM – gauta naudojant *L. plantarium* LUHS18. Tačiau pastebėta, kad tolesnėje fermentacijoje, naudojant šią bakteriją, acto rūgšties gamyba sulėtėja. Manytina, kad tam įtakos gali turėti substrato pH sumažėjimas, kuris yra nepalankus šiai bakterijų kultūrai ir sulėtina acto rūgšties gamybos procesą. Visos fermentacijos metu, naudojant bakteriją *L. paracasei* LUHS244, acto rūgšties produkcijos kiekis beveik nekito. Su minėta PRB po 24 val. acto rūgšties koncentracija buvo 1,64 mM, o po 48 val. – 2,2 mM. Palyginus penkių ištirtų PRB fermentacijas laktozės melasoje, nustatyta, kad *L. paracasei* LUHS244 acto rūgšties pagamino daugiausiai – net 1,12 mM. Mažiausiai acto rūgšties pagamino *L. plantarium* LUHS135, t. y. per 48 val. tik 0,64 mM. *L. brevis* LUHS140 ir *P. pentosaceus* LUHS22 pasižymėjo vidutiniu acto rūgšties produktyvumu ir fermentacijų metu atitinkamai pagamino 0,72 mM ir 0,84 mM acto rūgšties.



**3.14. paveikslas.** Acto rūgšties koncentracijos kitimas laktozės melasos fermentacijos eigoje, naudojant skirtingas pieno rūgšties bakterijas

Substratui naudojant sūrines išrūgas, acto rūgšties koncentracija fermentacijos metu svyravo nuo 0,48 mM iki 2,32 mM. Eksperimento rezultatuose (žr. 3.14. pav.) matyti, kad visos fermentacijos metu daugiausia acto rūgšties pagaminta, kai fermentacijai naudota *L. paracasei* LUHS244 bakterija. Rezultatai skiriasi statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ). Praėjus 24 val. po fermentacijos, naudojant šią PRB, acto rūgšties koncentracija sūrinėse išrūgose buvo 2,08 mM, o po 48 val. – 2,32 mM. Visos fermentacijos sūrinėse išrūgose papildomai pasigamino 1,84 mM

acto rūgštis. Mažiausiai acto rūgštis – 1,32 mM – per 48 val. pagamino sūrinės išrūgos fermentavusi *L. plantarium* LUHS135. *L. plantarium* LUHS18 ir *P. pentosaceus* LUHS22 bakterijų pagamintas acto rūgštis kiekis sūrinėse išrūgose buvo beveik vienodas, t. y. apie 1,44 mM per 48 val. Sūrinių išrūgų fermentacijai naudojant *L. brevis* LUHS140, acto rūgštis koncentracija buvo 1,72 mM. Pastebėta, kad, fermentacijai kaip substratą naudojant sūrinės išrūgas, acto gamyba su visomis PRB po 24 val. artėja prie stacionarios fazės. Aukščiau aprašyto eksperimento metu aptartas skirtingas substratų pH kitimas fermentacijų eigoje. Pastebėta, kad žymiai mažesnis pH gaunamas fermentuojant sūrinės išrūgas, o ne laktozės melasą. Kai pH rodiklis mažas, mikroorganizmams sąlygos yra nepalankios, todėl acto rūgštis gamybos procesas labai sulėtėja.



**3.14. paveikslas.** Acto rūgštis koncentracijos kitimas sūrinėse išrūgose fermentacijos eigoje, naudojant skirtingas pieno rūgštis bakterijas

### 3.4.3. Pieno rūgštis L(+) ir D(-) izomerų kitimo dinamika PRB fermentacijos metu

Kaip minėta anksčiau, PR turi šiuos du izomerus: D(-) ir L(+). Jie yra vienas kito veidrodiniai atspindžiai – enantiomerai. Atlikus eksperimentą, apskaičiuotos D(-) ir L(+) PR izomerų koncentracijos (žr. 3.4., 3.5. lent.). Remiantis duomenimis, galima teigti, kad PR vyrauja L(+) izomeras. Substratą fermentuojant su bet kuria PRB, L(+) PR pagamina daugiau nei D(-) PR ( $p < 0,05$ ). Pastebėta, kad L(+) PR izomeras vyravo jau fermentacijos pradžioje. Pabrėžtina, kad gyvuose organizmuose biocheminių reakcijų metu gaminamas tik L(+) PR izomeras, tačiau, remiantis šio tyrimo rezultatais, PRB turi vienodas galimybes gaminti tiek L(+), tiek D(-) PR izomerus. Rezultatuose palyginama, kaip PRB gamina L(+) ir D(-) PR izomerus, fermentacijai naudojant skirtingus substratus. Galima pastebėti, kad visos PRB pieno rūgštis pagamina daugiau, kai substratui naudojamos išrūgos ( $p < 0,05$ ). Atlikus eksperimentą,

taip pat paaiškėjo, kad jau prieš fermentaciją abu substratai savo sudėtyje turi ir D(-), ir L(+) PR izomerų. Daugiausia PR pagamina bakterija *P. pentosaceus* LUHS22. Po 48 val. fermentacijos D(-) PR koncentracija išrūgų sūrinėse išrūgose buvo 17,366 g/l, o laktozės melasoje – 14,082 g/l, L(+) PR koncentracija sūrinėse išrūgose – 18,067 g/l, o laktozės melasoje – 15,449 g/l.

**3.4. lentelė.** D(-) ir L(+) pieno rūgšties izomerų koncentracijos laktozės melasoje

Kultūra	Fermentacijos laikas, val.			
	0	12	24	48
	D(-)pieno rūgšties izomero koncentracija g/l			
135	3,521	5,703	6,985	12,079
18	3,521	5,927	8,330	13,136
22	3,521	7,049	10,381	17,366
244	3,521	6,857	9,163	12,976
140	3,521	6,600	8,138	14,450
	L(+) pieno rūgšties izomero koncentracija g/l			
135	3,667	5,882	7,240	11,603
18	3,667	6,270	8,759	13,477
22	3,667	7,337	10,827	18,067
244	3,667	7,078	9,664	13,316
140	3,667	6,884	8,597	14,932

**3.5. lentelė.** D(-) ir L(+) pieno rūgšties izomerų koncentracijos sūrinėse išrūgose

Kultūra	Fermentacijos laikas, val.			
	0	12	24	48
	D(-) pieno rūgšties izomero koncentracija g/l			
135	2,989	4,945	6,820	10,698
18	2,989	5,591	8,015	10,569
22	2,989	7,207	9,696	15,449
244	2,989	6,884	8,371	11,441
140	2,989	6,658	8,048	11,377
	L(+)pieno rūgšties izomero koncentracija g/l			
135	3,147	5,158	6,504	10,349
18	3,147	5,671	7,722	10,285
22	3,147	7,017	9,516	14,802
244	3,147	7,081	8,523	11,855
140	3,147	6,440	7,786	10,733

### **3.5. Pieno rūgšties bakterijų fermentacijos metu susidarančių metabolizmo produktų antigrybinai aktyvumai**

Fermentacijų rezultatai parodė, kad, fermentuojant substratus (sūrinės išrūgas, laktozės melasą), daugiausia metabolitų pagaminama, kai naudojami *P. pentosaceus* LUHS22 ir *L. paracasei* LUHS244 PRB. *P. pentosaceus* LUHS22 pasižymi geresne PR gamyba, palyginus su kitomis tirtomis bakterijomis, o *L. paracasei* LUHS244 – geresne acto rūgšties gamyba.



Atkreiptinas dėmesys, kad abi bakterijos daugiau pagamina LRR. Atsižvelgiant į tai, nuspręsta iširti minėtų bakterijų antigrybinį aktyvumą prieš turimus įvairius indikatorinius mikroskopinius grybus. Atliktas antigrybinis *P. pentosaceus* LUHS22 ir *L. paracasei* LUHS244 PRB susidariusių metabolitų tyrimas, kuris aktyvumą prieš skirtingus indikatorinius mikroskopinius grybus.

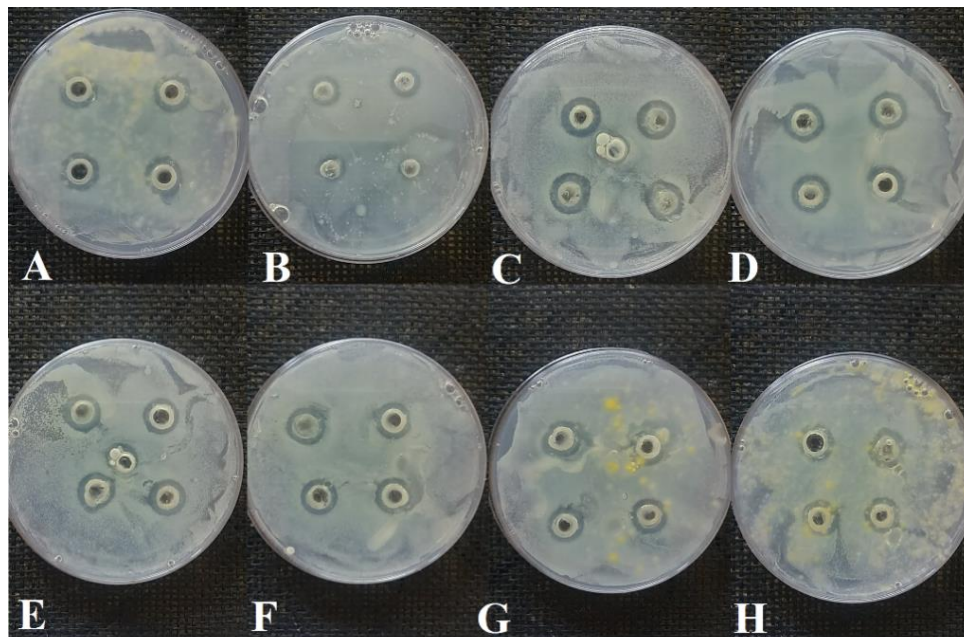
Gauti rezultatai parodė, kad abi bakterijos turi panašų antigrybinį aktyvumą (žr. 3.4. lent.). Išmatavus inhibicijos zonas, įvertintas metabolitų antigrybinis aktyvumas ((-) – nepastebima antigrybinio aktyvumo, (+) – pastebimas vidutinis antigrybinis aktyvumas, (++) – pastebimas geras antigrybinis aktyvumas).

**3.4. lentelė.** *P. pentosaceus* LUHS22 ir *L. paracasei* LUHS244 antigrybinio aktyvumo įvertinimas prieš indikatorinius mikroskopinius grybus

Mikroskopinis grybas	<i>P. pentosaceus</i> LUHS22		<i>L. paracasei</i> LUHS244	
	Inhibicijos zona, mm	Antimikrobinio aktyvumo įvertinimas	Inhibicijos zona, mm	Antimikrobinio aktyvumo įvertinimas
<i>Alternaria alternate</i>	–	–	–	–
<i>Rhizopus oryzae</i>	9,7 ± 0,5	+	9,3 ± 0,5	+
<i>Mucor mucedo</i>	–	–	–	–
<i>Cladosporium herbarum</i>	7,3 ± 0,5	+	7,1 ± 0,5	+
<i>Fusarium avenaceum</i>	10,1 ± 0,5	+	10,3 ± 0,5	+
<i>Fusarium graminearum E</i>	12,3 ± 0,5	++	10,8 ± 0,5	+
<i>Fusarium culmorum</i>	9,6 ± 0,5	+	9,4 ± 0,5	+
<i>Fusarium graminearum C</i>	10,3 ± 0,5	+	10,1 ± 0,5	+
<i>Fusarium graminearum D</i>	11,3 ± 0,5	++	11,4 ± 0,5	++
<i>Fusarium graminearum F</i>	10,1 ± 0,5	+	10,3 ± 0,5	+
<i>Fusarium nivale</i>	11,3 ± 0,5	++	9,8 ± 0,5	+
<i>Penicillium viridicatum</i>	–	–	–	–
<i>Penicillium palitans</i>	–	–	–	–
<i>Penicillium spinulosum</i>	–	–	–	–
<i>Aspergillus versicolor</i>	–	–	–	–
<i>Aspergillus terreus</i>	–	–	–	–
<i>Aspergillus funigatus</i>	–	–	–	–

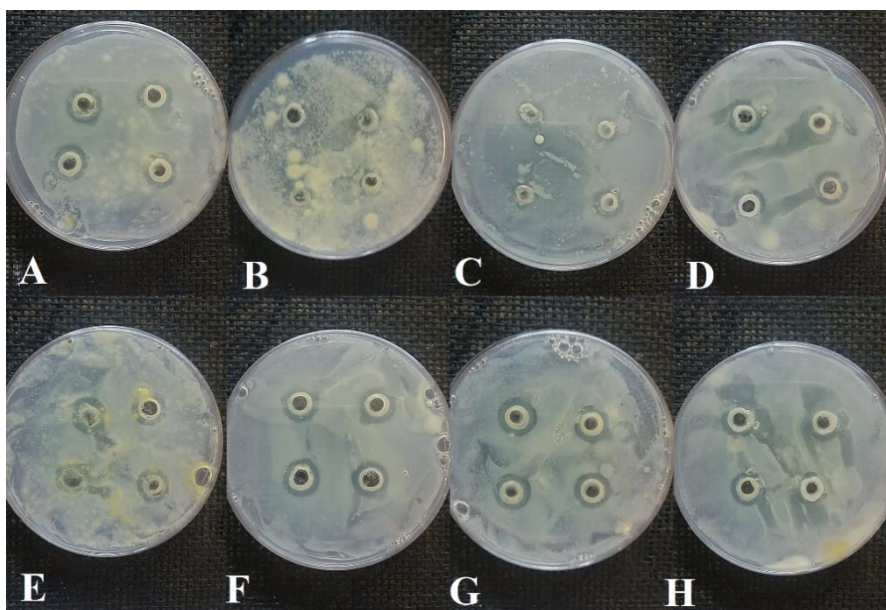
Prieš tris indikatorinius mikroskopinius grybus – *Fusarium nivale*, *Fusarium gram E* ir *Rhizopus oryzae* – po fermentacijos, naudojant *P. pentosaceus* LUHS22, gauti metabolitai rodė šiek tiek geresnes antigrybines savybes palyginus su *L. paracasei* LUHS244 (žr. 3.15. pav). Geriausias antigrybinis aktyvumas (iš tirtų pelėsinų grybų) užfiksuotas naudojant *P. pentosaceus* LUHS22 bakteriją prieš šiuos grybus: *Fusarium Graminearum E* (inhibicijos zona –

12,3 mm), *Fusarium Graminearum D* (inhibicijos zona – 11,3) mm) ir *Fusarium Nivale* (inhibicijos zona – 11,3 mm).



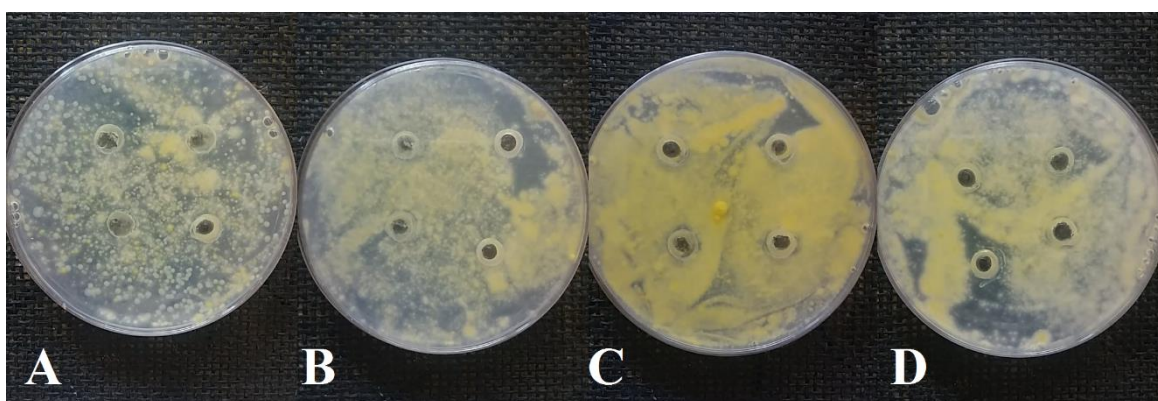
**3.15. paveikslas.** *P. pentosaceus* LUHS22 pagamintų metabolitų antigrybinis aktyvumas prieš indikatorinius mikroskopinius grybus. A – *Rhizopus oryzae*; B – *Fusarium avenaceum*; C – *Fusarium graminearum E*; D – *Fusarium culmorum*; E – *Fusarium graminearum C*; F – *Fusarium graminearum D*; G – *Fusarium graminearum F*; H – *Fusarium nivale*

Labai panašiu antigrybiniu aktyvumu prieš tuos pačius indikatorinius mikroskopinius grybus pasižymėjo ir *L. pracasei* LUHS244 pagaminti metabolitai. Pastebėta, kad inhibicijos zonos šiek tiek mažesnės nei *P. pentosaceus* LUHS22 (žr. 3.16. pav). Su *Rhizopus oryzae*, *Cladosporum Herbarium* ir visais *Fusarium* genties grybais, išskyrus *Fusarium graminearum D*, bakterijos *L. pracasei* LUHS244 pagaminti metabolitai pasižymėjo vidutiniu antigrybiniu aktyvumu. Pažymėtina, kad su grybu *Fusarium graminearum D* taip pat pastebėtas geras antigrybinis aktyvumas (inhibicijos zona – 11,4 mm).



