



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Rytis Gineika

**ULTRAGARSINIO POVEIKIO ĮTAKA SIAURALAPIŲ
MAISTINIŲ LUBINŲ SĖKLŲ BALTYMINĖMS MEDŽIAGOMS,
FUNKCINĖMS SAVYBĖMS IR MAISTINEI VERTEI PRB
KIETAFAZĖS FERMENTACIJOS SĄLYGOSE**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

KAUNAS, 2016

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**ULTRAGARSINIO POVEIKIO ĮTAKA SIAURALAPIŲ
MAISTINIŲ LUBINŲ SĖKLŲ BALTYMINĖMS MEDŽIAGOMS,
FUNKCINĖMS SAVYBĖMS IR MAISTINEI VERTEI PRB
KIETAFAZĖS FERMENTACIJOS SĄLYGOSE**

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

Vadovas

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

2016 – 06 –

Recenzentas

Doc. dr. Loreta Bašinskienė

2016 – 06 –

Projektą atliko

Rytis Gineika

2016 – 06 –

KAUNAS, 2016



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

(Fakultetas)

Rytis Gineika

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Ultragarsinio poveikio įtaka siauralapių maistinių lubinų sėklų baltyminėms medžiagoms, funkcinėms savybėms ir maistinei vertei PRB kietafazės fermentacijos sąlygose“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2016 m. birželio _____ d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Ryčio Gineikos**, baigiamasis projektas tema „Ultragarsinio poveikio įtaka siauralapių maistinių lubinų sėklų baltyminėms medžiagoms, funkcinėms savybėms ir maistinei vertei PRB kietafazės fermentacijos sąlygose“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Turinys

| | |
|--|----|
| Santrumpos | 9 |
| Įvadas | 10 |
| 1. Literatūros apžvalga..... | 12 |
| 1.1 Maistinių lubinų chemijos savitumas | 13 |
| 1.1.1 Lubinų sėklų fermentų charakteristika | 13 |
| 1.2 Lubinų baltyminių medžiagų išskyrimas ir panaudojimas | 13 |
| 1.2.1 Baltyminių medžiagų funkcinės savybės..... | 14 |
| 1.3 Fermentaciniai procesai lubinų perdirbimo metu | 17 |
| 1.3.1 Pieno rūgšties bakterijos ir jų charakteristika | 18 |
| 1.3.2 Lubinų cheminiai pokyčiai fermentacijos metu..... | 19 |
| 1.4 Ultragarso panaudojimo galimybės maisto pramonėje ir fermentacijos procesuose. | 20 |
| 2. Tyrimo objektai ir metodai | 22 |
| 2.1 Tyrimų kryptys | 22 |
| 2.2 Tyrimo objektai..... | 23 |
| 2.2.1 Maistiniai siauralapiai lubinai..... | 23 |
| 2.2.2 Kietafazė fermentacija | 24 |
| 2.2.3 Pieno rūgšties bakterijos | 24 |
| 2.2.4 Ultragarsinis apdorojimas | 25 |
| 2.3 Tyrimo metodai..... | 25 |
| 2.3.1 Bendro baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu..... | 25 |
| 2.3.2 Tirpiųjų baltymų kiekio nustatymas | 26 |
| 2.3.3 Lubinų baltyminių medžiagų išskyrimas ir gryninimas | 27 |
| 2.3.4 Baltyminių medžiagų analizė SDS-PAGE elektroforezės metodu..... | 27 |
| 2.3.5 Baltymų funkcinių savybių (putojimo, emulgavimo) įvertinimas..... | 28 |
| 2.3.6 Baltymų virškinamumo ir proteazių inhibicinio aktyvumo nustatymas..... | 29 |
| 2.3.7 Spektrofotometriniai metodai lubinų fermentinių aktyvumų nustatymui..... | 30 |
| 2.3.8 Bendro mikroorganizmų skaičiaus (BMS) nustatymas | 35 |

| | |
|--|----|
| 2.3.9 Matematinė statistinė duomenų analizė | 35 |
| 3. Rezultatai ir jų aptarimas | 36 |
| 3.1 Kietafazės fermentacijos įtaka lubinų baltyminėms medžiagoms | 36 |
| 3.1.1 Kietafazės fermentacijos ir pH įtaka lubinų sėklų baltyminių medžiagų funkcinėms savybėms | 39 |
| 3.1.2 Baltymų virškinamumo ir proteazių inhibitorių aktyvumai | 43 |
| 3.2 Fermentinių aktyvumų pokyčiai lubinų produktuose kietafazės fermentacijos sąlygose | 45 |
| 3.2.1 Proteazių aktyvumai | 45 |
| 3.2.2 Amilazių aktyvumai..... | 46 |
| 3.2.3 Ksilanazių aktyvumai | 47 |
| 3.3 Ultragarinio poveikio įtaka lubinų sėklų sudėčiai ir technologinėms savybėms kietafazės fermentacijos sąlygose | 48 |
| 3.3.1 Ultragarinio apdorojimo įtaka lubinų mikrobiologinės taršos mažinimui | 48 |
| 3.3.2 Bendro baltymų kiekio ir tirpiųjų baltymų analizė | 49 |
| 3.3.3 Ultragarinio poveikio įtaka fermentiniams aktyvumams lubinų produktuose kietafazės fermentacijos sąlygose | 52 |
| 3.3.3.1 Proteazių aktyvumai | 52 |
| 3.3.3.2 Amilazių aktyvumai..... | 53 |
| 3.3.3.3 Ksilanazių aktyvumai | 54 |
| 3.3.4 Ultragarinio poveikio įtaka baltyminėms medžiagoms kietafazės fermentacijos sąlygose | 56 |
| 3.3.4.1 Baltyminių medžiagų frakcijų sudėtis | 56 |
| 3.3.4.2 Baltyminių medžiagų funkcinės savybės..... | 57 |
| 3.3.4.3 Baltymų virškinamumo ir proteazių inhibitorių aktyvumai | 60 |
| Išvados | 62 |
| Bibliografinių nuorodų sąrašas | 63 |
| Priedai | 71 |

Gineika, Rytis. Ultragarsinio poveikio įtaka siauralapių maistinių lubinų sėklų baltyminėms medžiagoms, funkcinėms savybėms ir maistinei vertei PRB kietafazės fermentacijos sąlygose. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: *ultragarsas, lubinų sėklos, kietafazė fermentacija, pieno rūgštis bakterijos, baltyminės medžiagos, funkcinės savybės*

Kaunas, 2016. 70 p.