**3.16. paveikslas.** *L. paracasei* LUHS244 pagamintų metabolitų antigrybinis aktyvumas prieš indikatorinius mikroskopinius grybus. A – *Rhizopus oryzae*; B – *Fusarium avenaceum*; C – *Fusarium graminearum* E; D – *Fusarium culmorum*; E – *Fusarium graminearum* C; F – *Fusarium graminearum* D; G – *Fusarium graminearum* F; H – *Fusarium nivale*

Abiejų PRB pagamintų metabolitų antigrybinis aktyvumas nenustatytas prieš *Alternaria alternate* ir *Mucor mucedo* indikatorinius mikroskopinius grybus. Su *Aspergillus* ir *Penicillium* grybais. Pavyzdžiui, tiriant *P. pentosaceus* LUHS22, galima pastebėti, kad po eksperimento inhibicijos zona su išvardytais indikatoriniais mikroskopiniais grybais yra lygi 0 (žr. 3.17. pav.) Galima teigti, kad nei *Pediococcus pentosaceus* LUHS22, nei *L. paracasei* LUHS244 pagaminti metabolitai nedarė įtakos šių indikatorinių mikroskopinių grybų augimui.



**3.17. paveikslas.** *P. pentosaceus* LUHS22 pagamintų metabolitų antigrybinis aktyvumas prieš indikatorinius mikroskopinius grybus. A – *Alternaria alternate*; B – *Mucor mucedo*; C – *Aspergillus terreus*; D – *Penicillium spinulosum*

### 3.6. Laisvųjų riebalų rūgščių ryšys su antigrybiniais aktyvumais

Ištyrus laisvųjų riebalų rūgščių antigrybinį aktyvumą, naudota „Microsoft Excel“ duomenų apdorojimo programa, kuria atlikta regresinė analizė. Siekta išsiaiškinti, ar yra ryšys tarp metabolitų komplekse esančios laisvosios riebalų rūgšties ir antigrybinio aktyvumo. Duomenis apdorojus regresinės analizės metodu, gautos koreliacijos (žr. 3.5. lent.). Koreliacijos koeficientas  $r$  gali kisti ribose nuo  $-1$  iki  $+1$ . Tai parodo, koks stiprus ryšys tarp dviejų kintamųjų. Kai  $r = 0$  – nėra jokio ryšio tarp kintamųjų, kuo vertės arčiau 0, tuo ryšys silpnesnis. Jeigu koreliacija neigiama, tai didėjant vienai kintamojo vertei, kita mažėja, jeigu teigiama – tai didėjant didėja.

3.5. lentelė. Koreliacijos tarp laisvųjų riebalų rūgščių ir antigrybinio aktyvumo

Laisvoji riebalų rūgštis	Palmitinas	Stearinas	Oleinas	Linolas	Linoleinas
Antigrybinis aktyvumas	0,294	0,953	0,994	0,934	0,995

Rezultatai parodė, kad tarp laisvųjų riebalų rūgščių ir antigrybinio aktyvumo yra teigiama koreliacija. Ji nurodo, kad tarp jų yra ryšys, kai, didėjant laisvosios rūgšties koncentracijai, gerėja antigrybinis aktyvumas. Stipriausia teigiama koreliacija nustatyta su linoleino (0,995) ir oleino (0,994) laisvosiomis riebalų rūgštimis. Labai stiprią teigiamą koreliaciją taip pat turi linolo ir stearino laisvosios riebalų rūgštys. Palmitino riebalų rūgštis turi teigiamą koreliaciją, tačiau ryšys yra labai silpnas, nes  $r$  reikšmė (0,294) arčiau 0.

Atlikus regresinę analizę ir apibendrinant tyrimo rezultatus, galima teigti, kad laisvosios riebalų rūgštys ir antigrybinis aktyvumas yra susiję. Didėjant laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijoms, antigrybinis aktyvumas taip pat didėja. Teigtina, kad palmitino riebalų rūgštis nedaro didelės įtakos antigrybiniam aktyvumui, nes koreliacijos koeficientas, tarp šios riebalų rūgšties ir antigrybinio aktyvumo, yra mažas.

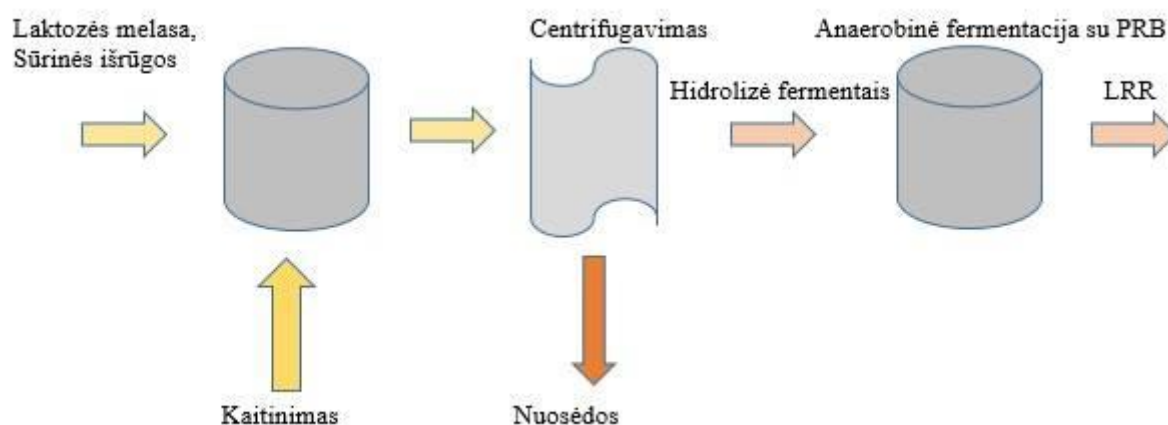
Remiantis kitų tyrimų duomenimis, antrinių pieno produktų fermentacijos metu susidaro acto, propiono, sviesto ir valerato riebalų rūgštys [84]. Taip pat atlikti tyrimai anaerobinės fermentacijos metu parodė, kad laisvosios riebalų rūgštys susidaro dviejų fermentacijos etapų metu. Pirmame etape vyksta laktozės biokonversija į pieno rūgštį. Toliau vykstant fermentacijai, pieno rūgštis konvertuojama į įvairias laisvasias riebalų rūgštis [85]. Tyrimais nustatyta, kad esant žemesniam substrato pH, fermentacijos laikas sutrumpėja, todėl laktozės biokonversijos būdu laisvosios riebalų rūgštys pagaminamos greičiau. [86]

## REKOMENDACIJOS

Atsižvelgiant į tyrimų metu gautus rezultatus, galima teigti, kad, norint biokonversijos būdu antriniuose pieno produktuose esančią laktozę versti į laisvasias riebalų rūgštis, reikėtų atlikti pieno rūgšties bakterijų fermentacijas. Norint pasiekti didžiausias riebalų rūgščių koncentracijas, fermentacijoms reikėtų naudoti *Pediococcus pentosaceus* ir *Lactobacillus paracasei* bakterijų kultūras.

Tyrimo metu pirminis žaliavų apdorojimas fermentais taikytas nebuvo. Siekta išsiaiškinti, koks yra pieno rūgšties bakterijų galaktozidazinis aktyvumas. Visgi, norint pagerinti LRR išėigą ir gaminti jas pramonei, reiktų atlikti antrinių pieno produktų pirminį apdorojimą. Biokonversijai reikalinga anglis yra skystųjų antrinių pieno produktų laktozės sudėtyje, todėl geriausia atlikti išankstinį apdorojimą fermentais, kad disacharidų molekulės būtų suskaidytos iki monosacharidų. Atlikti tyrimai parodė, kad, atlikus hidrolizę fermentais laktozės biokonversijai, proceso laikas sulėtėja, laktozės fermentacijai sunaudojama daugiau ir pasiekiamas geresnis produktyvumas (Hofvendahl & Hahn-H€ agerdal, 2000).

Remiantis rezultatais, teigtina, kad biotechnologinis būdas biokonversijos būdu gaminti lakiąsias riebalų rūgštis – puiki alternatyva cheminiam lakiųjų riebalų rūgščių išgavimui. Šią technologiją pritaikius pieno pramonės gamyklose, galima perdirbti didžiulius kiekius antrinių pieno produktų, o gautas laisvasias riebalų rūgštis panaudoti energijos gamybai arba realizuoti rinkoje. Technologinėje produkto gamybos schemoje (žr. 1 schemą) matomi gamybos etapai nuo organinių nuotekų apdorojimo iki lakiųjų riebalų rūgščių produktų atsiradimo.



1 schema. Technologinė lakiųjų riebalų rūgščių gamybos schema

## IŠVADOS

1. Ištirti galaktozidazinio aktyvumo pokyčiai sūrinių išrūgų ir laktozės melasos fermentacijos, su įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis (*L. plantarium* LUHS135, *L. plantarium* LUHS18, *P. pentosaceus* LUHS22, *L. paracasei* LUHS244 ir *L. brevis* LUHS140), metu. Geriausiu  $\beta$ -galaktozidaziniu aktyvumu, sprendžiant pagal laktozės koncentracijos mažėjimą fermentacijos metu, abiejuose substratuose (sūrinėse išrūgoose ir laktozės melasoje) pasižymėjo *P. pentosaceus* LUHS22 (laktozės koncentracijos sumažėjimas atitinkamai (86,01 proc. ir 78,18 proc.), kuris sudarė sąlygas susidariusių monosacharidų – gliukozės ir galaktozės – biokonversijai į organines rūgštis.

2. Dujinės chromatografijos metodu įvertinta fermentacijos metu susidarančių laisvųjų riebalų rūgščių kokybinė ir kiekybinė sudėtis bei jų savitumai, naudojant įvairius substratus. Fermentuojant sūrines išrūgas, identifikuotos miristino, palmitino, stearino, oleino ir linolo riebalų rūgštys. Pastebėta, kad, bioapdorojant laktozės melasą, miristino neaptikta, naujai susidarė linoleino riebalų rūgštis. Fermentuojant sūrines išrūgas, bendras lakiųjų riebalų rūgščių kiekis didėjo vidutiniškai nuo 75,8 mg/l iki 122,19 mg/l, o laktozės melasos fermentacijos metu rūgščių pokyčiai buvo vidutiniškai 18,84 mg/l mažesni nei sūrinių išrūgų perdirbimo metu.

3. Fermentacijos metu, laisvųjų riebalų rūgščių susidarymas priklausė nuo pieno rūgšties bakterijos padermės: didžiausiu laisvųjų riebalų rūgščių susidarymu pasižymėjo *P. pentosaceus* LUHS22 ir *L. paracasei* LUHS244, sąlygojančios didžiausią oleino, linolo, linoleino rūgščių susidarymą.

4. Sprendžiant iš pH ir acto bei pieno rūgšties fermentacijos metu tyrimų rezultatų, mažėjant pH (sūrinių išrūgų fermentacijos metu iki 4,45, o laktozės melasos – 5,34) ir didėjant acto (nuo 0,48 iki 2,32 mM – sūrinių išrūgų, nuo 1,08 iki 2,2 mM – laktozės melasos) ir pieno (atitinkamai nuo 7,188 iki 35,433 g/l ir nuo 6,136 g/l iki 30,251 g/l) rūgšties koncentracijoms, stebima laisvųjų riebalų rūgščių susidarymo tendencija. *Pediococcus pentosaceus* pasižymėjo geriausiu pieno rūgšties gamybos pajėgumu, o *Lactobacillus paracasei* daugiausia gamino acto rūgštį.

5. Įvertintus pieno rūgšties bakterijų fermentacijos metu susidarančių metabolizmo produktų antigrybinį aktyvumą, nustatyta, kad fermentuota laktozės melasa pasižymi antigrybiniu aktyvumu prieš *Fusarium* spp. ir jis buvo didesnis nei fermentuotų sūrinių išrūgų. Pastebėta, kad abu fermentuoti substratai nepasižymėjo antigrybiniu aktyvumu prieš *Aspergillus* ir *Penicillium* spp.

6. Naudojant regresinės analizės metodą, nustatyti ryšiai tarp laisvųjų riebalų rūgščių sudėties (kokybinės ir kiekybinės) ir jų antigrybinio aktyvumo: stiprus teigiamas ryšys aptiktas tarp laisvųjų riebalų rūgščių koncentracijos ir antigrybinio aktyvumo, taip pat tarp jų sudėties.

Didžiausiu antigrybiniu aktyvumu pasižymėjo linoleino, linolino, stearino ir oleino (atitinkamai buvo 0,995; 0,994; 0,953 ir 0,934) riebalų rūgštys, o palmitino rūgštis neturėjo reikšmingo poveikio ( $R^2=0,294$ ).

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. LEE, W. S., CHUA, A. S. M., YEOH, H. K., NGOH, G. C. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal* 2014, 235, 83–90. ISSN 1385-8947.
2. JIANG, S., CHEN, Y., ZHOU, Q. Influence of alkyl sulfates on waste activated sludge fermentation at ambient temperature. *Journal of Hazardous Materials*. 2007, 148, 110–115. ISSN 0304-3894.
3. JIANG, S., CHEN, Y., ZHOU, Q. Effect of sodium dodecyl sulfate on waste activated sludge hydrolysis and acidification. *Chemical Engineering Journal*. 2007, 132, 311–317. ISSN 1385-8947.
4. JI, Z., CHEN, G., CHEN, Y. Effects of waste activated sludge and surfactant addition on primary sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation. *Bioresource Technology*. 2010, 101. ISSN 3457-3462.
5. WU, H., YANG, D., ZHOU, Q., SONG, Z. The effect of pH on anaerobic fermentation of primary sludge at room temperature. *Journal of Hazardous Materials*. 2009, 172, 196–201. ISSN 0304-3894.
6. ZHANG, P., CHEN, Y., ZHOU, Q. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: effect of pH. *Water Research*. 2009, 43, 3735–3742. ISSN 0043-1354.
7. MAHARAJ, I., ELEFSINIOTIS, P. The role of HRT and low temperature on the acidphase anaerobic digestion of municipal and industrial wastewaters. *Bioresource Technology*. 2001, 76, 191–197. ISSN 3457-3462.
8. KATHIRVALE, S., YUNUS, M. N. M., SOPIAN, K., SAMSUDDIN, A. H. Energy potential from municipal solid waste in Malaysia. *Renewable Energy*. 2003, 29, 559–567. ISSN 0960-1481.
9. ZHANG, B., ZHANG, L. L., ZHANG, S. C., SHI, H. Z., CAI, W. M. The influence of pH on hydrolysis and acidogenesis of kitchen wastes in two-phase anaerobic digestion. *Environmental Technology*. 2005, 26, 329–340.
10. ELBESHBISHY, E., HAFEZ, H., DHAR, B. R., NAKHLA, G. Single and combined effect of various pretreatment methods for biohydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2011, 36. ISSN ISSN: 0360-3199.
11. KIM, H. J., KIM, S. H., CHOI, Y. G., KIM, G. D., CHUNG, T. H. Effect of enzymatic pretreatment on acid fermentation of food waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2006, 81, 974–980. ISSN 1097-4660.



12. BOLZONELLA, D., FATONE, F., PAVAN, P., CECCHI, F. Anaerobic fermentation of organic municipal solid wastes for the production of soluble organic compounds. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2005, 44, 3412–3418. ISSN 0888-5885.
13. SANS, C., MATA-ALVAREZ, J., CECCHI, F., PAVAN, P., BASSETTI, A. Acidogenic fermentation of organic urban wastes in a plug-flow reactor under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*. 1995, 54, 105–110. ISSN 3457-3462.
14. C. SANS, J. MATA-ALVAREZ, F. CECCHI, P. PAVAN, A. BASSETTI, Volatile fatty acids production by mesophilic fermentation of mechanically-sorted urban organic wastes in a plug-flow reactor, *Bioresource Technology*. 1995, 51, 89–96. ISSN 3457-3462.
15. S. K. HONG, Y. SHIRAI, A. R. N. AINI, M. A. HASSAN, Semi-continuous and continuous anaerobic treatment of palm oil mill effluent for the production of organic acids and polyhydroxyalkanoates. *Research Journal of Environmental Sciences*. 2009, 3, 552–559. ISSN 1819-3412.
16. BORJA, R., BANKS, C. J., SANCHEZ, E. Anaerobic treatment of palm oil mill effluent in a two-stage up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) system. *Journal of Biotechnology*. 1996, 45, 125–135. ISSN 0168-1656.
17. BECCARI, M., BERTIN, L., DIONISI, D., FAVA, F., LAMPIS, S., MAJONE, M., VALENTINO, F., VALLINI, G., VILLANO, M. Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic–aerobic process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2009, 84, 901–908. ISSN 1097-4660.
18. DEMIREL, B., YENIGUN, O. Anaerobic acidogenesis of dairy wastewater: the effects of variations in hydraulic retention time with no pH control. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2004, 79, 755–760. ISSN 1097-4660.
19. YU, H. Q., FANG, H. H. P. Acidification of mid- and high-strength dairy wastewaters. *Water Research*. 2001, 35, 3697–3705. ISSN 0043-1354.
20. JIANG, Y., MARANG, L., TAMIS, J., M. C. M. van LOOSDRECHT, DIJKMAN, H., KLEEREBEZEM, R. Waste to resource: converting paper mill wastewater to bioplastic *Water Research*. 2012, 46 5517–5530. ISSN 0043-1354.
21. GHOSH, P., SAMANTA, A. N., RAY, S. COD reduction of petrochemical industry wastewater using Fenton’s oxidation. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 2010, 88 1021–1026. ISSN 0008-4034.
22. MCGHEE, T. J. *Water Supply and Sewerage*, sixth ed. McGraw-Hill, Hightstown, NJ, 1991. ISBN 9781595290144.

23. SALEHIZADEH, H., M. C. M. van LOOSDRECHT. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*. 2004, 22, 261–279. ISSN 0734-9750.
24. FDEZ-GUELFO, L. A., ALVAREZ-GALLEGO, C., SALES, D., ROMERO, L. I. The use of thermochemical and biological pretreatments to enhance organic matter hydrolysis and solubilization from organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Chemical Engineering Journal*. 2011, 168, 249–254. ISSN 1385-8947.
25. TANG, B., YU, L., HUANG, S., LUO, J., ZHUO, Y. Energy efficiency of pre-treating excess sewage sludge with microwave irradiation. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 5092–5097. ISSN 3457-3462.
26. TORRES, M. L., LLORENS, M. C. E. Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes. *Waste Manage.* 2008, 28, 2229–2234.
27. DOĞAN, I., SANIN, F. D. Alkaline solubilization and microwave irradiation as a combined sludge disintegration and minimization method. *Water Research*. 2009, 43, 2139–2148. ISSN 0043-1354.
28. KIM, D., JEONG, E., OH, S., SHIN, H. Combined (alkaline + ultrasonic) pretreatment effect on sewage sludge disintegration. *Water Research*. 2010, 44, 3093–3100. ISSN 0043-1354.
29. CESARO, A., BELGIORNO, V. Sonolysis and ozonation as pretreatment for anaerobic digestion of solid organic waste. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013, 20, 931–936. ISSN 1350-4177.
30. XU, G., CHEN, S., SHI, J., WANG, S., ZHU, G. Combination treatment of ultrasonic and ozone for improving solubilization and anaerobic biodegradability of waste activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, 180, 340–346. ISSN 0304-3894.
31. C. ESKICIOGLU, A. PROROT, J. MARIN, R. L. DROSTE, K. J. KENNEDY, Synergetic pretreatment of sewage sludge by microwave irradiation in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for enhanced anaerobic digestion. *Water Research*. 2008, 42, 4674–4682. ISSN 0043-1354.
32. SHAHRIARI, H., WARITH, M., HAMODA, M., KENNEDY, K. J. Anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste combining two pretreatment modalities, high temperature microwave and hydrogen peroxide. *Waste Manage.* 2012, 32, 41–52.
33. YANG, Q., LUO, K., LI, X., WANG, D., ZHENG, W., ZENG, G., LIU, J. Enhanced efficiency of biological excess sludge hydrolysis under anaerobic digestion by additional enzymes. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 2924–2930. ISSN 3457-3462.

34. PARK, C., LEE, C., KIM, S., CHEN, Y., CHASE, H. A. Upgrading of anaerobic digestion by incorporating two different hydrolysis processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005, 100, 164–167. ISSN 1389-1723.
35. APPELS, L., DEGREVE, J., BRUGGEM, B. V. D., IMPE, J. V., DEWIL, R. Influence of low temperature thermal pre-treatment on sludge solubilisation heavy metal release and anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 5743–5748. ISSN 3457-3462.
36. TIEHM, A., NICKEL, K., ZELLHORN, M., NEIS, U. Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. *Water Research*. 2001, 35, 2003–2009. ISSN 0043-1354.
37. DHAR, B. R., NAKHLA, G., RAY, M. B. Techno-economic evaluation of ultrasound and thermal pretreatments for enhanced anaerobic digestion of municipal waste activated sludge. *Waste Manage.* 2012, 32, 542–549.
38. EDDY, M. *Wastewater Engineering: Treatment, disposal and reuse*. Mc-Graw-Hill, Inc., Singapore, 1991. ISBN 9780070416901.
39. BERTIN, L., COLAO, M. C., RUZZI, M., FAVA, F. Performances and microbial features of a granular activated carbon packed-bed biofilm reactor capable of an efficient anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology*. 2004, 48, 413–423. ISSN:1574-6941.
40. GRADY, C. P. L., DAIGGER, G. T., LOVE, N. G., FILIPE, C. D. M. *Biological Wastewater Treatment*. CRC Press, Boca Raton, 2011. ISBN 9780849396793.
41. POH, P. E., CHONG, M. F. Development of anaerobic digestion methods for palm oil mill effluent (POME) treatment. *Bioresource Technology*. 2009, 100, 1–9. ISSN 3457-3462.
42. LIU, H., WANG, J., LIU, X., FU, B., CHEN, J., YU, H. Acidogenic fermentation of proteinaceous sewage sludge: effect of pH. *Water Research*. 2012, 46, 799–807. ISSN 0043-1354.
43. NIELSEN, P. H., JAHN, A. Extraction of EPS, in: J. Wingender, T. R. Neu, H. C. Flemming (Eds.). *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Springer, Berlin, 1999. ISBN 9783642601477.
44. HORIUCHI, J. I., SHIMIZU, T., TADA, K., KANNO, T., KOBAYASHI, M. Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control, *Bioresource Technology*. 2002, 82, 209–213. ISSN 3457-3462.
45. YU, H. Q., FANG, H. H. P. Acidogenesis of gelatin-rich wastewater in an upflow anaerobic reactor: influence of pH and temperature. *Water Research*. 2003, 37, 55–66. ISSN 0043-1354.

46. YUAN, Q., SPARLING, R., OLESZKIEWICZ, J. A. VFA generation from waste activated sludge: effect of temperature and mixing. *Chemosphere*. 2011, 82, 603–607. ISSN 0045-6535.

47. ZHANG, P., CHEN, Y., HUANG, T., ZHOU, Q. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation in the presence of SDBD in semicontinuous flow reactors: effect of solids retention time and temperature. *Chemical Engineering Journal*. 2009, 148, 348–353. ISSN 1385-8947.

48. ZHUO, G., YAN, Y., TAN, X., DAI, X., ZHOU, Q. Ultrasonic-pretreated waste activated sludge hydrolysis and volatile fatty acid accumulation under alkaline conditions: effect of temperature. *Journal of Biotechnology*. 2012, 159, 27–31. ISSN 0168-1656.

49. YU, J., ZHENG, M., TAO, T., ZUO, J., WANG, K. Waste activated sludge treatment based on temperature staged and biologically phased (TSBP) anaerobic digestion system. *Journal of Environmental Sciences*. Prieiga internete: [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60266-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60266-6) (žiūrėta 2017 02 19).

50. LU, J., Ahring, B. K. Effects of temperature and hydraulic retention time on thermophilic anaerobic pretreatment of sewage sludge, in: 4th International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste, Copenhagen, 2005, pp. 159–164.

51. LIM, S., KIM, B. J., JEONG, C., CHOI, J., AHN, Y. H., CHANG, H. N. Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor, *Bioresource Technology*. 2008, 99, 7866–7874. ISSN 3457-3462.

52. FANG, H. H. P., YU, H. Q. Effect of HRT on mesophilic acidogenesis of dairy wastewater. *Journal of Environmental Engineering*. 2000, 126, 1145–1148. ISSN 0733-9372.

53. DINSDALE, R. M., PREMIER, G. C., HAWKES, F. R., HAWKES, D. L. Two-stage codigestion of waste activated sludge and fruit/vegetable waste using inclined tubular digesters. *Bioresource Technology*. 2000, 72, 159–168. ISSN 3457-3462.

54. XIONG, H., CHEN, J., WANG, H., SHI, H. Influences of volatile solid concentration, temperature and solid retention time for the hydrolysis of waste activated sludge to recover volatile fatty acids *Bioresource Technology*. 2012, 119, 285–292. ISSN 3457-3462.

55. FENG, L., WANG, H., CHEN, Y., WANG, Q. Effect of solids retention time and temperature on waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under alkaline conditions in continuous-flow reactors. *Bioresource Technology*. 2009, 100, 44–49. ISSN 3457-3462.

56. SALMIATI, Z., UJANG, M. R., SALIM, M. F. M., DIN, M. A., AHMAD, Intracellular biopolymer productions using mixed microbial cultures from fermented POME. *Water Science and Technology*. 2007, 56, 179–185. ISSN 0273-1223.

57. YU, J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology*. 2001, 86, 105–112. ISSN 0168-1656.
58. PHILIP, S., KESHAVARZ, T., ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, 82, 233–247. ISSN 1097-4660.
59. CHOI, J., LEE, S. Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 1997, 17, 335–342. ISSN 1615-7605.
60. ALBUQUERQUE, M. G. E., EIROA, M., TORRES, C., NUNES, B. R., REIS, M. A. M. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*. 2007, 130, 411–421. ISSN 0168-1656.
61. HASSAN, M. A., SHIRAI, Y., KUSUBAYASHI, N., KARIM, M. I. A., NAKANISHI, K., HASHIMOTO, K. The production of polyhydroxyalkanoate from anaerobically treated palm oil mill effluent by *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1997, 83, 485–488. ISSN 1389-1723.
62. MUMTAZ, T., ABD-AZIZ, S., RAHMAN, N. A. A., YEE, P. L., SHIRAI, Y., HASSAN, M. A. Pilotscale recovery of low molecular weight organic acids from anaerobically treated palm oil mill effluent (POME) with energy integrated system. *African Journal of Biotechnology*. 2008, 7, 3900–3905. ISSN 1684-5315.
63. ALBUQUERQUE, M. G. E., TORRES, C., REIS, M. A. M. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water Research*. 2010, 44, 3419–3433. ISSN 0043-1354.
64. JIANG, Y., HEBLY, M., KLEEREBEZEM, R., MUYZER, G., M. C. M. van LOOSDRECHT, Metabolic modeling of mixed substrate uptake for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Water Research*. 2011, 45, 1309–1321. ISSN 0043-1354.
65. JIANG, Y., CHEN, Y., ZHENG, X. Efficient polyhydroxyalkanoates production from a waste-activated sludge alkaline fermentation liquid by activated sludge submitted to the aerobic feeding and discharge process. *Environmental Science and Technology*. 2009, 43, 7734–7741. ISSN 0013-936X.
66. REDDY, M. V., MOHAN, S. V. Influence of aerobic and anoxic microenvironments on polyhydroxyalkanoates (PHA) production from food waste and acidogenic effluents using aerobic consortia. *Bioresource Technology*. 2012, 103, 313–321. ISSN 3457-3462.

67. HOLMES, P. A. Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*. 1985, 16, 32–36. ISSN 0305-4624.
68. DU, Z., LI, H., GU, T. A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*. 2007, 25, 464–482. ISSN 0734-9750.
69. FREGUIA, S., TEH, E. H., BOON, N., LEUNG, K. M., KELLER, J., RABAEY, K. Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 1233–1238. ISSN 3457-3462.
70. CHAE, K., CHOI, M., LEE, J., KIM, K., KIM, I. S. Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresource Technology*. 2009, 100, 3518–3525. ISSN 3457-3462.
71. LV, W., SCHANBACHER, F. L., YU, Z. Putting microbes to work in sequence: recent advances in temperature-phased anaerobic digestion processes. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 9409–9414. ISSN 3457-3462.
72. DEMIRER, G. N., CHEN, S. Two-phase anaerobic digestion of unscreened dairy manure. *Process Biochemistry*. 2005, 40, 3542–3549. ISSN 1359-5113.
73. CAVINATO, C., BOLZONELLA, D., FATONE, F., CECCHI, F., PAVAN, P. Optimization of twophase thermophilic anaerobic digestion of biowaste for hydrogen and methane production through reject water recirculation. *Bioresource Technology*. 2011, 102, 8605–8611. ISSN 3457-3462.
74. WANG, W., XIE, L., CHEN, J., LUO, G., ZHOU, Q. Biohydrogen and methane production by co-digestion of cassava stillage and excess sludge under thermophilic condition. *Bioresource Technology*. 2011, 102, 3833–3839. ISSN 3457-3462.
75. DOGAN, T., INCE, O., OZ, N. A., INCE, B. K. Inhibition of volatile fatty acid production in granular sludge from a UASB reactor. *Journal of Environmental Engineering*. 2005, 40, 633–644. ISSN 0733-9372.
76. WANG, Y., ZHANG, Y., WANG, J., MENG, L. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy*. 2009, 33, 848–853. ISSN: 0961-9534.
77. XUE, F., MIAO, J., ZHANG, X., LUO, H., TAN, T. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresource Technology*. 2008, 99, 5923–5927. ISSN 3457-3462.
78. GUI, M. M., LEE, K. T., BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy*. 2008, 33, 1646–1653. ISSN: 0360-5442.

79. CHI, Z., ZHENG, Y., MA, J., CHEN, S. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2011, 36, 9542–9550. ISSN 0360-3199.

80. FEI, Q., CHANG, H. N., SHANG, L., CHOI, J., KIM, N., KANG, J. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albitus* for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2011, 102, 2695–2701. ISSN 3457-3462.

81. HENZE, M. Capabilities of biological nitrogen removal processes from wastewater. *Water Science and Technology*. 1991, 23, 669–679. ISSN 0273-1223.

82. TONG, J., CHEN, Y. Enhanced biological phosphorus removal driven by shortchain fatty acids produced from waste activated sludge alkaline fermentation. *Environmental Science and Technology*. 2007, 41, 7126–7130. ISSN 0013-936X.

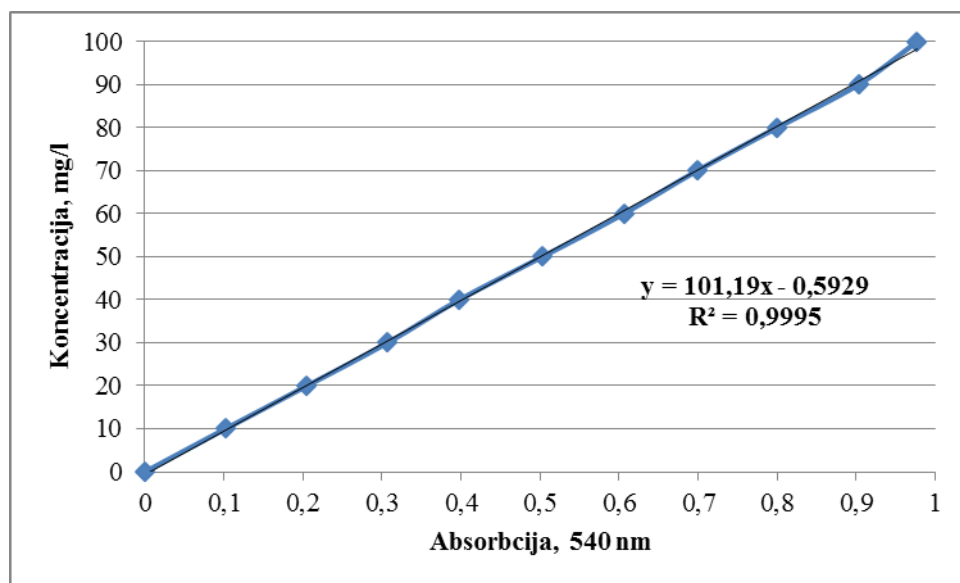
83. ELEFSINIOTIS, P., WAREHAM, D. G. Utilization patterns of volatile fatty acids in the denitrification reaction. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, 41, 92–97. ISSN 0141-0229.

84. DEMIREL, B., YENIGUN, O. Anaerobic acidogenesis of dairy wastewater: the effects of variations in hydraulic retention time with no pH control. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2004, 79. ISSN 1097-4660.

85. DOMINGOS, J. M. B., MARTINEZ, G. A., SCOMA, A., FRARACCIO, S., KERCKHOF, F-M., BOON, N., REIS, M. A. M., FAVA, F., BERTIN, L. Effect of operational parameters in the continuous anaerobic fermentation of cheese whey on titers, yields, productivities, and microbial community structures. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 2017, 5(2), 1400–1407. ISSN 2168-0485.