SANTRAUKA

Šiuo metu ypatingo dėmesio susilaukia savitomis funkcinėmis savybėmis pasižyminčių augalinių baltymų gamyba, siekiant plačiau pritaikyti juos maisto pramonėje. Sojos produktų gamyboje plačiai taikomi fermentacijos procesai. Pastarasis bioprocetas pradėtas naudoti ir lubinų sėklų perdirbimui, įrodant apdoroto produkto maistinės vertės pagerėjimą (virškinamumo padidėjimą ir proteazių inhibitorinių medžiagų aktyvumo sumažėjimą). Iki šiol nebuvo įvertinta kietafazės fermentacijos įtaka lubinų baltyminių medžiagų funkcinėms savybėms. Be to, maisto pramonėje pradėtas plačiai naudoti ultragarsas, kuris galėtų būti išbandytas ir fermentacijos procesuose.

Darbo tikslas – įvertinti ultragarsinio poveikio įtaką siauralapių maistinių lubinų (*Lupinus angustifolius*) sėklų baltyminėms medžiagoms, jų funkcinėms savybėms ir maistinei vertei PRB kietafazės fermentacijos (KF) sąlygose. Eksperimento metu tirta ultragarsinio poveikio (60 min, 37 kHz) įtaka fermentuojamiems KF sąlygose (trukmė 72 h) siauralapių lubinų (*L. angustifolius*) sėklų miltams, naudojant įvairias PRB padermes (*Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ir *Lactobacillus sakei*). Nustatyta, kad ultragarsinis poveikis sumažino sėklose bendrą mikroorganizmų skaičių 5,5 karto (nuo 460000 KSV/1 g iki 83000 KSV/1 g). Ultragarsinis poveikis atskirai ir kombinacijoje su KF didino maistinių lubinų (*L. angustifolius*) sėklose tirpiųjų baltymų kiekį (atitinkamai, 11,4 % ir 13,1 %), o bendras baltymų kiekis sumažėjo (3,0 % ir 6,9 %). Eksperimento metu pastebėti kai kurie ultragarsinio poveikio lubinų sėkloms ypatumai. Šis apdorojimas daugiau nei dvigubai sumažino proteazių aktyvumą lubinų produktuose ir mažesniu laipsniu – amilazių aktyvumą (nuo 36 % iki 50 %). KF metu visais atvejais buvo stebimas proteazių ir amilazių aktyvumo padidėjimas, atitinkamai 4,8 karto ir 15,2 %.

Siauralapių lubinų (*L. angustifolius*) sėklų baltyminių medžiagų funkcinėms savybėms daugiausiai įtakos turėjo KF: gerino jų emulgavimo savybes ir mažino putų sudarymo pajėgumą.

Ultragarsas analogiškai keitė ir baltymų (po fermentacijos) funkcines savybes, tačiau mažesniu laipsniu nei KF. Lubinų sėklų baltyminių medžiagų maistinei vertei taip pat didžiausios įtakos turėjo KF, kuri baltymų *in vitro* virškinamumą padidino vidutiniškai 6,4 %, o proteazių inhibitorių aktyvumą sumažino daugiau nei 2 kartus. Tuo tarpu ultragarsas neturėjo įtakos šiems kriterijams.

Taigi, atlikti tyrimai rodo ultragarso taikymo perspektyvumą fermentacijos terpės mikrobiologinės taršos mažinimui ir baltymų funkcinių savybių gerinimui. Be to, ultragarsas gali būti sėkmingai taikomas fermentų inaktyvavimui, pakeičiant bioprocesuose plačiai taikomus fermentų inhibitorius.

Gineika, Rytis. Ultrasound impact effect on the narrow lupine seeds protein substances, functional properties and nutritional value by using LAB solid state fermentation conditions: Master's thesis in Food Science and Safety / supervisor prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Technological Sciences, Food Technology

Key words: *Ultrasound, lupine seeds, solid state fermentation, lactic acid bacteria, protein substances, functional properties*

Kaunas, 2016. 70 p.

SUMMARY

Nowadays special attention is paid to the production of plant proteins that have distinctive functional characteristics in order to use it in the food industry. Fermentation processes are widely used in the production of soy products. The aforementioned bioprocess is used in processing lupine seeds, which improves products nutritional value (better digestion and decreased activity of inhibitory substances of proteases). Until now the influence of solid state fermentation on functional properties of lupine protein matter has not been evaluated. Furthermore, the application of ultrasound in the food industry now this technology recently became available increased and could be tested in fermentation processes.

The research aim is therefore: to evaluate the effect of ultrasound on dietary lupine (*Lupinus angustifolius*) seed proteine substances, their functional properties and nutritional value under LAB solid state fermentation conditions. The influence of ultrasound on lupine seed flour in fermenting conditions was evaluated by using 60 min., 37 kHz ultrasonic waves, under solid state fermentation conditions for 72 h of various strains of LAB (*Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus sakei*). It was determined that ultrasound reduced the total number of microorganisms in the seeds 5,5 times (from 460000 CFU/1g to 83000 CFU/1g). The ultrasound alone and in combination with solid state fermentation increased dietary lupine (*L. angustifolius*) seeds soluble protein content (respectively by, 11.4% and 13.1%), and the total protein content decreased (respectively 3,0 % and 6.9 %). During the experiment some peculiarities of ultrasound effect on lupine seeds was observed. This treatment decreased the activity of protease in the lupine products by more than two times and amylase activity to a minor degree (from 36 % to 50 %). In all cases of solid state fermentation increased activity of proteases and amylases was observed, respectively 4.8 times and 15.2 %.

The greatest influence on lupine seed protein substance functional properties was visible by solid state fermentation: it improved emulsifying properties and reduced foaming capacity.

Ultrasound likewise changed the functional properties of protein after fermentation, but in a minor degree than solid state fermentation. The greatest effect on lupine seed protein substance nutritional value was made by solid state fermentation, which increased in vitro digestibility on average by 6,4 %, and decreased the protease inhibitor activity by more than 2 times. Meanwhile, ultrasound had no impact on these criteria.

In conclusion, the research shows the feasibility of using ultrasound for reducing microbiological pollution in the fermentation environment and improved protein functional properties. In addition, ultrasound can be successfully used for inactivation of enzymes, replacing widely in bioprocesses used enzyme inhibitors.

Santrumpos

AV – amilazinio aktyvumo vienetai;

BM – baltyminės medžiagos;

BMS – bendras mikroorganizmų skaičius;

KF – kietafazė fermentacija;

KF+ULT – ultragarsinis poveikis taikytas po lubinų produktų kietafazės fermentacijos;

KSV – kolonijas sudarantys vienetai;

KV – ksilanazinio aktyvumo vienetai;

Ls arba LS – *Lactobacillus sakei* KTU 05-6;

MRS – *De Man, Rogosa ir Sharpe* mitybinė terpė;

NDS – natriododecilsulfatas;

Pa arba PA – *Pediococcus acidilactici* KTU 05-7;

Pp9 arba PP9 – *Pediococcus pentosaceus* KTU 05-9;

PRB – pieno rūgšties bakterijos;

PV – proteazinio aktyvumo vienetai;

s.m. – sausosios medžiagos;

TEMED – Tetrametiledilendiaminas;

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometanas;

ULT – ultragarsinis poveikis;

ULT+KF – ultragarsinis poveikis taikytas prieš lubinų produktų kietafazę fermentaciją.

Įvadas

Pastaruoju metu maisto ir pašarų gamybos pramonėje intensyviai ieškoma komponentų ir produktų, kurie papildytų žmonių ir gyvulių mitybą naudingomis maistinėmis medžiagomis. Maistiniai lubinai – vertingas ankštinis augalas, kurio panaudojamos visos augalo dalys: sėklos – pašarų ir maisto pramonėje, o augalo žalioji masė – kaip organinė trąša. Ateityje maistiniai lubinai galėtų pakeisti gausiai vartojamą soją, kadangi lubinų sėklų maistinė vertė ir baltymų kiekis yra panašus kaip sojos.

Lubinų baltyminės medžiagos (BM) galėtų būti naudojamos funkcinio maisto gamyboje, papildų ir baltyminių produktų gamyboje, taip pat galėtų pakeisti sojos baltymus mėsos pramonėje kaip emulguojantis agentas, o lubinų baltyminių medžiagų savybė sudaryti putas leistų pakeisti kiaušinio baltymus konditerijos pramonėje.

Pritaikius kietafazę fermentaciją (KF) lubinų produktams, gaunamas ženklus mitybinės vertės ir virškinamumo padidėjimas. Daugelio mokslininkų atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad ši fermentacija padidina lubinų virškinamumą ir baltymų tirpumą bei geba slopinti baltymų fermentų (proteazių) inhibitorines medžiagas. Pritaikius KF pieno rūgšties bakterijomis (PRB), technologinis procesas tampa labiau kontroliuojamas, gaunamas saugesnis fermentuotas produktas [1].

Fermentuotus lubinų produktus būtų naudinga dėti ir į kepinius duonos pramonėje, pakeičiant technologiniame procese tradicinius ruginius / kvietinius raugus, taip padidinant kepinų maistinę vertę ir suteikiant kepinio minkštimui patrauklesnį geltoną atspalvį [2]. Be to, lubinų PRB fermentuotas priedas, leistų pailginti kepinų tinkamumo vartoti terminą, kadangi naudotos PRB pasižymi antimikrobiniu poveikiu.

Fermentacijos metu žaliavoje vyksta įvairūs metabolizmo procesai: stambūs molekuliniai junginiai skyla į mažesnius, veikiant mikroorganizmams, PRB ir fermentams. Norint optimizuoti ir gauti norimos kokybės fermentuotą produktą, tikslinga būtų išbandyti ultragarsinį poveikį. Ultragaras naudojamas daugelyje sričių (medicinoje, technikos pramonėje ir kt.), taip pat ir maisto pramonėje. Ultragarso sukeltos aukšto dažnio garso bangos vandenyje sukelia kavitacijos reiškinį, kuris, įrodyta, kad inaktyvuoja ar slopina daugelio fermentų ir mikroorganizmų veiklą, taip pat padidina tirpiųjų baltymų kiekį tiriamajame produkte. Todėl ultragarsinio poveikio panaudojimas lubinų produktams KF sąlygose leistų gerinti fermentacijos proceso savybes, neprarandant maistinės vertės ir, matomai, pagerinant šių produktų technologines savybes.

Darbo tikslas. Įvertinti ultragarsinio poveikio įtaką siauralapių maistinių lubinų sėklų baltyminėms medžiagoms, jų funkcinėms savybėms ir maistinei vertei PRB kietafazės fermentacijos sąlygose.

Tiksliui pasiekti darbe buvo sprendžiami šie uždaviniai:

1. Parinkti optimaliausią ultragarsinio poveikio trukmę siauralapių lubinų (*Lupinus angustifolius*) sėklų apdorojimui, kuri leistų pasiekti didžiausią antimikrobinį poveikį.
2. Įvertinti atskirai ir kombinacijoje su kietafaze fermentacija, ultragarsinio poveikio įtaką maistinių siauralapių lubinų (*L. angustifolius*) sėklų bendram baltymų kiekiui ir tirpiųjų baltymų frakcijai.
3. Nustatyti ultragarsinio poveikio ir kietafazės fermentacijos įtaką maistinių lubinų sėklų fermentiniams (proteazių, amilazių, ksilanazių) aktyvumams.
4. Įvertinti ultragarsinio poveikio ir kietafazės fermentacijos įtaką lubinų sėklų baltyminių medžiagų funkcinėms savybėms (emulgavimo ir putų sudarymo).
5. Nustatyti lubinų sėklų baltyminių medžiagų mitybinės vertės pokyčius, paveikus jas ultragarsu ir kietafaze fermentacija.
6. Ištirti ultragarsinio poveikio panaudojimo galimybes fermentuotų lubinų produktų gamyboje.