## PRIEDAI

### 1 PRIEDAS. Laktozēs kalibracinē kreivē



### 2 PRIEDAS. Laktozēs koncentrācijas kitimas, fermentuojant sūrinės išrūgas

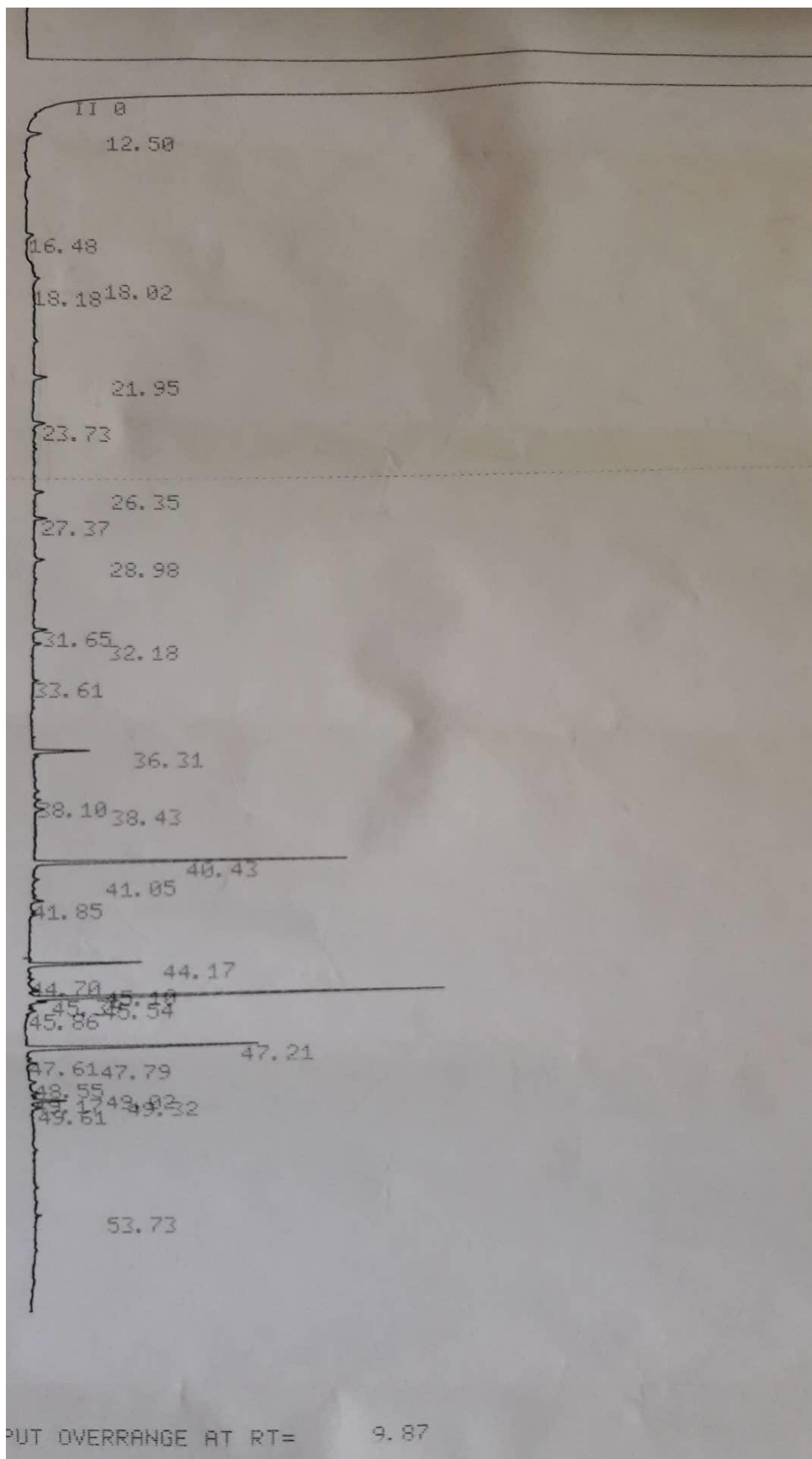
Kultūra	Fermentacijos laikas, val							
	0		12		24		48	
	Sugertis, 540 nm (f-100)	Laktozės koncentracija, mg/l	Sugertis, 540 nm (f-10)	Laktozės koncentracija, mg/l	Sugertis, 540 nm	Laktozės koncentracija, mg/l	Sugertis, 540 nm	Laktozės koncentracija, mg/l
135	0,264	158,84	0,176	105,6	0,839	50,33	0,491	29,47
18	0,264	158,84	0,174	104,49	0,113 (f-10)	67,91	0,630	37,78
22	0,264	158,84	0,162	97,16	0,724	43,41	0,370	22,22
244	0,264	158,84	0,202	121,24	0,131 (f-10)	78,64	0,869	52,14
140	0,264	158,84	0,169	101,32	0,182 (f-10)	61,47	0,795	47,68



**3 PRIEDAS.** Laktozēs koncentrācijas kitimas fermentuojant laktozēs melasą

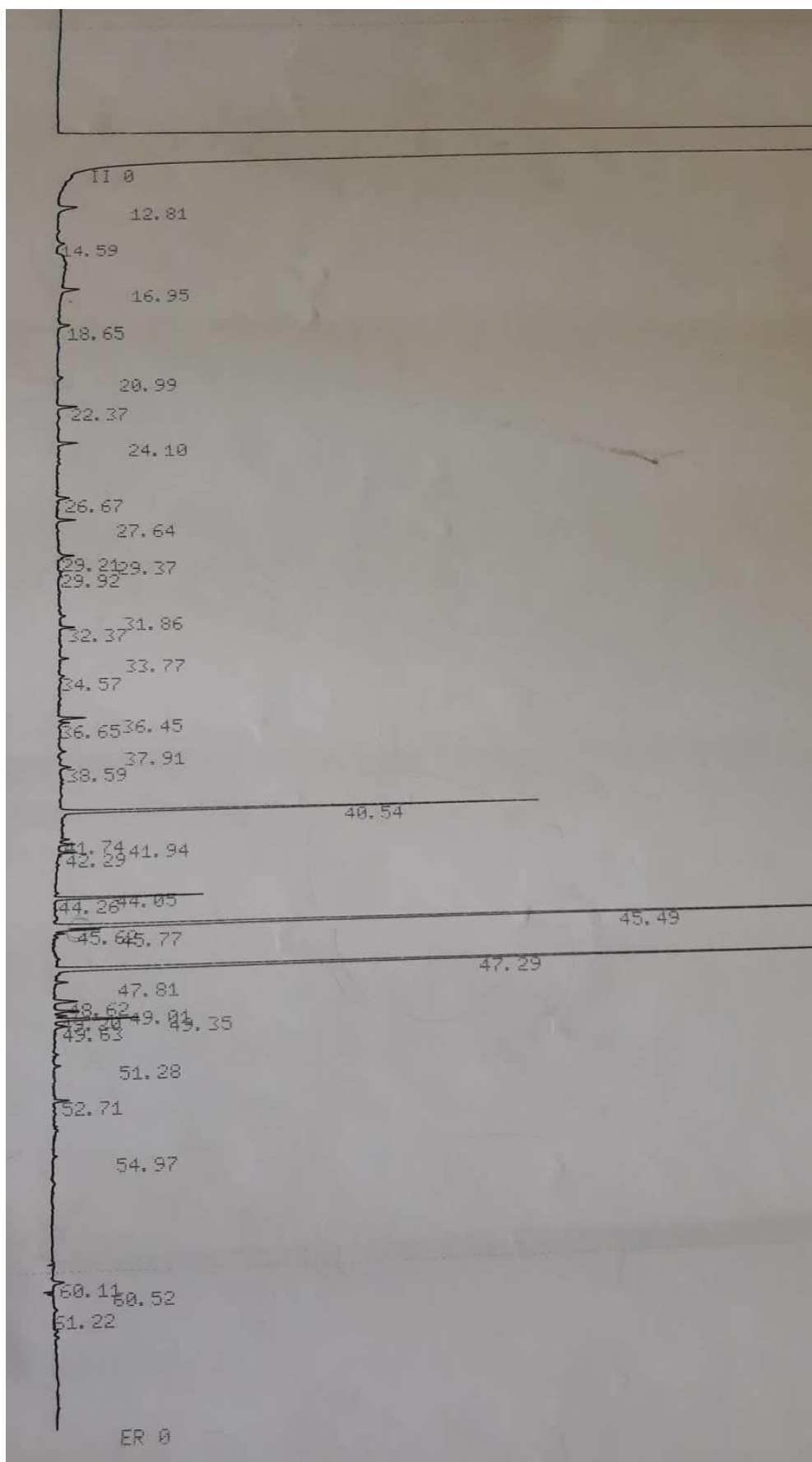
Kultūra	Fermentacijos laikas, val.							
	0		12		24		48	
	Sugertis, 540 nm (f-10)	Laktozės koncentracija, mg/l	Sugertis, 540 nm, (f-10)	Laktozės koncentracija, mg/l	Sugertis, 540 nm, (f-10)	Laktozės koncentracija, mg/l	Sugertis, 540 nm	Laktozės koncentracija, mg/l
135	0,308	184,79	0,216	129,59	0,141	84,58	0,887	53,21
18	0,308	184,79	0,222	133,19	0,160	96,14	0,102 (f-10)	61,27
22	0,308	184,79	0,201	120,59	0,119	71,13	0,672	40,32
244	0,308	184,79	0,235	140,99	0,185	111,27	0,154 (f-10)	92,16
140	0,308	184,79	0,211	126,59	0,142	85,44	0,881	52,88

4 PRIEDAS. Nefermentuotų sūrinių išrūgų chromatograma ir smailių išėjimo laikai



PK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	1.437	12.5	5682	01
2	0.715	16.48	2828	01
3	1.979	18.02	7826	02
4	2.362	18.18	9341	03
5	1.178	21.95	4660	01
6	1.05	23.73	4153	01
7	0.714	26.35 (2)	2823	01
8	0.836	27.37	3306	01
9	0.54	28.98 (3)	2134	01
10	1.088	31.65 (4)	4301	01
11	0.534	32.18	2110	01
12	0.327	33.61	1295	01
13	4.053	36.31 (6)	16027	01
14	0.295	38.1 (7)	1167	01
15	0.597	38.43 (8)	2361	01
16	19.272	40.43 (10)	76216	01
17	0.337	41.05	1333	01
18	0.893	41.85 (11)	3533	01
19	7.714	44.17 (14)	30507	01
20	0.186	44.7	737	01
21	0.358	45.1 (15)	1415	01
22	27.87	45.39 (16)	110219	02
23	1.344	45.54	5317	02
24	0.561	45.86	2219	03
25	16.973	47.21 (18)	67124	01
26	0.306	47.61 (19)	1211	02
27	0.696	47.79 (19)	2752	03
28	0.64	48.55 (20)	2530	01
29	0.618	49.02	2446	01
30	0.323	49.17 (21)	1279	02
31	3.003	49.32 (22)	11875	03
32	0.965	49.61	3817	01
33	0.237	53.73	938	01
TAL	100.		395482	

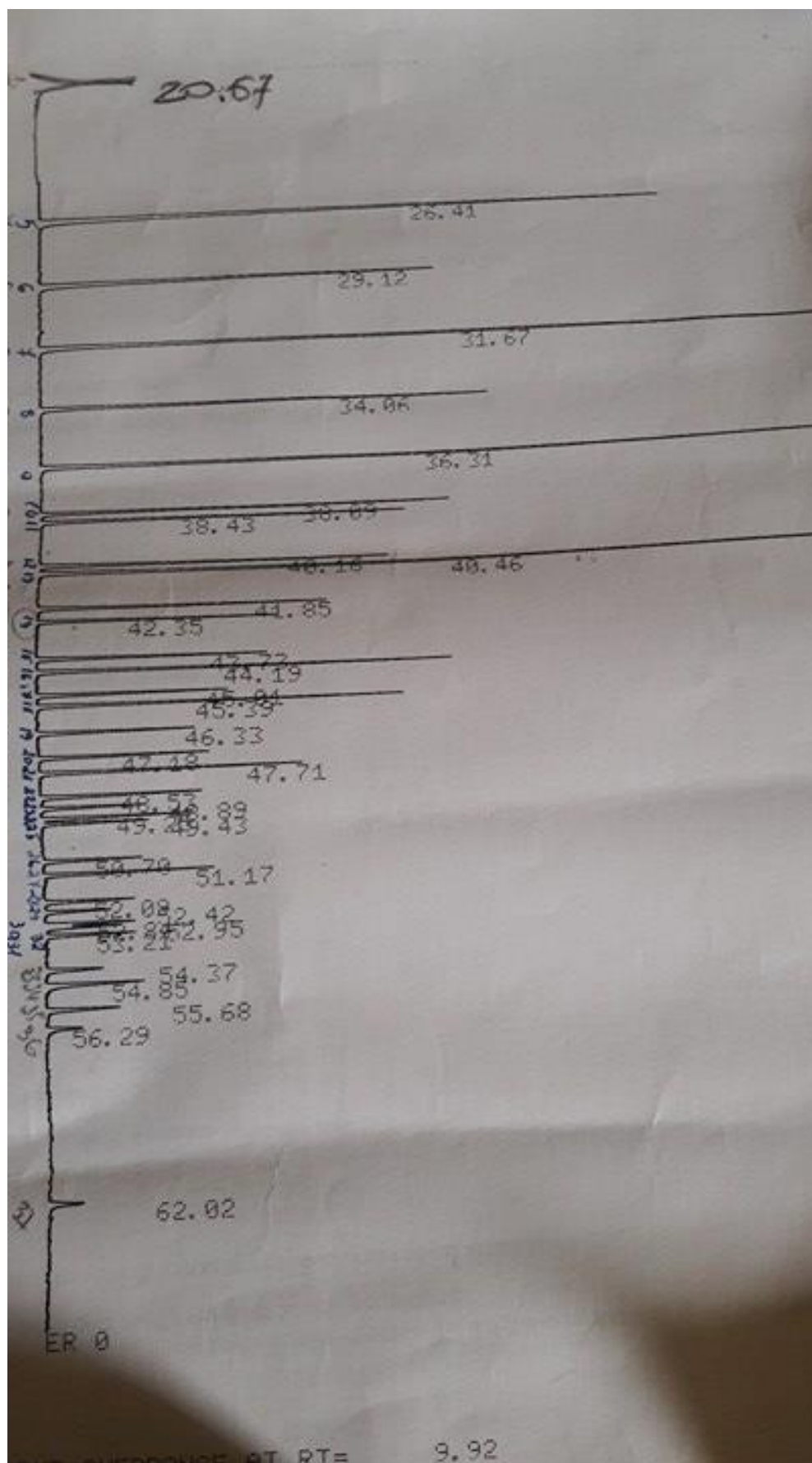
5 PRIEDAS. Nefermentuotos laktozės melasos chromatograma ir smailių išėjimo laikai



FILE 1. METHOD 0. RUN 18 IND

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	1.128	12.81	11302	01
2	0.262	14.59	2620	01
3	0.748	16.95	7493	01
4	0.455	18.65	4561	01
5	0.176	<u>20.99 (1)</u>	1765	01
6	0.764	22.37	7655	01
7	0.712	24.1	7132	01
8	0.455	<u>26.67 (2)</u>	4558	01
9	0.689	27.64	6901	01
10	0.65	<u>29.21 (3)</u>	6510	02
11	0.129	29.37	1290	03
12	0.091	29.92	912	01
13	0.162	<u>31.86 (4)</u>	1620	01
14	0.438	32.37	4387	01
15	0.237	33.77	2371	01
16	0.151	<u>34.57 (5)</u>	1508	01
17	0.865	<u>36.45 (6)</u>	8670	02
18	0.312	36.65	3130	03
19	0.135	37.91	1352	01
20	0.386	<u>38.59 (6)</u>	3868	01
21	13.778	<u>40.54 (10)</u>	138035	01
22	0.227	<u>41.74 (11)</u>	2275	01
23	0.413	41.94 (11)	4138	01
24	0.495	42.29 (12)	4964	01
25	0.115	<u>44.05 (13)</u>	1152	02
26	4.439	<u>44.26 (14)</u>	44469	03
27	32.984	<u>45.49 (16)</u>	329645	02
28	1.274	45.62	12762	02
29	0.244	45.77	2449	03
30	30.129	<u>47.29 (18)</u>	301841	01
31	0.339	<u>47.81 (19)</u>	3397	01
32	0.918	<u>48.62 (20)</u>	9195	01
33	0.799	<u>49.01 (21)</u>	8003	02
34	0.324	<u>49.2 (22)</u>	3249	02
35	2.827	<u>49.35 (23)</u>	28318	03
36	0.373	<u>49.63</u>	3737	01
37	0.166	<u>51.28 (25)</u>	1660	01
38	0.485	52.71	4862	01
39	0.1	<u>54.97 (32)</u>	1002	01
40	0.419	<u>60.11</u>	4197	01
41	0.121	60.52	1217	03
42	0.165	61.22	1656	01

6 PRIEDAS. Standarto chromatograma ir smailių išėjimo laikai



ER 0

INPUT OVERRANGE AT RT= 9.92

RIEBALU R METILESTERIAI

21-12-16 14:29:36

FILE 1. METHOD 0. RUN 24 INDEX

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	1.716	20.67	38814	01
2	8.662	26.41	195955	01
3	4.926	29.12	111437	01
4	10.4	31.67	235268	01
5	4.923	34.06	111356	01
6	8.728	36.31	197433	01
7	4.294	38.09	97124	01
8	3.708	38.43	83871	01
9	3.553	40.16	80365	01
10	9.576	40.46	216614	01
11	2.871	41.85	64940	01
12	2.291	42.35	51815	01
13	2.268	43.73	51294	01
14	3.993	44.19	90324	01
15	1.875	45.01	42423	01
16	3.59	45.39	81210	01
17	1.606	46.33	36336	01
18	1.745	47.18	39475	01
19	2.578	47.71	58315	01
20	1.701	48.53	38471	01
21	1.038	48.89	23476	01
22	1.603	49.25	36269	02
23	1.064	49.43	24075	03
24	1.036	50.7	23426	01
25	1.775	51.17	40152	01
26	0.989	52.09	22369	01
27	0.687	52.42	15545	01
28	1.014	52.84	22937	02
29	0.785	52.95	17759	03
30	1.02	53.21	23077	01
31	0.657	54.37	14868	01
32	1.381	54.85	31246	01
33	0.932	55.68	21075	01
34	0.497	56.29	11250	01
35	0.519	62.02	11748	01

TOTAL 100.

222212

## Important Information About The Product.

### Component FAME Mix

Log No. 47885-U

	Component
d	
i-	1. Butyric Acid Methyl Ester (C4:0)
e	2. Caproic Acid Methyl Ester (C6:0)
	3. Caprylic Acid Methyl Ester (C8:0)
	4. Capric Acid Methyl Ester (C10:0)
	5. Undecanoic Acid Methyl Ester (C11:0)
	6. Lauric Acid Methyl Ester (C12:0)
	7. Tridecanoic Acid Methyl Ester (C13:0)
	8. Myristic Acid Methyl Ester (C14:0)
	9. Myristoleic Acid Methyl Ester (C14:1)
	10. Pentadecanoic Acid Methyl Ester (C15:0)
	11. cis-10-Pentadecenoic Acid Methyl Ester (C15:1)
	12. Palmitic Acid Methyl Ester (C16:0)
	13. Palmitoleic Acid Methyl Ester (C16:1)
	14. Heptadecanoic Acid Methyl Ester (C17:0)
	15. cis-10-Heptadecenoic Acid Methyl Ester (C17:1)
	16. Stearic Acid Methyl Ester (C18:0)
	17. Elaidic Acid Methyl Ester (C18:1n9t)
	18. Oleic Acid Methyl Ester (C18:1n9c)
	19. Linolelaidic Acid Methyl Ester (C18:2n6t)
	20. Linoleic Acid Methyl Ester (C18:2n6c)
	21. Arachidic Acid Methyl Ester (C20:0)
	22. $\gamma$ -Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n6)
	23. cis-11-Eicosenoic Acid Methyl Ester (C20:1)
	24. Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n3)
	25. Heneicosanoic Acid Methyl Ester (C21:0)
	26. cis-11,14-Eicosadienoic Acid Methyl Ester (C20:2)
	27. Behenic Acid Methyl Ester (C22:0)
	28. cis-8,11,14-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3n6)
	29. Erucic Acid Methyl Ester (C22:1n9)
	30. cis-11,14,17-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3n3)
	31. Arachidonic Acid Methyl Ester (C20:4n6)
	32. Tricosanoic Acid Methyl Ester (C23:0)
	33. cis-13,16-Docosadienoic Acid Methyl Ester (C22:2)
	34. Lignoceric Acid Methyl Ester (C24:0)
	35. cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid Methyl Ester (C20:5n3)
	36. Nervonic Acid Methyl Ester (C24:1)
	37. cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid Methyl Ester (C22:6n3)



**7 PRIEDAS.** Identifikuotos riebalų rūgštys ir jų koncentracijos mėginyje, proc.

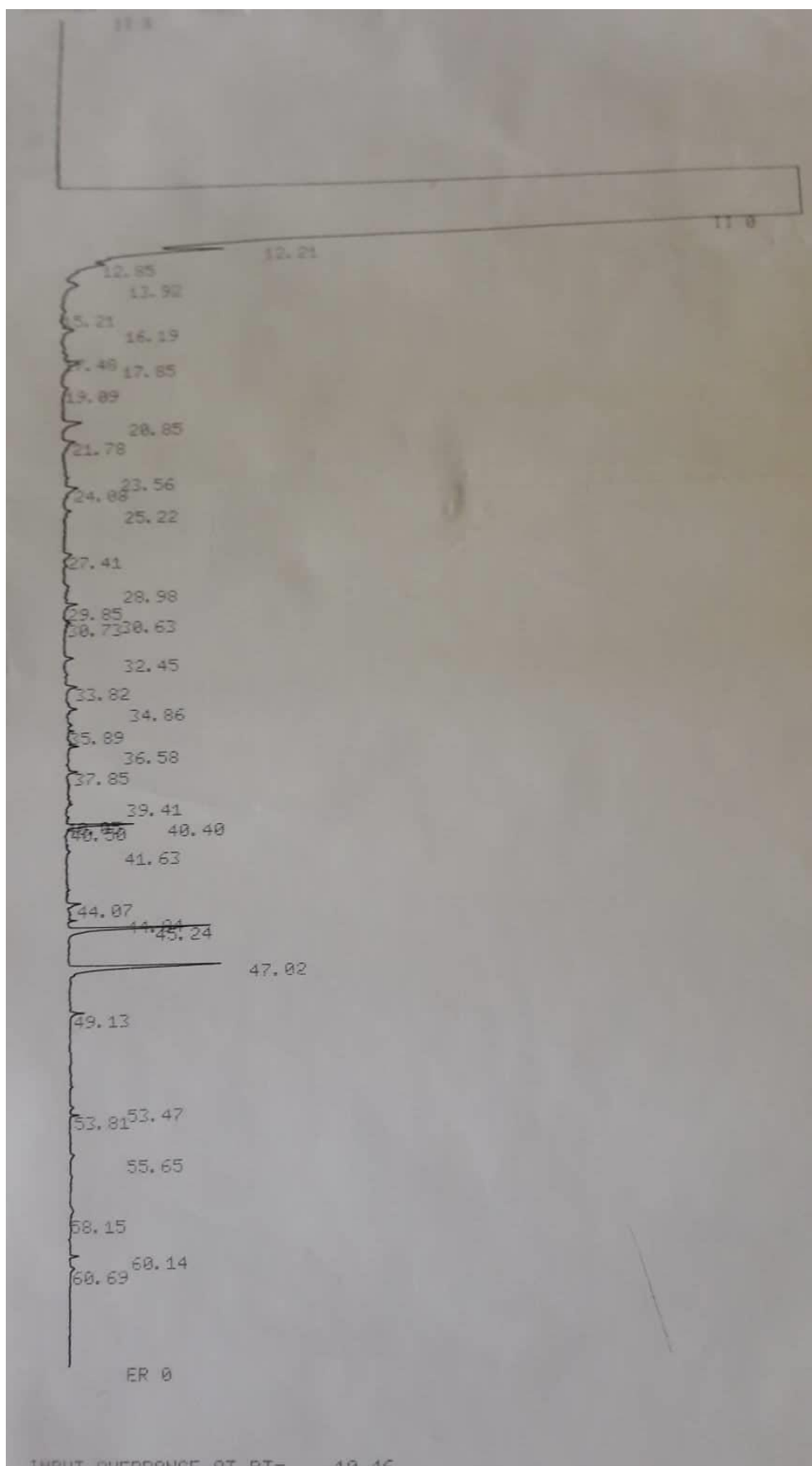
Standarto išėjimo laikas, min.	Bandinio išėjimo laikas (sūrinės išrūgos), min.	Kiekis bandinyje proc.	Riebalų rūgštis metilo esteris
26,41	26,35	0,714	<b>Kapriko rūgštis</b>
29,12	28,98	0,54	<b>Undekanoninės rūgštis</b>
31,67	31,65	1,088	<b>Lauro rūgštis</b>
36,31	36,31	4,053	<b>Miristino rūgštis</b>
38,09	38,1	0,295	<b>Miristoletitinė rūgštis</b>
38,43	38,43	0,597	<b>Pentadekanoninė rūgštis</b>
41,85	41,85	0,893	<b>Palmitoleitinė rūgštis</b>
44,19	44,17	7,714	<b>Stearino rūgštis</b>
45,01	45,1	0,358	<b>Elaidinė rūgštis</b>
45,39	45,39	27,87	<b>Oleino rūgštis</b>
47,18	47,21	16,973	<b>Linolinė rūgštis</b>
47,71	47,79	0,696	<b>Arachidino rūgštis</b>
48,55	48,55	0,64	<b>y-linoleninė rūgštis</b>
49,25	49,32	3,003	<b>Linoleninė rūgštis</b>
40,46	40,43	19,272	<b>Palmitino rūgštis</b>
			<b>Rūgštis metilo esteris</b>
Standartas	Laktozės melasa	Kiekis, proc.	
20,67	20,99	0,176	<b>Kaprilinės rūgštis</b>
26,41	26,67	0,455	<b>Kapriko rūgštis</b>
29,12	29,21	0,65	<b>Undekanoninė rūgštis</b>
31,67	31,86	0,162	<b>Lauro rūgštis</b>
34,06	34,57	0,151	<b>Tridekanoninė rūgštis</b>
36,31	36,45	0,865	<b>Miristino rūgštis</b>
38,43	38,59	0,386	<b>Pentadekanoninė rūgštis</b>
40,46	40,54	13,778	<b>Palmitino rūgštis</b>
41,85	41,94	0,413	<b>Palmitoleitinė rūgštis</b>
42,35	42,29	0,495	<b>Heptadekanoninė rūgštis</b>
44,19	44,26	4,439	<b>Stearino rūgštis</b>
45,39	45,49	32,904	<b>Oleino rūgštis</b>
47,18	47,29	30,129	<b>Linolinė rūgštis</b>
47,71	47,81	0,339	<b>Arachidino rūgštis</b>
48,53	48,62	0,918	<b>y-linoleino rūgštis</b>
48,89	49,01	0,799	<b>Cis-11-eikosenoinė rūgštis</b>
49,25	49,35	2,827	<b>Linoleninė rūgštis</b>
51,17	51,28	0,166	<b>Behenino rūgštis</b>
54,85	54,97	0,1	<b>Lignocerino rūgštis</b>

**8 PRIEDAS.** Pagrindinės laisvosios riebalų rūgštys laktozės melasoje ir sūrinėse išrūgose

Kultūra	Ištirtų lipidų masė, mg	Laisvosios riebalų rūgšties metilo esteris									
		<b>Palmitinas</b>		<b>Stearinas</b>		<b>Oleinas</b>		<b>Linolas</b>		<b>Linoleinas</b>	
		Smailės plotis, proc.	Smailės išėjimo laikas, min	Smailės plotis, proc.	Smailės išėjimo laikas, min	Smailės plotis, proc.	Smailės išėjimo laikas, min	Smailės plotis, proc.	Smailės išėjimo laikas, min	Smailės plotis, proc.	Smailės išėjimo laikas, min.
18	2,2	7,895	40,33	1,979	44,01	26,88	45,18	19,826	46,96	3,269	49,04
135	1,8	5,353	40,3	1,6	43,97	12,337	45,14	12,897	45,87	7,153	49,27
22	2,3	8,03	40,33	1,61	44	29,294	45,16	26,217	46,93	3,79	49,29
244	2	10,558	40,43	1,391	44,07	24,11	45,23	32,236	47,01	2,081	49,11
140	3,3	12,22	40,26	2,694	43,94	33,641	45,11	31,409	46,88	7,295	48,91

Kultūra	Ištirtų lipidų masė, mg	Laisvosios riebalų rūgšties metilo esteris									
		<b>Miristinas</b>		<b>Palmitinas</b>		<b>Stearinas</b>		<b>Oleinas</b>		<b>Linolas</b>	
		Smailės plotis, proc.	Smailės išėjimo laikas, min	Smailės plotis, proc.	Smailės išėjimo laikas, min	Smailės plotis, proc.	Smailės išėjimo laikas, min	Smailės plotis, proc.	Smailės išėjimo laikas, min	Smailės plotis, proc.	Smailės išėjimo laikas, min.
18	2,7	3,86	36,33	6,05	40,41	4,176	44,13	18,953	45,32	17,482	47,07
135	2,2	1,40	37,83	4,674	40,31	1,985	44,02	17,818	45,21	10,162	46,97
22	2,6	1,65	36,29	14,029	40,34	6,67	44,04	32,283	45,22	7,50	46,95
244	2,5	0,39	36,34	9,241	40,39	1,44	44,09	25,861	45,28	35,041	47,05
140	2,1	1,43	36,58	6,533	40,4	1,124	44,07	15,401	45,24	21,509	47,02

9 PRIEDAS. Sūrinių išrūgų chromatograma po fermentacijos, naudojant *L. brevis* LUHS140

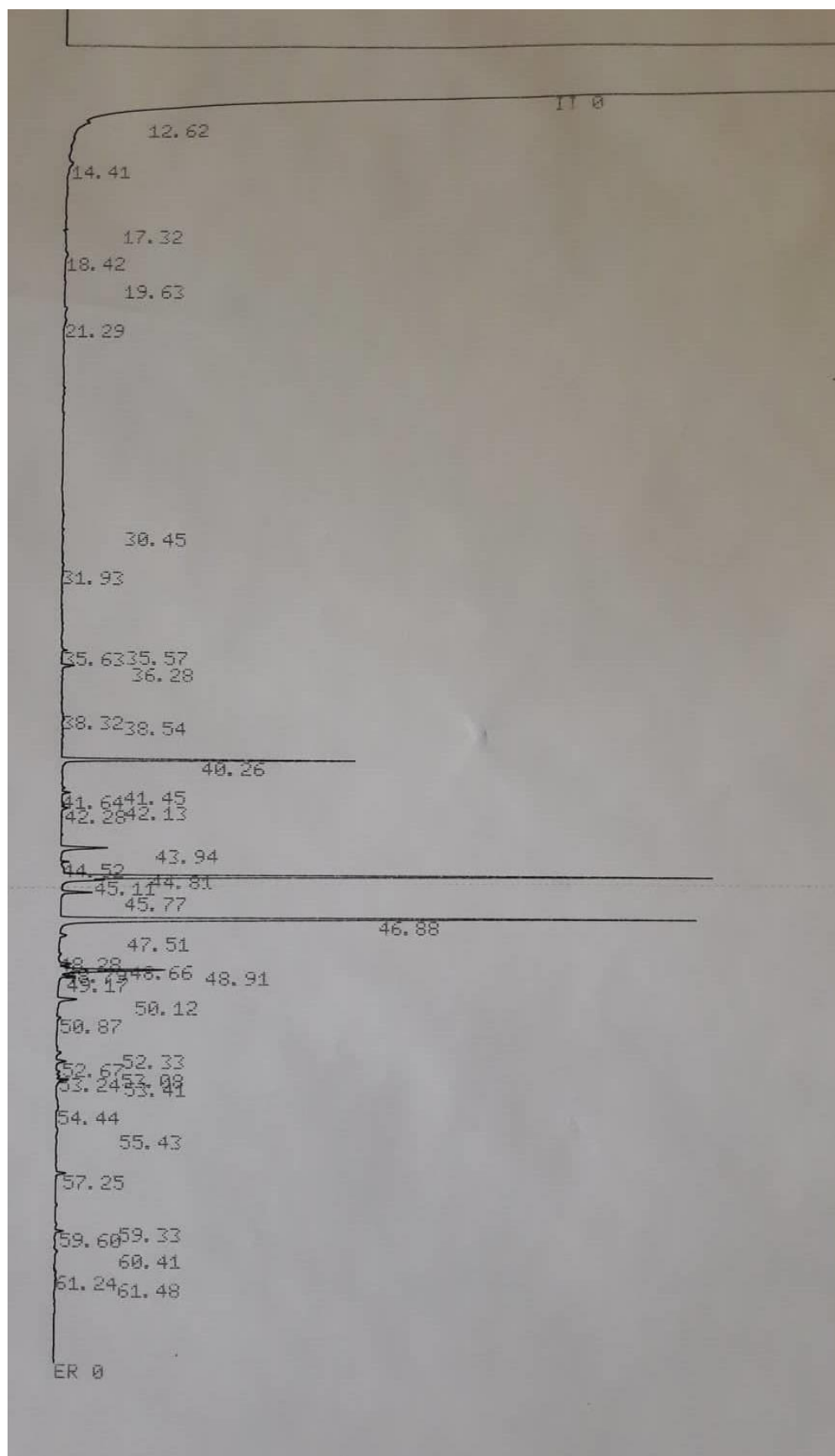


RTEBRLO A  
FILE 1. METHOD 0. RUN 7

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	12.396	12.21	52871	01
2	1.969	12.85	8399	01
3	3.154	13.92	13451	01
4	0.707	15.21	3016	01
5	1.899	16.19	8100	01
6	0.807	17.48	3442	02
7	5.521	17.85	23547	03
8	0.831	19.09	3544	01
9	3.971	20.85	16938	01
10	1.273	21.78	5430	01
11	0.334	23.56	1425	01
12	2.707	24.08	11545	01
13	0.597	25.22	2547	01
14	1.571	27.41	6701	01
15	2.485	28.98	10599	02
16	2.316	29.85	9879	03
17	0.136	30.63	578	01
18	0.294	30.73	1254	01
19	1.218	32.45	5193	01
20	1.131	33.82	4824	01
21	0.52	34.86	2219	01
22	0.238	35.89	1017	01
23	1.432	36.58	6107	01
24	0.784	37.85	3345	01
25	0.253	39.41	1077	01
26	0.267	40.05	1139	01
27	6.533	40.4	27865	02
28	0.517	40.5	2203	03
29	0.337	41.63	1436	01
30	1.124	44.07	4796	01
31	0.413	44.84	1762	01
32	15.401	45.24	65684	01
33	21.509	47.02	91737	01
34	1.302	49.13	5553	01
35	0.415	53.47	1768	01
36	0.566	53.81	2412	01
37	0.62	55.65	2643	01
38	1.137	58.15	4848	01
39	0.708	60.14	3018	01
40	0.607	60.69	2591	01