1. Literatūros apžvalga

1.1 Maistinių lubinų chemijos savitumas

Lubiniai – tai ankštiniai javai, priklausantys *Fabaceae* (*Leguminosae*) augalų šeimai. Labiausiai paplitusios šios rūšys: baltieji, geltonieji ir siauralapiai lubinai [3].

Iš apie 1000 lubinų rūšių Lietuvoje daugiausia auginami geltonžiedžiai (*Lupinus luteus L.*) ir siauralapiai (*Lupinus angustifolius L.*). Nekultyvuoti (laukiniai) Lietuvoje auga ir daugiamečiai gausialapiai lubinai (*Lupinus poliphyllus L.*) [4]. Lubinai auginami kaip pašaras gyvuliams, kaip organinė trąša (panaudojant šio augalo žaliąją masę) ir kaip maistas žmonėms [5]. Didžiausia lubinų augintoja yra Australija, kuri užaugina 80 – 85 % maistinių lubinų sėklų pasaulyje [6].

Lubinų sėklos labiausiai žinomos dėl didelio baltymų kiekio (nuo 24 % iki 61 % s.m.), kuriam įtakos turi genotipas, dirvožemio ir auginimo sąlygos [7]. Šie baltymai turi daug antioksidaciniu pajėgumu pasižyminčių medžiagų: karotenoidų, tokoferolių ir lecitino [8]. Baltymuose aminorūgščių santykis artimas idealiam baltymui, tačiau randama mažiau sieros turinčių aminorūgščių (metionino ir cisteino) [9].

Sėklose randama nemažai aliejaus (tame tarpe ir polinesočiųjų riebalų rūgščių), kuris siekia nuo 6 iki 13 % s.m. [10]. Dominuojančios yra oleino ir linolo nesočiosios riebalų rūgštys, kurios sudaro, atitinkamai, 33,2 % ir 38,4 % visų riebalų rūgščių [11].

Lubinų sėklos yra geras mikro ir makroelementų šaltinis, jose gausu mineralinių medžiagų: azoto, natrio, fosforo, kalio, kalcio, magnio ir sieros. Natrio kiekis siauralapių lubinų (*L. angustifolius*) sėklose svyruoja nuo 1,01 iki 1,19 mg/g, magnio – nuo 2,00 iki 2,48 mg/g, kalio – nuo 12,63 iki 13,61 mg/g, o kalcio – nuo 1,46 iki 2,53 mg/g s.m. Lubinuose taip pat randami šie mikroelementai: geležis, varis, manganas, cinkas, boras, nikelis ir chloras. Geležies koncentracija siauralapių lubinų (*L. angustifolius*) sėklose svyruoja nuo 53,06 iki 64,27 µg/g, mangano – nuo 28,13 iki 122,82 µg/g, cinko – nuo 35,15 iki 53,66 µg/g, o vario – nuo 5,10 iki 6,44 µg/g s.m. Bendras pelenų kiekis kinta nuo 2,9 iki 4,3 % s.m. [11, 12].

Lubinų sėklos savo sudėtyje turi organinės kilmės heterociklinių ir nuodingų medžiagų – alkaloidų (dažniausiai aptinkami iš jų lupaninas ir sparteinas) [13]. Lubinuose alkaloidų kiekis gali svyruoti: siauralapiuose – nuo 0,1 iki 2,8 %, baltuosiuose – nuo 0,001 iki 3,5 % [14]. Tačiau selekcininkams pavyko išvesti naujus lubinų genotipus, kurie pasižymi minimaliomis alkaloidų koncentracijomis (pvz., nuo 0,039 iki 0,064 % ar 0,12 % siauralapiuose lubinuose (*L. angustifolius*)) [11, 15]. Maži alkaloidų kiekiai žmogaus organizmui nekenkia, tačiau lubinų sėklos, turinčios šių medžiagų, yra karčios, todėl žmonių mitybai nepriimtinos ir yra tinkamos tik gyvulių pašarui. Žmonių mitybai tinka lubinų sėklos neturinčios alkaloidų [16].

Lubinų sėklos gali būti B grupės vitaminų šaltinis. Juose randama vitaminų: tiamino (B₁), riboflavino (B₂) ir niacino (B₃), vidutiniškai 3,9 mg/kg; 2,3 mg/kg ir 39,1 mg/kg s.m. [13]. Taip pat sėklose randama vitamino C ir tokoferolių [7].

Siauralapių lubinų (*L. angustifolius*) sėklose angliavandenių kiekis svyruoja nuo 47,4 % iki 50,8 % s.m., iš kurių skaidulinių medžiagų gali būti iki 16,2 %. Sacharidų (mono ir disacharidų) lubinų sėklose yra iki 5,8 % s.m., iš kurių didžiąją dalį sudaro sacharozė (70,7 %), galaktozė (8,4 %) ir gliukozė (6,7 %), taip pat randama ribozė, maltozė, fruktozė ir ksilozė [11, 13]. Taigi, lubinų sėklų angliavandeniai pasižymi aukšta mitybine verte. Krakmolo lubinų sėklose nėra daug ir jis virškinamas lėtai, todėl tinka žmonėms, turintiems viršsvorio problemų [17].

Vertinant maistinių lubinų chemijos savitumus, būtų perspektyvu lubinus ir jų baltymines medžiagas panaudoti maisto ir pašarų pramonėje, baltymų koncentrato gamyboje, ruošiant makaronus, duoną, bulvių traškučius ir mėsos produktus, taip pagerinant šių produktų maistinę vertę ir juslines savybes [9, 11].

1.1.1 Lubinų sėklų fermentų charakteristika

Lubinų sėklose aptikta proteaziniu ir amilaziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų, kurie sąlygoja krakmolo ir baltymų molekulių pokyčius technologinio proceso metu [18]. Šie fermentai daugiausiai naudojami duonos pramonėje [19].

Amilazės – fermentai, skaidantys krakmolą. Amilazių yra dvi formos: α ir β . α -amilazė skaido krakmolą iki dekstrinų, o β -amilazė – iki maltozės. α -amilazės daugiausia yra sudygusiuose grūduose. α -amilazės katalizuoja amilozės ar amilopektino vidinių (endo-) α -1,4-glikozidinių ryšių hidrolizę. Amilazės technologiniame duonos gamybos procese atlieka keletą svarbių funkcijų: aprūpina mieles pakankamu sacharidų kiekiu; padidina dujų susidarymo pajėgumą, tuo pačiu ir duonos apimtį; greitina pusgaminių pakilimą; gerina minkštimo struktūrą; lėtina krakmolo retrogradacijos procesą ir mažina duonos žiedėjimą [19, 20, 21].