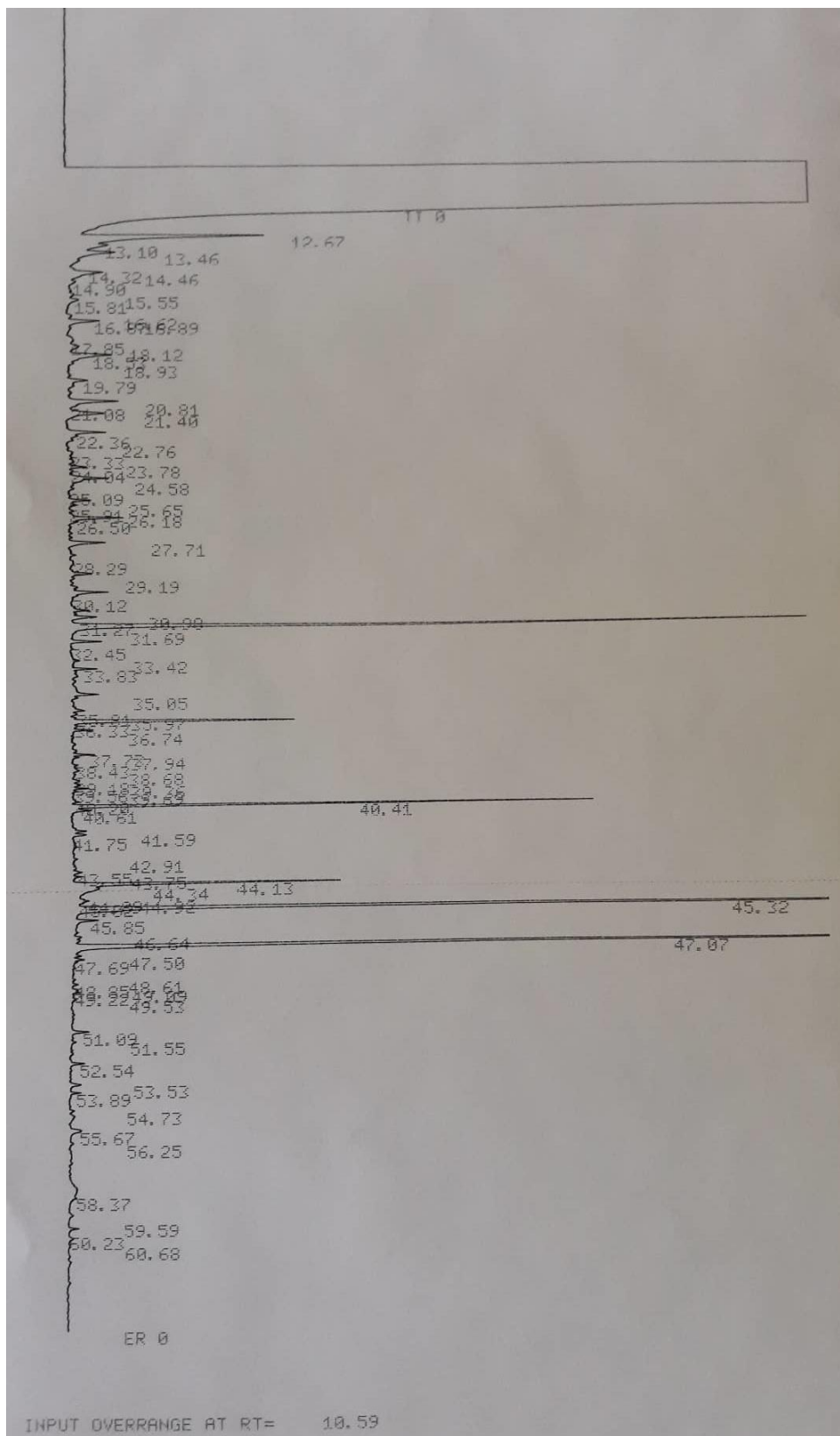
TOTAL 100. 426503

10 PRIEDAS. Laktozės melasos chromatograma po fermentacijos, naudojant *L. brevis* LUHS140



FILE 0.	METHOD 0.	RUN 74	
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	0.284	12.62	3967 01
2	0.536	14.41	7492 01
3	0.305	18.42	4258 01
4	0.092	19.63	1290 01
5	0.277	21.29	3875 01
6	0.077	30.45	1069 01
7	0.093	31.93	1305 01
8	0.054	35.57	748 02
9	0.151	35.63	2104 03
10	0.589	36.28	8230 01
11	0.055	38.32	768 01
12	0.114	38.54	1592 01
13	12.22	40.26	170696 01
14	0.12	41.45	1600 02
15	0.424	41.64	5922 03
16	0.091	42.13	1277 02
17	0.32	42.28	4476 03
18	2.694	43.94	37631 01
19	0.225	44.52	3147 01
20	0.37	44.81	5167 02
21	33.641	45.11	469926 02
22	1.589	45.77	22197 03
23	31.409	46.88	438752 01
24	0.337	47.51	4705 01
25	0.143	48.28	2002 01
26	0.598	48.66	8353 02
27	0.289	48.79	4032 02
28	7.295	48.91	101901 02
29	0.682	49.17	9522 03
30	1.198	50.12	16740 01
31	0.183	50.87	2560 01
32	0.23	52.33	3209 01
33	0.461	52.67	6446 01
34	0.174	53.08	2437 02
35	0.16	53.24	2240 02
36	0.381	53.41	5317 03
37	0.581	54.44	8109 01
38	0.246	55.43	3431 01
39	0.41	57.25	5732 01
40	0.14	59.33	1958 01
41	0.326	59.6	4556 01
42	0.204	60.41	2851 01
43	0.118	61.24	1655 01
44	0.113	61.48	1572 01
TOTAL	100.		1396897

11 PRIEDAS. Sūrinių išrūgų chromatograma po fermentacijos, naudojant *L. plantarium* LUHS18



PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	5.026	12.67	162728 02
2	1.201	13.1	33549 02
3	1.755	13.46	49026 03
4	0.069	14.32	1937 02
5	1.259	14.46	35154 02
6	0.160	14.9	4794 03
7	0.106	15.55	2965 02
8	0.279	15.81	7795 03
9	0.133	16.62	3717 02
10	0.313	16.87	8746 02
11	0.421	16.89	11751 03
12	0.331	17.85	9236 02
13	0.45	18.12	12501 02
14	1.553	18.53	43304 02
15	0.11	18.93	3068 03
16	0.334	19.79	9317 01
17	1.304	20.01	36424 02
18	0.087	21.00	2442 02
19	1.332	21.4	37194 03
20	1.063	22.36	29680 02
21	0.156	22.76	4358 02
22	0.448	23.33	12500 02
23	0.194	23.78	5423 02
24	0.414	24.04	11555 02
25	1.564	24.50	43600 02
26	0.144	25.09	4022 02
27	0.486	25.65	13565 02
28	0.15	25.91	4179 02
29	0.093	26.18	2587 02
30	1.164	26.5	32512 03
31	0.762	27.71	21276 01
32	0.436	28.29	12164 02
33	0.683	29.19	19076 02
34	1.279	30.12	35714 02
35	0.495	30.90	13022 02
36	0.595	31.27	16614 02
37	12.603	31.69	351989 02
38	0.498	32.45	13921 03
39	0.072	33.42	2009 01
40	0.239	33.83	6671 01
41	0.754	35.05	21065 02
42	0.419	35.81	11703 02
43	0.085	35.97	2377 02
44	3.061	36.33	107830 02
45	0.431	36.74	12027 02
46	0.253	37.73	7076 02
47	0.355	37.94	9907 03
48	0.033	38.43	923 01
49	0.059	38.60	1650 01
50	0.123	39.18	3445 02
51	0.146	39.36	4003 02
52	0.175	39.56	4890 02
53	0.034	39.69	944 03
54	0.109	40.2	3058 02
55	6.05	40.41	168982 02
56	0.321	40.61	8960 03
57	0.232	41.59	6400 02
58	0.201	41.75	5606 03
59	0.044	42.91	1235 01
60	0.139	43.55	3090 01
61	0.063	43.75	1752 01
62	4.176	44.13	116639 02
63	1.156	44.34	32299 02
64	0.113	44.89	3162 02
65	0.173	44.92	4034 02
66	0.09	45.02	2516 02
67	18.953	45.32	529341 03
68	0.312	45.85	8716 01
69	0.192	46.64	5368 02
70	17.482	47.07	488257 03
71	0.074	47.5	2075 02
72	0.167	47.69	4661 03
73	0.037	48.61	1020 01
74	0.054	48.85	1510 01
75	0.101	49.09	2025 02
76	0.053	49.22	1494 03
77	0.041	49.53	1140 01
78	0.218	51.09	6079 01
79	0.034	51.55	952 01
80	0.173	52.54	4836 01
81	0.160	53.53	4706 01
82	0.101	53.89	2027 01
83	0.276	55.67	7700 01
84	0.053	56.25	1494 01
85	0.099	58.37	25121 02
86	0.154	59.59	4313 02
87	0.179	60.23	4991 02
88	0.113	60.60	3144 03

3,861

6,05

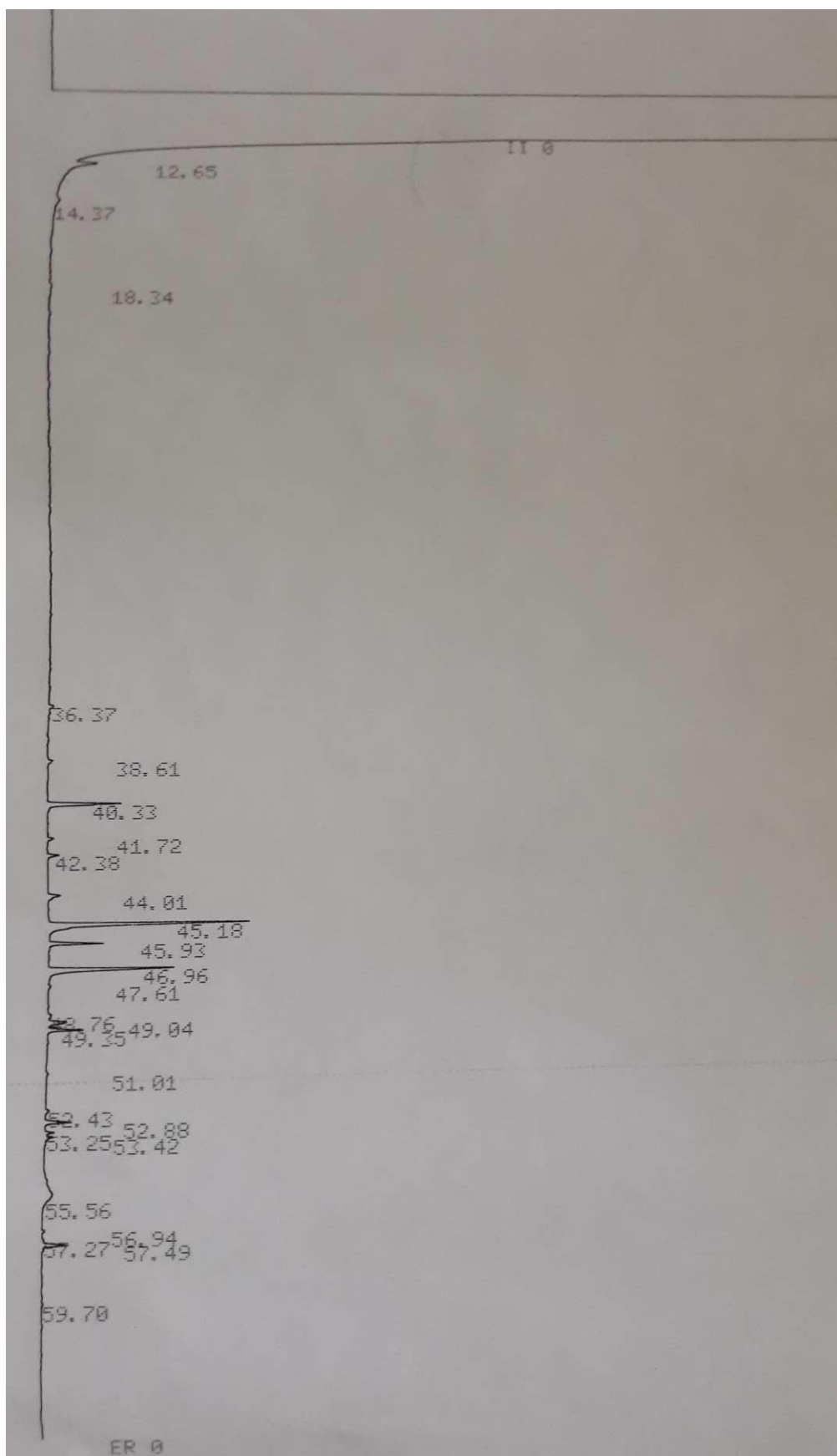
4,176

18,953

17,482



12 PRIEDAS. Laktozės melasos chromatograma po fermentacijos, naudojant *L. plantarium* LUHS18



INPUT OVERRANGE AT RT= 10.51

RME 27-04-18 13

FILE 0. METHOD 0. RUN 79 I

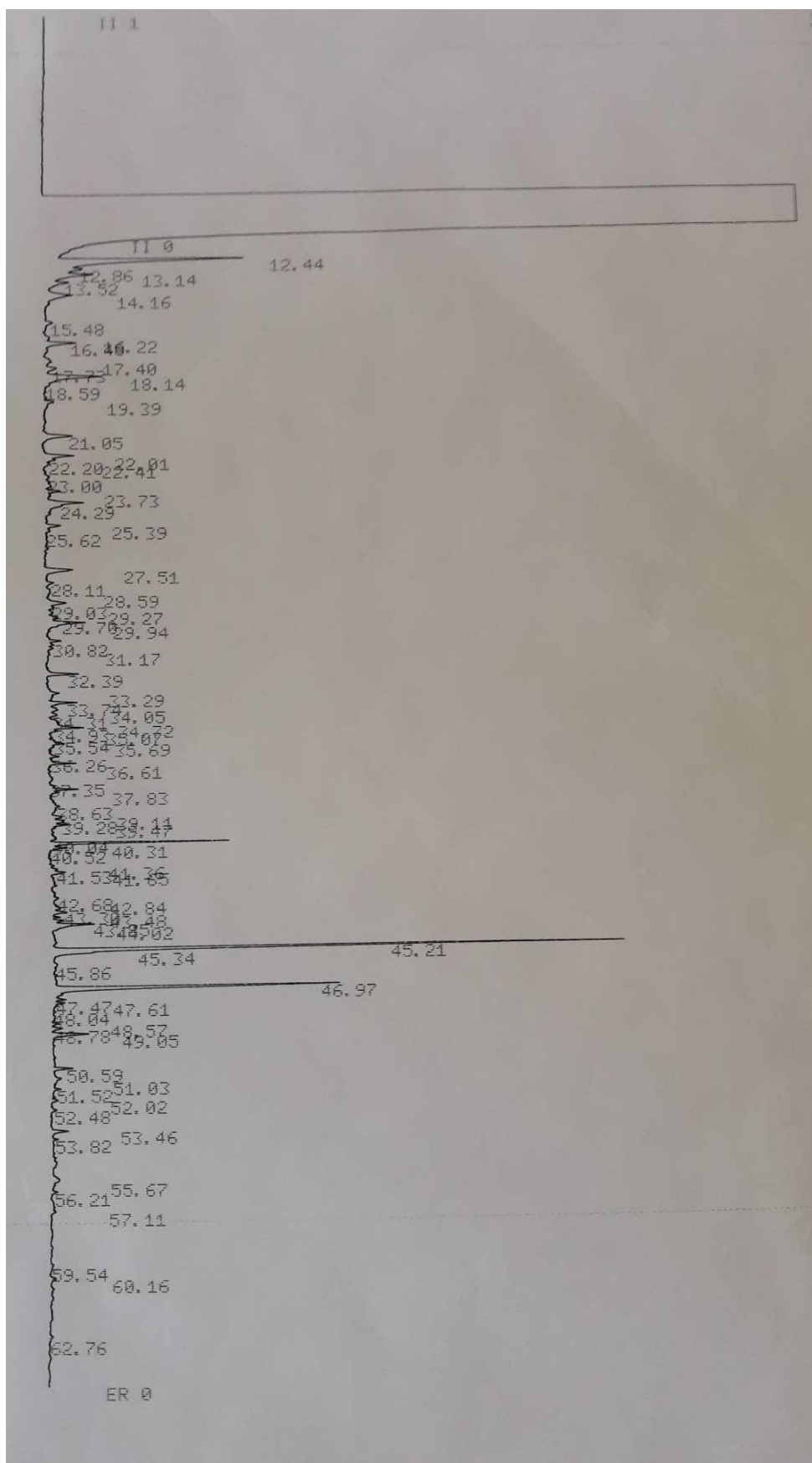
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	5.573	12.65	32264	01
2	1.545	14.37	8943	01
3	0.549	18.34	3176	01
4	0.495	36.37	2868	01
5	0.447	38.61	2587	01
6	7.895	40.33	45702	01
7	0.753	41.72	4359	01
8	1.041	42.38	6028	01
9	1.979	44.01	11458	01
10	26.88	45.18	155606	01
11	6.322	45.93	36595	01
12	19.826	46.96	114771	01
13	0.279	47.61	1617	01
14	0.589	48.76	3408	02
15	3.289	49.04	18925	02
16	4.073	49.35	23577	03
17	0.184	51.01	1064	01
18	0.373	52.43	2160	01
19	2.998	52.88	17357	01
20	0.922	53.25	5338	02
21	0.925	53.42	5415	03
22	0.63	55.56	49958	01
23	0.347	58.94	2011	01
24	0.277	57.27	1602	02
25	3.632	57.49	21023	03
26	0.185	59.7	1071	01

TOTAL 100.

578883

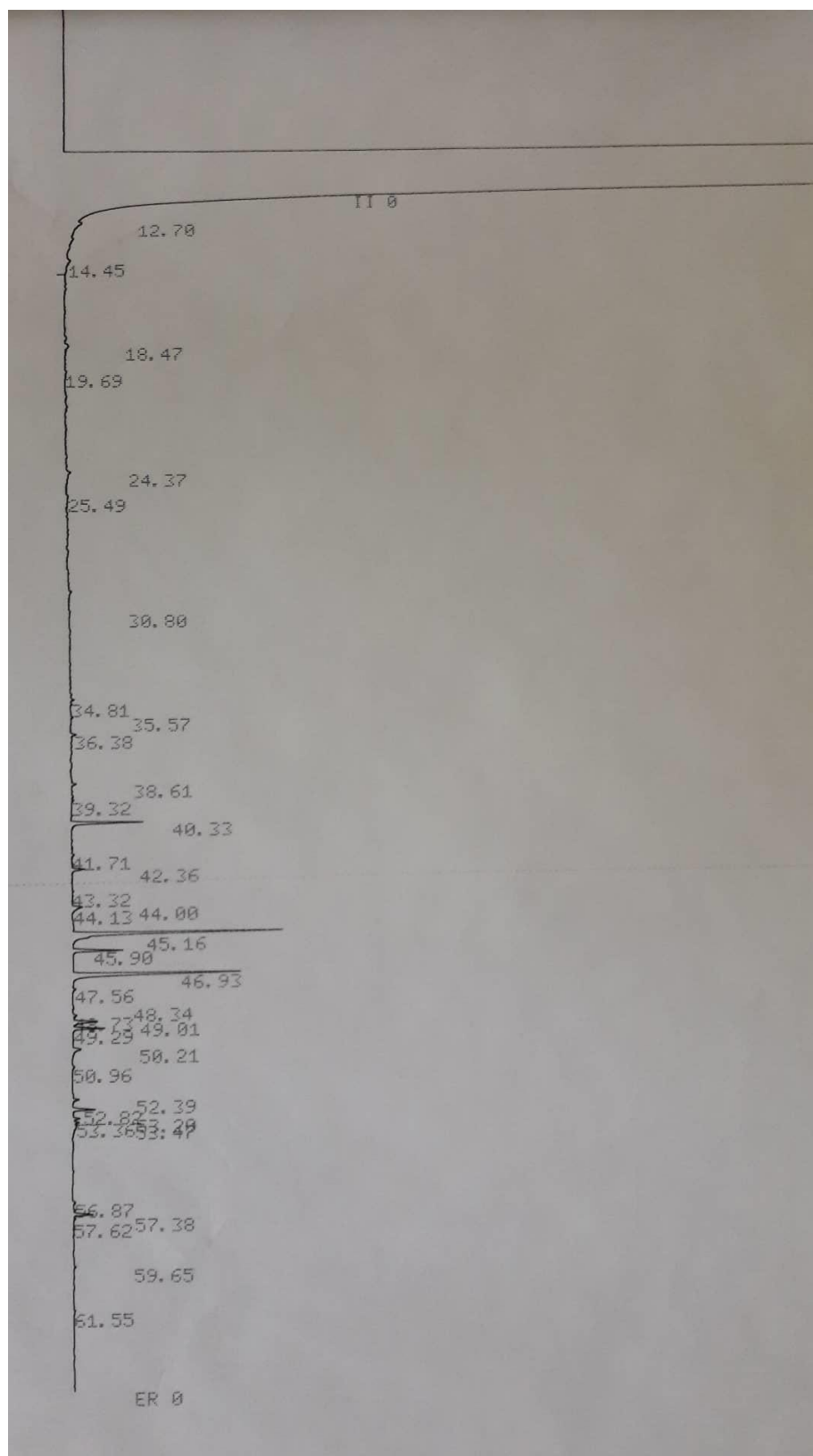
READY  
ATE  
REMI

13 PRIEDAS. Sūrinių išrūgų chromatograma po fermentacijos, naudojant *L. plantarium* LUHS135



PERK#	AREAL	RT	AREAL BC
1	12.454	12.44	157298 02
2	2.11	12.86	26645 02
3	2.857	13.14	36880 02
4	1.112	13.52	14851 03
5	2.212	14.16	27842 01
6	0.365	15.48	4866 01
7	0.255	16.22	3225 02
8	1.468	16.48	18549 03
9	0.396	17.4	5804 01
10	0.685	17.73	7641 02
11	4.08	18.14	51526 08
12	0.857	18.59	717 05
13	0.337	19.39	4257 01
14	1.511	21.05	19884 01
15	1.589	22.01	20075 02
16	0.548	22.2	6316 02
17	0.279	22.41	3520 03
18	0.777	23.	9816 02
19	0.782	23.73	9874 02
20	2.426	24.29	30645 03
21	0.497	25.39	6277 01
22	0.068	25.62	861 01
23	1.398	27.51	17653 01
24	0.167	28.11	2186 01
25	0.197	29.59	2483 01
26	1.203	29.03	15188 02
27	0.24	29.27	3828 02
28	0.924	29.7	11675 02
29	0.345	29.94	29612 02
30	0.82	30.82	10361 02
31	0.176	31.17	2217 03
32	0.967	32.39	12216 01
33	0.238	33.29	3883 01
34	0.895	33.74	11299 01
35	0.378	34.05	4771 02
36	0.255	34.31	4498 02
37	0.832	34.72	10503 02
38	1.485	34.93	18756 02
39	0.835	35.07	2966 03
40	0.237	35.54	2991 02
41	0.328	35.69	4141 03
42	0.357	36.26	4515 02
43	0.774	36.61	9778 03
44	0.236	37.35	2979 02
45	1.401	37.83	17696 03
46	0.139	38.63	1759 01
47	0.381	39.11	4814 02
48	0.58	39.28	7331 02
49	0.349	39.47	4414 03
50	0.25	40.04	3156 02
51	4.674	40.31	59030 02
52	0.597	40.52	7535 03
53	0.881	41.36	1821 02
54	0.227	41.53	2863 02
55	0.588	41.65	6417 03
56	0.226	42.68	2860 02
57	0.294	42.84	3712 02
58	0.558	43.3	7852 02
59	0.64	43.48	8087 02
60	0.439	43.85	5544 02
61	1.985	44.02	25074 03
62	17.818	45.21	225048 02
63	0.977	45.34	12339 03
64	0.111	45.86	1401 01
65	10.162	46.97	128346 01
66	0.267	47.47	3367 02
67	0.362	47.61	4568 03
68	0.185	48.57	2333 02
69	0.485	48.78	5110 02
70	1.607	49.05	20302 03
71	0.599	50.59	7560 01
72	0.359	51.03	4537 01
73	0.139	51.52	1761 01
74	0.177	52.02	2238 01
75	0.13	52.48	1643 01
76	0.56	53.46	7070 01
77	0.888	53.82	1112 01
78	0.576	55.67	7269 01
79	0.13	56.21	1646 01
80	0.124	57.11	1565 01
81	0.881	59.54	1017 01
82	0.091	60.16	1152 01
83	0.132	62.76	1663 01

14 PRIEDAS. Laktozės melasos chromatograma po fermentacijos, naudojant *L. plantarium* LUHS135



INPUT OVERRANGE AT RT= 10.46

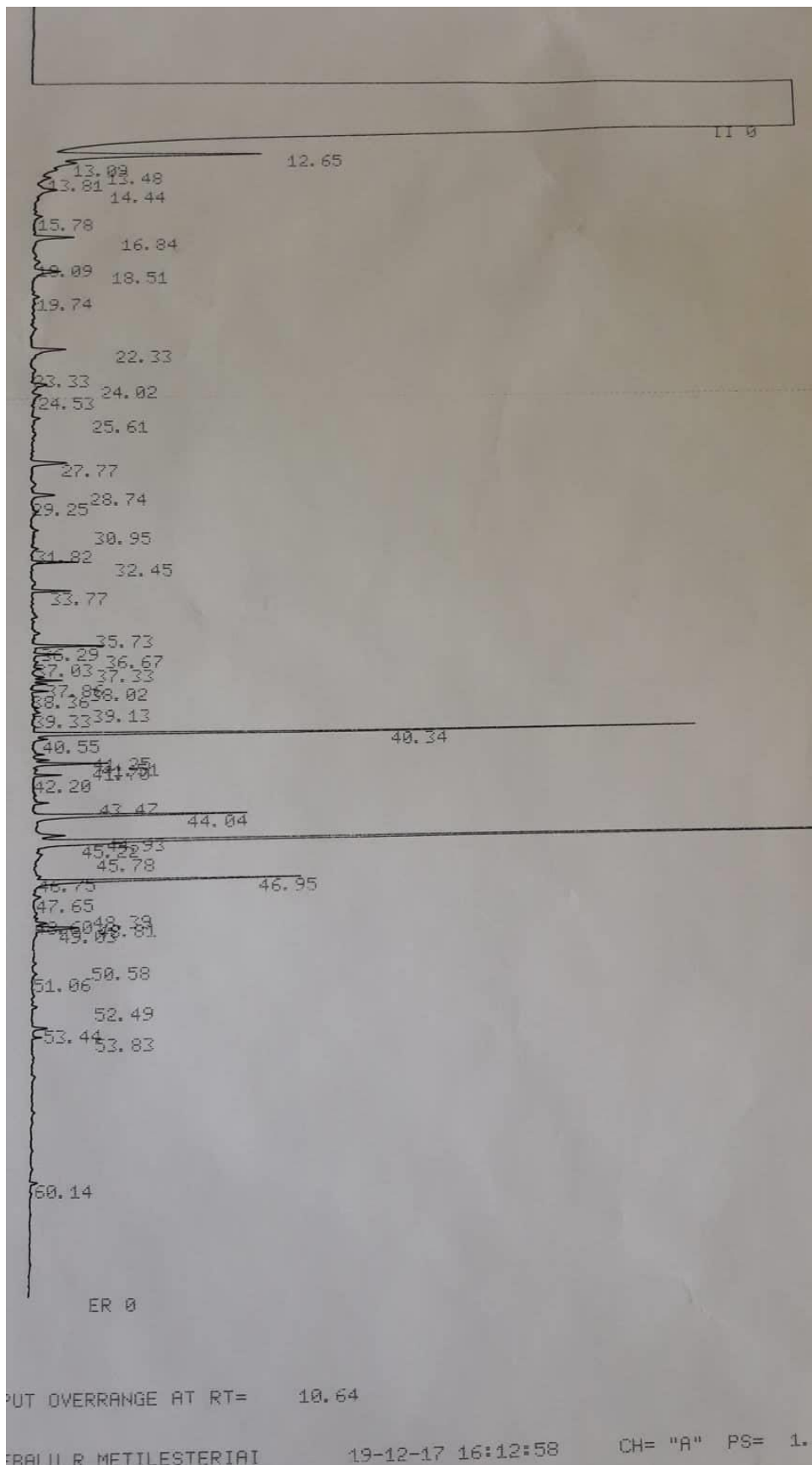
RRME 27-04-18 10

FILE 0. METHOD 0. RUN 77 I

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	1.02	12.7	5831	01
2	1.002	14.45	5726	01
3	1.396	18.47	7982	01
4	0.215	19.69	1228	01
5	0.404	24.37	2311	01
6	0.262	25.49	1500	01
7	0.136	30.8	779	01
8	0.49	34.81	2801	01
9	0.139	35.57	797	01
10	0.586	36.38	3348	01
11	0.535	38.61	3059	01
12	0.147	39.32	841	01
13	8.03	40.33	45903	01
14	0.294	41.71	1682	01
15	1.431	42.36	8179	01
16	0.145	43.32	827	01
17	1.61	44.	9204	02
18	0.095	44.13	545	03
19	29.294	45.16	167461	01
20	6.462	45.9	36940	01
21	26.217	46.93	149871	01
22	0.328	47.56	1873	01
23	0.234	48.34	1339	01
24	0.723	48.73	4131	02
25	4.17	49.01	23836	02
26	3.79	49.29	21664	03
27	1.383	50.21	7905	01
28	0.326	50.96	1863	01
29	0.693	52.39	3962	01
30	2.753	52.82	15737	01
31	0.758	53.2	4331	02
32	0.59	53.36	3372	02
33	0.132	53.47	754	03
34	0.293	56.87	1677	01
35	3.386	57.38	19358	02
36	0.126	57.62	722	03
37	0.241	59.65	1379	01
38	0.166	61.55	947	01

TOTAL 100. 571665

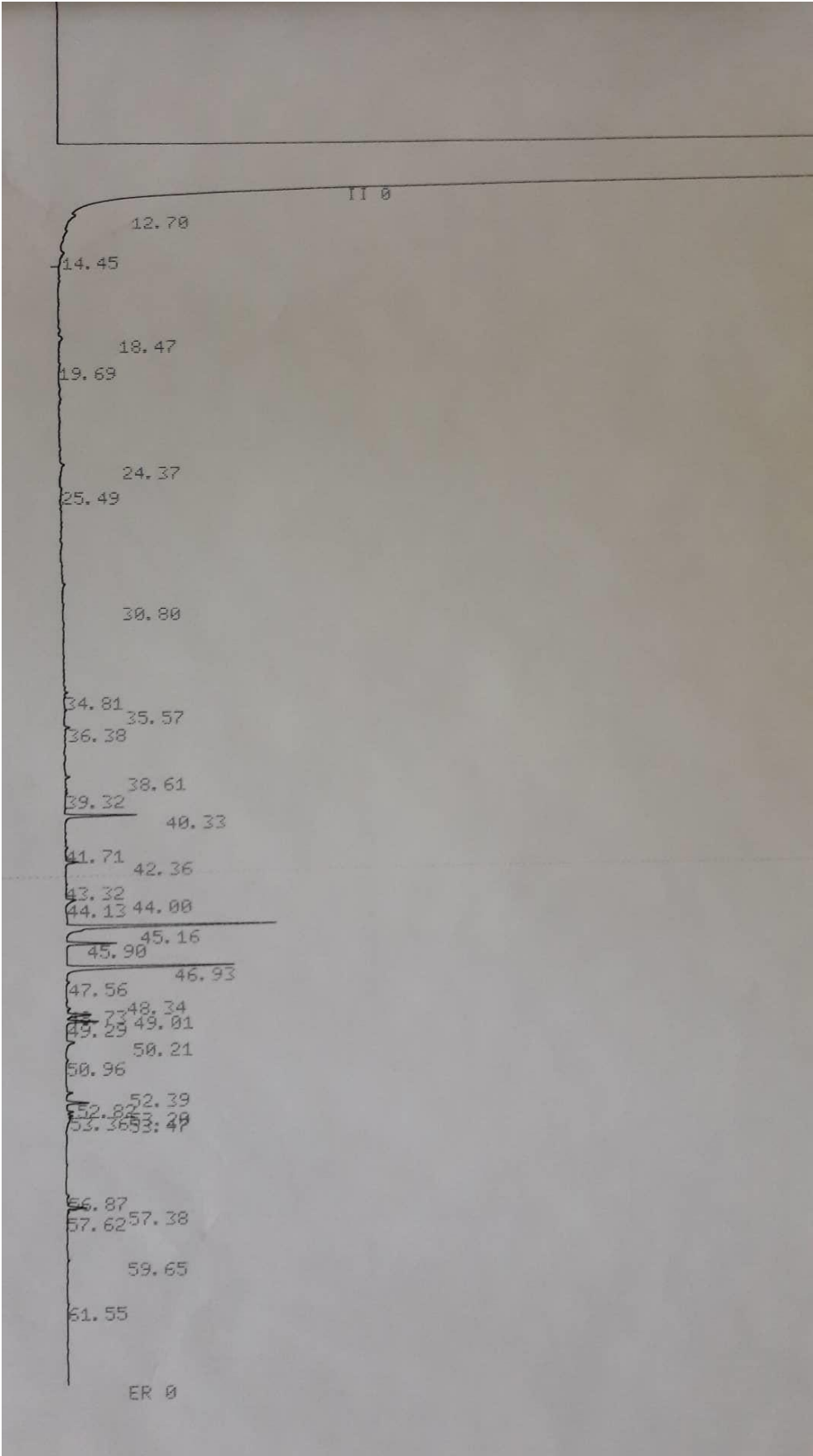
15 PRIEDAS. Sūrinių išrūgų chromatograma po fermentacijos, naudojant *P. pentosaceus* LUHS22