Proteazės – fermentai, hidrolizinantys baltymus. Duonai skirtuose miltuose proteazių aktyvumas turi būti kuo mažesnis. Šie fermentai tešloje hidrolizuoja peptidinius baltymų molekulių ryšius, silpnina glitimo karkasą. Dauguma proteazių yra endofermentai, veikiantys baltymo grandinės vidinius ryšius. Pagrindinės proteazių funkcinės savybės: susilpnina tešlos glitimo struktūrą; gerina tešlos išsitempimą ir elastingumą; lėtina duonos žiedėjimą; trumpina tešlos brandinimo procesą; gerina kepinių juslines savybes (plutelės spalvą ir minkštimo skonį) [19, 20, 22].

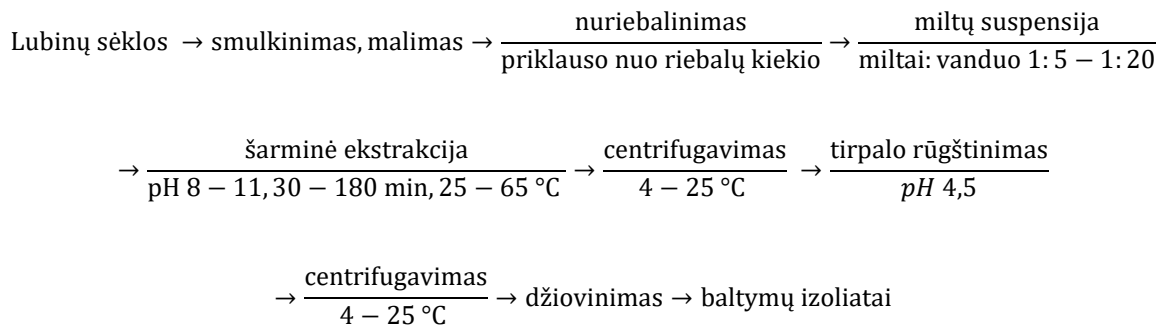
1.2 Lubinų baltyminių medžiagų išskyrimas ir panaudojimas

Ankštinės kultūros ir jų sėklos yra plačiai naudojamos žmonių mityboje. Tai ne tik pigi ir plačiai kultivuojama augalinė žaliava, tačiau ji gali būti svarbus baltymų šaltinis daugelio žmonių mityboje. Gyvulinių baltymų šaltiniuose randama daug sočiųjų riebalų rūgščių, cholesterolio, todėl sveikatos organizacijos rekomenduoja šiuos gyvulinės kilmės baltymus pakeisti augaliniais. Žinoma, kad augaliniai baltymai gali sumažinti cholesterolio kiekį kraujyje, taip pat sumažinti širdies ligų ir diabeto riziką [7].

Dar 1979 metais pasirodė moksliniai pranešimai, teigiantys, kad lubinų baltymų izoliatai ir koncentratai galėtų būti puikus baltymų šaltinis žmogaus mityboje, kuris leistų pakeisti sojos baltymų koncentratą tose šalyse, kur šie koncentratai importuojami. Nustatyta, kad lubinų baltymuose trūksta aminorūgšties metionino, todėl gaminant baltymų koncentratą rekomenduojama papildyti produktus šia aminorūgštimi [23, 24].

Iki XX a. pabaigos lubinų sėklų mityba buvo apribota dėl toksiškų juose esančių junginių – alkaloidų, tačiau ši problema jau išspręsta, kadangi išvesti nauji lubinų genotipai, išsiskiriantys minimaliomis alkaloidų koncentracijomis [11, 15], o gaminant lubinų baltymų izoliatus, alkaloidai, kurie yra tirpūs vandenyje, pašalinami baltymų gryninimo metu [25]. Tačiau lubinų sėklose randami kiti antitumorigeniški komponentai, tokie kaip tripsino inhibitoriai ir hemaglutininai, bet jų kiekiai yra mažesni nei sojų, žirnių ar pupų sėklose ir nėra pavojingi žmogaus organizmui [26, 27].

Lubinų baltyminės medžiagos (BM) gali būti išskirtos ir išgrynintos iš sėklų, pasinaudojant baltymų tirpumo savybėmis, panaudojant filtravimo ir hidrodinaminius metodus [28]. Dažniausiai naudojami du baltymų išskyrimo ir gryninimo metodai. Pirmas – malimo ir arooseparavimo (klasifikacijos) metodas – taikomas krakmolingoms ankštinėms sėkloms (žirniai, pupos), o antras – drėgnasis metodas (šarminis/izoelektrinis baltymų ištirpinimas ir rūgštinis nusodinimas) – yra labiau tinkamas lubinų baltymų medžiagų išskyrimui ir gryninimui. Pastaruoju būdu gaunami baltymų ekstraktai, turintys 90 – 96 % baltymų, o išeiga siekia nuo 60 iki 65 % [29]. Šarminis/izoelektrinis gavybos metodas yra vienas iš dažniausiai naudojamų metodų augalinių baltymų izoliatų gamybai. Šis metodas pagrįstas skirtingomis baltymų tirpumo ir nusodinimo savybėmis, keičiant tirpalo pH. Mažiausias baltymų tirpumas fiksuojamas, priartėjus prie izoelektrinio taško (pH 4,5) ir tuomet baltymai lengviausiai atskiriami. Nusodinant šiuo metodu baltymus (1 pav.), žaliava yra šarmininama iki pH 8-11, kur baltymas yra tirpiausias, tuomet centrifuguojant atskiriamos nebaltyminės medžiagos, o baltyminių medžiagų nusodinimui tirpalas rūgštinamas iki pH 4-5 [30].