FILE 1.	METHOD 0.	RUN 21	INI
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	10.973	12.65	163679 02
2	1.516	13.09	22618 02
3	0.362	13.48	5395 03
4	0.306	13.81	4558 01
5	1.067	14.44	15915 01
6	0.305	15.78	4555 01
7	1.628	16.84	24282 01
8	0.168	18.09	2588 01
9	1.1	18.51	16416 01
10	0.2	19.74	2976 01
11	1.453	22.33	21671 01
12	0.227	23.33	3387 01
13	0.627	24.02	9360 01
14	0.185	24.53	2761 01
15	0.233	25.61	3480 01
16	1.549	27.77	23110 01
17	0.258	28.74	3844 02
18	0.969	29.25	14460 03
19	0.108	30.95	1604 01
20	0.16	31.82	2380 01
21	1.044	32.45	15569 01
22	0.775	33.77	11566 01
23	0.162	35.73	2421 01
24	1.647	36.29	24574 01
25	0.521	36.67	7767 01
26	0.059	37.03	886 01
27	0.132	37.33	1962 01
28	1.07	37.86	15960 02
29	0.304	38.02	4532 02
30	0.305	38.36	4552 03
31	0.126	39.13	1876 02
32	0.196	39.33	2926 03
33	14.029	40.34	209278 08
34	0.268	40.55	4001 05
35	0.328	41.25	4898 02
36	0.353	41.51	5273 02
37	2.076	41.7	30971 02
38	0.735	42.2	10961 03
39	0.254	43.47	3785 01
40	6.67	44.04	99501 01
41	1.139	44.93	16992 02
42	32.283	45.22	481567 02
43	0.428	45.78	6386 03
44	0.156	46.75	2333 02
45	7.502	46.95	111914 03
46	0.253	47.65	3781 01
47	0.114	48.39	1696 02
48	0.115	48.6	1710 02
49	0.427	48.81	6376 02
50	1.943	49.03	28990 03
51	0.093	50.58	1390 01
52	0.185	51.06	2757 01
53	0.125	52.49	1862 01
54	0.458	53.44	6830 01
55	0.158	53.83	2351 01
56	0.171	60.14	2554 01
TOTAL	100.		1491707



16 PRIEDAS. Laktozės melasos chromatograma po fermentacijos, naudojant *P. pentosaceus* LUHS22



INPUT OVERRANGE AT RT= 10.46

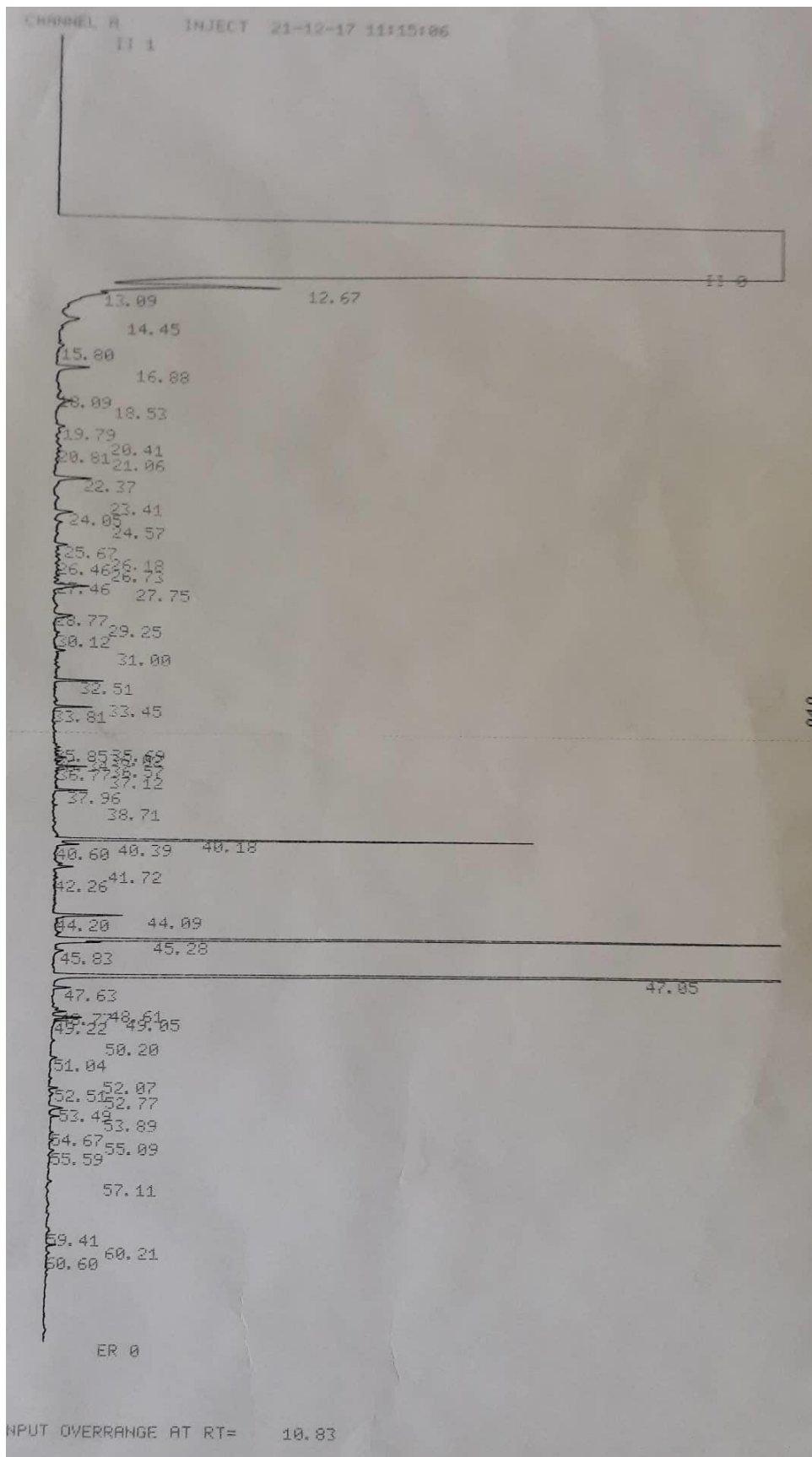
RRME 27-04-18 10

FILE 0. METHOD 0. RUN 77 I

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	1.02	12.7	5831	01
2	1.002	14.45	5726	01
3	1.396	18.47	7982	01
4	0.215	19.69	1228	01
5	0.404	24.37	2311	01
6	0.262	25.49	1500	01
7	0.136	30.8	779	01
8	0.49	34.81	2801	01
9	0.139	35.57	797	01
10	0.586	36.38	3348	01
11	0.535	38.61	3059	01
12	0.147	39.32	841	01
13	8.03	40.33	45903	01
14	0.294	41.71	1682	01
15	1.431	42.36	8179	01
16	0.145	43.32	827	01
17	1.61	44.	9204	02
18	0.095	44.13	545	03
19	29.294	45.16	167461	01
20	6.462	45.9	36940	01
21	26.217	46.93	149871	01
22	0.328	47.56	1873	01
23	0.234	48.34	1339	01
24	0.723	48.73	4131	02
25	4.17	49.01	23836	02
26	3.79	49.29	21664	03
27	1.383	50.21	7905	01
28	0.326	50.96	1863	01
29	0.693	52.39	3962	01
30	2.753	52.82	15737	01
31	0.758	53.2	4331	02
32	0.59	53.36	3372	02
33	0.132	53.47	754	03
34	0.293	56.87	1677	01
35	3.386	57.38	19358	02
36	0.126	57.62	722	03
37	0.241	59.65	1379	01
38	0.166	61.55	947	01

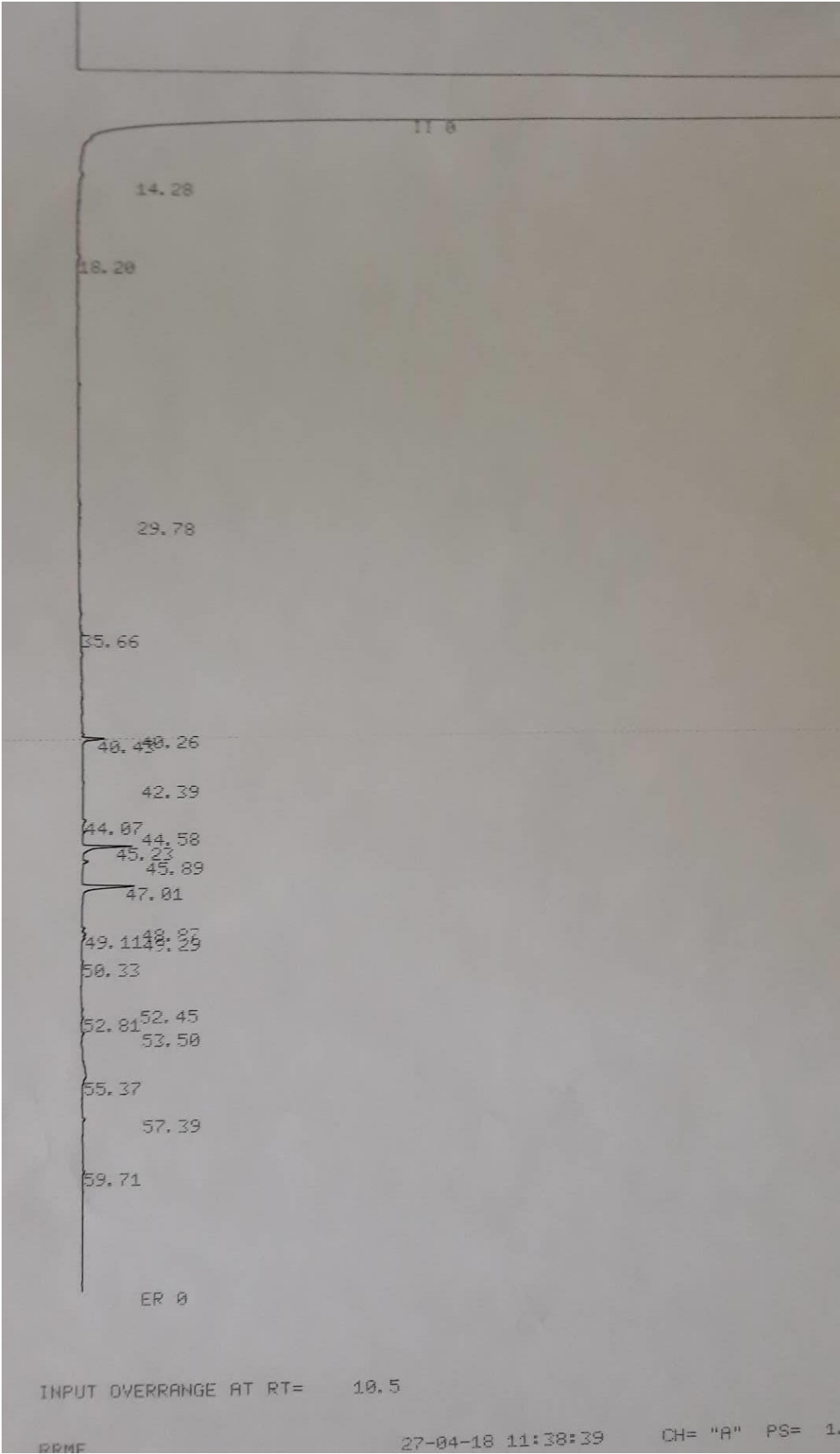
TOTAL 100. 571665

17 PRIEDAS. Sūrinių išrūgų chromatograma po fermentacijos, naudojant *L. paracasei* LUHS244



FILE 1.	METHOD 8.	RUN 26		
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.088	12.67	142445	02
2	0.664	13.09	11692	03
3	1.266	14.45	22295	01
4	0.218	15.8	3836	01
5	1.261	16.88	22208	01
6	0.177	18.09	3121	02
7	0.957	18.53	16851	03
8	0.228	19.79	4817	01
9	0.09	20.41	1592	01
10	0.262	20.81	4621	02
11	0.274	21.06	4822	03
12	1.228	22.37	21620	01
13	0.165	23.41	2898	01
14	0.586	24.05	10321	01
15	0.16	24.57	2813	01
16	0.334	25.67	5888	01
17	0.103	26.18	1814	02
18	0.201	26.46	3532	03
19	0.06	26.73	1051	01
20	0.121	27.46	2139	01
21	1.474	27.75	25955	01
22	0.202	28.77	3563	02
23	0.829	29.25	14595	03
24	0.085	30.12	1499	01
25	0.193	31.	3396	01
26	0.981	32.51	17272	01
27	0.163	33.45	2869	02
28	0.784	33.81	13801	03
29	0.068	35.69	1193	02
30	0.099	35.85	1735	02
31	0.122	36.02	2147	02
32	0.389	36.34	6852	02
33	0.123	36.57	2162	02
34	0.528	36.77	9303	03
35	0.051	37.12	892	01
36	0.535	37.96	9416	01
37	0.052	38.71	923	01
38	0.124	40.18	2190	02
39	9.241	40.39	162759	02
40	0.688	40.6	12118	03
41	0.596	41.72	10503	01
42	0.057	42.26	1003	01
43	1.44	44.09	25367	02
44	0.106	44.2	1874	03
45	25.861	45.28	455467	01
46	0.16	45.83	2813	01
47	35.041	47.05	617143	01
48	0.376	47.63	6626	01
49	0.15	48.61	2646	02
50	0.271	48.77	4767	03
51	0.739	49.05	13007	02
52	0.09	49.22	1590	03
53	0.076	50.2	1347	01
54	0.139	51.04	2445	01
55	0.055	52.07	969	01
56	0.179	52.51	3157	01
57	0.099	52.77	1738	01
58	0.429	53.49	7551	01
59	0.156	53.89	2748	01
60	0.052	54.67	914	01
61	0.076	55.09	1347	01
62	0.161	55.59	2841	01
63	0.099	57.11	1751	01
64	0.171	59.41	3003	01
65	0.178	60.21	3135	01
66	0.07	60.6	1234	01

18 PRIEDAS. Laktozės melasos chromatograma po fermentacijos, naudojant *L. paracasei* LUHS244



ER 0

INPUT OVERRANGE AT RT= 10.5

RRME 27-04-18 11:

FILE 0. METHOD 0. RUN 78 IF

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	3.878	14.28	7476	01
2	1.789	18.2	3450	01
3	1.991	29.78	3839	01
4	0.379	35.66	731	01
5	0.723	40.26	1394	02
6	10.558	40.43	20356	03
7	0.437	42.39	843	01
8	1.391	44.07	2681	01
9	0.522	44.58	1007	01
10	24.111	45.23	46486	01
11	2.19	45.89	4222	01
12	32.236	47.01	62151	01
13	0.596	48.87	1150	01
14	2.081	49.11	4013	02
15	1.051	49.29	2026	03
16	1.136	50.33	2191	01
17	0.545	52.45	1050	01
18	0.735	52.81	1417	01
19	0.705	53.5	1359	01
20	11.183	55.37	21560	01
21	1.011	57.39	1949	01
22	0.751	59.71	1448	01

TOTAL 100. 192799

18

CHANNEL A INJECT 27-04-18 13:05:09

**19 PRIEDAS.** Titravimui sunaudoti 0,1M NaOH tūriai sūrinēse išrūgose

Kultūra	Titravimui sunaudotas 0,1M NaOH, ml		Titracijos koeficientas, K 0,1
	24 val.	48 val.	
135	3,8	4,5	0,1
18	4,6	5,2	0,1
244	5,2	5,8	0,1
22	3,9	5,1	0,1
140	4,2	5,1	0,1

**20 PRIEDAS.** Titravimui sunaudoti 0,1M NaOH tūriai laktozės melasoje

Kultūra	Titravimui sunaudotas 0,1M NaOH, ml		Titracijos koeficientas, K 0,1
	24 val.	48 val.	
135	3,9	4,5	0,1
18	3,7	5,2	0,1
244	4,4	5,5	0,1
22	4,1	4,8	0,1
140	3,9	4,5	0,1

**21 PRIEDAS.** Acto rūgšties koncentracijos kitimas sūrinēse išrūgose fermentacijos eigoje

Kultūra	Acto rūgšties koncentracija fermentacijos pradžioje, mM	Acto rūgšties koncentracija po 24 val., mM	Acto rūgšties koncentracija po 48 val., mM
135	0,48	1,52	1,8
18	0,48	1,84	1,92
22	0,48	1,56	2,04
244	0,48	2,08	2,32
140	0,48	1,68	2,04

**22 PRIEDAS.** Acto rūgšties koncentracijos kitimas laktozės melasos fermentacijos eigoje

Kultūra	Acto rūgšties koncentracija fermentacijos pradžioje, mM	Acto rūgšties koncentracija po 24 val., mM	Acto rūgšties koncentracija po 48 val., mM
135	1,08	1,4	1,72
18	1,08	1,76	2,08
22	1,08	1,48	1,92
244	1,08	1,64	2,2
140	1,08	1,56	1,8