1 pav. Lubinų baltymų izoliatų gamyba

Lubinų baltymų izoliatai taip pat gali būti gaminami, naudojant ultrafiltravimo/diafiltravimo procesą. Tai yra membraninis baltymų atskyrimas. Membranos, tangentinio srauto ir slėgio dėka, sulaiko baltymų molekules nuo 1 kDa iki 1000 kDa. Tačiau šarminis/izoelektrinis baltymų gavybos būdas yra labiau efektyvus, šalinant antimitybinius komponentus, kadangi baltymų izoliatuose, lyginant su miltais, stebimas tripsino inhibitoriaus ir hemagliutininų kiekio 66 % sumažėjimas [27, 28].

Lyginant lubinų baltymų aminorūgščių sudėtį su sojos baltymais, nustatyta, kad tiek sojos, tiek ir lubinų sėklų baltymuose trūksta metionino ir cisteino, tačiau lubinų baltymuose šių aminorūgščių kiekis yra šiek tiek didesnis. Metionino ir cisteino trūkumą lubinų izoliatuose galima sumažinti, pridėjus į produktą 5 % kazeino baltymų [31].

Visai neseniai skirtingos lubinų baltymų frakcijos pradėtos naudoti makaronų ir duonos gamyboje, siekiant padidinti šių produktų maistinę vertę [32]. Lubinų BM, dėl gerų putų sudarymo pajėgumų, galėtų būti plačiau panaudojamos konditerijos pramonėje pakeičiant (dalinai ar visiškai) kiaušinio baltymus, nes lubinų baltymų putų mikrostruktūra panaši į nevirto kiaušinio baltymo struktūrą [33, 34]. Lubinų baltymų pasta, pasižymi geromis emulgavimo savybėmis naudojama mėsos pramonėje: dešrų ir mėsos konservų gamyboje [32, 35]. Be to, lubinų BM galėtų būti plačiau pritaikomos baltyminių priedų sportuojantiems (miltelių, tablečių, kapsulių, įvairių gėrimų, batonėlių, traškučių) gamyboje, dalinai pakeičiant iki šiol jų gamyboje plačiai naudojamus kazeino ir išrūgų baltymų koncentratų ir izoliatus, siekiant sumažinti produkto savikainą [36].

1.2.1 Baltyminių medžiagų funkcinės savybės

Kiaušinio baltymai yra plačiai naudojami maisto pramonėje dėl savo puikių funkcinių savybių (tirpumo, emulsavimo, putojimo ir gelio sudarymo). Tačiau kiaušiniuose randamas cholesterolis, sukeliama alergijos, didelė kaina ir neigiamas poveikis aplinkai lėmė padidėjusį susidomėjimą alternatyviais jiems augaliniais baltymų šaltiniais, kurie dalinai arba visiškai pakeistų kiaušinio baltymus [37].

Išskiriamos keturios pagrindinės baltymų funkcinės savybės – tai putų sudarymo pajėgumas (stabilumas), gelio sudarymo pajėgumas, tirpumas ir emulsijos sudarymo pajėgumas (stabilumas). Visos šios baltymų funkcinės savybės yra svarbios, nes turi įtakos technologinėms, fizinėms ir juslinėms maisto produkto savybėms tiek gamybos proceso metu, tiek ir galutinio produkto kokybei [38].

Augalinių baltymų funkcinės savybės nulemia aminorūgščių sudėtis, jų seka ir krūvių pasiskirstymas bei santykis tarp hidrofobiškų ir hidrofilinių dalių. Taip pat funkcinėms savybėms įtakos turi baltymo antrinės, tretinės ir ketvirtinės struktūros ir savybė sąveikauti su kitais maisto sudėtiniais komponentais. Be to, baltymų funkcinėms savybėms didelės įtakos turi išoriniai veiksniai, tokie kaip pH, temperatūra, drėgmė, cheminiai priedai, mechaninis poveikis, fermentai ir joninės jėgos [39, 40].

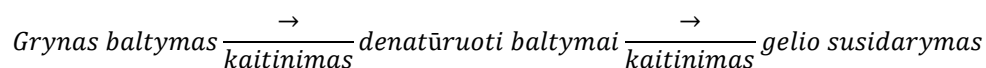
Baltymų tirpumas yra svarbi funkcinė savybė, nes baltymų tirpumas nusako jų gebėjimą sąveikauti su kitais maisto sudėties komponentais. Kitos funkcinės savybės (emulgavimo, putojimo ir želatinavimo) tiesiogiai priklauso nuo baltymų tirpumo. Tirpumas apibūdinamas pusiausvyra tarp hidrofilinės ir hidrofobinės sąveikos, kuri priklauso nuo pH; kai pH priartėja prie baltymo izoelektrinio taško baltymo tirpumas yra mažiausias. Apart pH, baltymų tirpumui turi įtakos temperatūra, joninės jėgos ir aplinkos veiksniai (šildymas, šaldymas, mechaninis apdorėjimas) [41, 42]. Mažai tirpūs ar netirpūs baltymai nėra pageidaujami maisto gamyboje, kadangi jie blogiau pasisavinami žmogaus organizmo ir apsunkina technologinį procesą [43].

Kita svarbi baltymų savybė – emulsijų sudarymas maisto sistemose. Emulsijos susideda iš dviejų nesimaišančių skysčių, kur vienas iš skysčių yra disperguotas mažų lašelių pavidale kitame skystyje [44]. Norint gauti stabilią emulsiją, svarbu panaudoti emulsiklius. Emulsikliai yra paviršiaus aktyviosios medžiagos ir jų molekulės yra imfifilinės (t.y. jos turi ir hidrofobinių ir hidrofilinių savybių), kurios leidžia dviem nesimaišančioms medžiagoms lengviau homogenizuotis. Kadangi augaliniai baltymai geriau tirpsta vandenyje nei riebaluose, baltymai palengvina aliejaus lašelių dispergavimą vandens fazėje, taip skatindami susidaryti riebalų dalelių emulsiją vandenyje [37].

Pastaruoju metu vis didesnis dėmesys skiriamas naujų, putas sudarančių medžiagų vystymui. Baltyminės putos susideda iš dujų fazės, skystos fazės ir paviršiaus aktyvios medžiagos, kurios šiuo atveju ir yra baltymai. Tipiški putas sudarantys maisto produktai yra plakta grietinėlė, morengai, ledai ir kt. Skirtingi baltymai turi skirtingus gebėjimus sudaryti ir stabilizuoti putas, kurios daugiausiai priklauso nuo baltymų fizinių ir adsorbcinių savybių. Baltymai, turintys didelį tirpumą skystoje fazėje, taip pat, gebantys greitai formuoti plėveles ant oro burbuliukų, pasižymi geresniu putų sudarymo pajėgumu. Išorės veiksniai, kurie turi įtakos putų sudarymui, yra pH, temperatūra ir joninės jėgos. Norint, kad baltymai suformuotų stabilias

putas, plakimo metu oro burbulų paviršiuje susidaranti plėvelė turi būti tvirta ir nepralaidi orui. Be to, baltymai turėtų formuoti stiprius vandenilinius ryšius, kurie skatintų hidrofobinių sąveikų atsiradimą nedenaūruotų putų paviršiuje, taip pat gebėtų išlaikyti savo klampumą ir kietumą [45, 46].

Baltymų savybė sudaryti gelius turi svarbią reikšmę maisto produktams. Baltymų savybė sudaryti gelius, viena iš svarbiausių funkcinių savybių, kuri leidžia pakeisti fizinę maisto struktūrą [47, 48]. Pakaitinus rutulinės formos baltymus (pvz., kiaušinio, sojos) susidaro geliai [49]. Norint suformuoti gelį, svarbu, kad funkcinės grupės (hidrofobinės) baltymo viduje būtų pažeidžiamos. Kuomet pažeidžiamos hidrofobinės grupės, jos lengviau suformuoja gelį, sudarantį trimatį tinklą. Gelio susidarymas yra sudėtingas procesas, priklausantis nuo baltymų ir vandens santykio, joninės jėgos dydžio, temperatūros, kaitinimo trukmės, pH ir kt. maiste esančių komponentų [43]. Gelio susidarymo procesą galima pavaizduoti taip:



Denataūravus baltymams hidrofobinės aminorūgščių liekanos yra pažeidžiamos disulfidinių ryšių vietose. Po denataūravimo, toliau šildant augalinius baltymus, baltymai jungiasi tarpusavyje ir sudaro gelius, priklausomai nuo jų molekulinės masės, šildymo ir baltymų koncentracijos [43, 50].

1.3 Fermentaciniai procesai lubinų perdirbimo metu

Fermentacija – tai ne tik anaerobinis metabolizmo procesas. Jo metu, veikiant įvairiems mikroorganizmams ir jų fermentams, vyksta įvairūs metabolizmo procesai. Mikroorganizmų sąlygojamas metabolizmo procesas ir jų fermentiniai aktyvumai turi reikšmingą įtaką fermentuojamų produktų sudėčiai, nes fermentacijos metu didelės molekulinės masės junginiai (polisacharidai, proteinai, lipidai) gali būti suskaidomi į mažesnės molekulinės masės junginius (dekstrinus, cukrus, peptidus, aminorūgštis, laisvasias riebalų rūgštis). Fermentacijos metu susidaro ir kiti metabolizmo produktai, tokie kaip rūgštys, alkoholiai, esteriai, aldehydai, ketonai, vitaminai ir kt. [51].

Dažniausiai, dėl produkto saugos, technologinio ir ekonominio efektyvumo, fermentacijos procesuose naudojamos PRB, kurios ne tik leidžia lengviau kontroliuoti fermentacijos procesą, bet ir pasižymi antimikrobinu aktyvumu [1, 52]. Tyrimuose įrodyta, kad PRB fermentacija (24 h) padidina lubinų maistinę vertę: tirpiųjų baltymų kiekis padidėja 18,9 %, virškinamumas padidėja 17,1 %, o proteazių inhibitorinį aktyvumas sumažėja 18,9 % [53]. Plačiau apie PRB savitumus ir fermentacijos įtaką lubinų sėklų cheminiai sudėčiai aptariama 1.3.1 ir 1.3.2 skyriuose.

1.3.1 Pieno rūgšties bakterijos ir jų charakteristika

Pieno rūgšties bakterijos (PRB) tai gramteigiamos, sporų nesudarančios lazdelės ar kokai, kurios toleruoja rūgščią aplinką ir kurių pagrindinis metabolizmo produktas yra pieno rūgštis. Pagrindinės PRB gentys yra šios: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Weisella*, *Tetragenococcus* ir *Carnobacterium* [54]. PRB priklauso mezofiliniams mikroorganizmams, tačiau kai kurios bakterijos gali daugintis esant žemesnei nei 5 °C ar aukštesnei nei 45°C temperatūrai. Optimalios šių PRB dauginimosi ir augimo pH vertės svyruoja nuo 4,0 iki 4,5, tačiau yra padermių, kurios geba daugintis esant pH vertėms mažesnėms nei 3,2 ar aukštesnėms nei pH 9,6 [55, 56]. PRB fermentuotuose produktuose yra dominuojantys mikroorganizmai, kurių sintetinami metabolitai gali užtikrinti fermentuotų produktų stabilumą, sumažinti mikrobinį teršalų užterštumą, slopinti patogeninių mikroorganizmų bei pelėsinų grybų augimą [57].

PRB maisto pramonėje naudojamos jau labai seniai. Jos suteikia produktams pageidaujamą skonį, tekstūrą, aromatą. Duonos pramonėje jos aptinkamos savaiminiuose rauguose, nes jų randama žaliavose – miltų mikrofloroje. Dažniausiai tai *Lactobacillales* klasės heterofermentinės ir homofermentinės padermės [58, 59]. Pieno pramonėje naudojamos mezofilinės ir termofilinės PRB, tokios kaip *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrückii*, *Streptococcus thermophilus*, *L. mesenteroides* ir kt. Mėsos pramonėje PRB naudojamos, kaip pradinės kultūros (*L. plantarum*, *L. sakei*, *Micrococcus varians*, *Staphylococcus carnosus*, *Pediococcus* padermės) [55, 56]. Konservavimo pramonėje PRB naudojamos agurkų, kopūstų ir kt. daržovių fermentacijai. Agurkų rauginimo pradžioje dauginasi *Leuconostoc mesenteroides*, vėliau – *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*. Raugintų kopūstų gamyboje vyrauja *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *L. brevis*. [55].

Yra žinoma, kad PRB maisto produktuose veikia, kaip natūralus konservantas. Šis efektas siejamas su organinių (pieno, acto, skruzdžių, propiono) rūgščių gamyba [60]. Kiti PRB gaminami antimikrobiniai junginiai yra anglies dioksidas, vandenilio peroksidas, diacetilas, acetaldehidas [61, 62]. Be organinių rūgščių ir paminėtų antimikrobinų junginių, fermentacijos metu PRB ribosomose sintetina dar ir baltymines medžiagas – bakteriocinai, kurie slopina nepageidaujamų mikroorganizmų dauginimąsi [63]. Bakteriocinai sintetinami PRB ląstelės viduje ir išskiriami į išorę, kur veikia bakteriocidiškai prieš artimas šeimininkui (PRB) bakterijų rūšis ar patogenus. Jie skirstomi į dvi grupes – gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų gaminamus bakteriocinus [64]. Pagal bakteriocinų biochemines savybes jie skirstomi į tris klases: lantibiotikus, mažus hidrofobiškus termostabilius peptidus ir didelius termolabilius baltymus [65]. Bakteriocinų antimikrobinis veikimas paaiškinamas tuo, kad tiesiogiai veikiant

mikroorganizmus, bakteriocinai slopina jų fermentinį aktyvumą, inaktyvuoja anijoninius nešiklius membranose ir slopina sporų dygimą [66, 67].

Pediococcus acidilactici, gaminanti bakteriociną Pediocin AcM, fermentuotuose mėsos gaminiuose slopina tokių bakterijų kaip *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium Perfringens*, *Bacillus coagulans*, *Aeromonas hydrophila* ir *Bacillus cereus* augimą [68]. Kita PRB *Lactobacillus sakei*, gaminanti bakteriocinus Lactocin S ir Sakacin P, mėsoje slopina *Listeria monocytogenes* ir *Staphylococcus aureus* augimą [69].

Taigi, PRB panaudojimo spektras yra platus. Visų pirma, jos dalyvauja maisto produktų technologiniame procese ir formuoja jų skonį, kvapą bei konsistenciją, kita vertus jų metabolitai yra natūralus konservantas maiste, stabdantis daugelio mikroorganizmų ir mikromicetų veiklą [55, 57, 70].

1.3.2 Lubinų cheminiai pokyčiai fermentacijos metu

Lubinų sėklos yra baltymų, riebalų, mineralinių medžiagų ir maistinių skaidulų šaltinis [71]. Lubinų sėklos Europoje vis dažniau naudojamos maistui, kaip baltymų pakaitalas genetiškai modifikuotiems sojų produktams [72]. Tačiau lubinų sėklų virškinamumą riboja proteazių inhibitorinės medžiagos, taip pat kitos antimonybinės medžiagos, tokios kaip skaidulinės medžiagos ir oligosacharidai. Kita vertus, siauralapių lubinų (*L. angustifolius*) sėklose inhibitorinių medžiagų kiekis (0,1 mg/g) nustatytas daug mažesnis nei sojų pupelėse (26.2 mg/g), o šių medžiagų sumažinimui, tuo pačiu ir maistinės vertės pagerinimui turi įtakos fermentacija [73, 74].

Fermentacijos procesas naudojamas jau seniai, siekiant padidinti produkto galiojimo laiką, pagerinti produkto maistinę vertę ir juslines savybes [75, 76]. PRB fermentacijoje plačiai naudojamos (25 % Europos ir 60 % pasaulio dietos sudaro fermentuoti maisto produktai) [77, 78]. Fermentacijos metu galima padidinti bioaktyvių fenolinių junginių kiekį ankštinėse kultūrose, tame tarpe ir lubinuose, tokiu būdu padidinant jų antioksidacinį aktyvumą [79, 80]. Nustatyta, kad fermentacija sąlygoja fenolinių ir silpną specifinį skonį formuojančių junginių, tokių kaip n-heksanolis, 2-methyl-1-butanolis, izobutilo, augalinėje žaliavoje susidarymą. Be to, fermentacija padidina augalinės žaliavos antioksidacines savybes, nes fermentuotuose augaluose užfiksuotas didesnis bendras radikalų jungimosi aktyvumo koeficientas [81].

PRB fermentuotas maistas paprastai laikomas netoksiškas ir nepatogeniškas, tačiau PRB geba dekarboksilinti aminorūgštis ir skatinti biogeninių aminų susidarymą. Biogeniniai aminai (BA) yra organiniai azotiniai junginiai, susidarantys dekarboksilinant aminorūgštis [82, 83]. Taip pat, fermentacijos metu, PRB natūraliai gamina D-pieno rūgšties ir L-pieno rūgšties izomerus. L-pieno rūgšties izomeras yra natūralus ir žmogaus organizmo įsisavinamas izomeras, tačiau D-pieno rūgšties izomeras yra toksiškas, ypač sergantiems ir senyvo amžiaus žmonėms [84, 85].

Nustatyta, kad lubinų sėklose BA vidutiniškai yra 392,4 mg/kg (histamino 6,2 mg/kg). Fermentuojant lubinų produktus savaimine 4 parų fermentacija BA kiekis kinta nuo 293,5 mg/kg iki 493,7 mg/kg (histamino nuo 20,8 mg/kg iki 52,7 mg/kg), tačiau fermentuojant lubinų produktus 4 parų fermentacija su žinomomis PRB, BA skaičius gali kryptingai padidėti iki 2455,5 mg/kg, o histamino nuo 67,5 mg/kg iki 96,7 mg/kg. Tačiau šie produktai išlieka saugūs vartoti, nes toksinės histamino koncentracijos neviršija (400–500 mg/kg) [86]. Todėl svarbu parinkti tinkamas PRB padermes, kurios pasižymėtų mažiausiu proteolitinio aktyvumu.

PRB fermentacijos metu (24 h) lubinų produktuose titruojamasis rūgštingumas padidėja nuo 20,05 iki 23,71 TTA, o pieno rūgštis susidaro nuo 160.4 mg/kg iki 180.2 mg/kg, iš kurių D-pieno rūgštis izomero nuo 38,2 mg/kg iki 52,7 mg/kg [87]. Nustatyta, kad PRB fermentacija (24 h) lubinų sėklose padidina tirpiųjų baltymų kiekį 18,9 % ir virškinamumą – 17,1 %, o proteazių inhibitorinis aktyvumas sumažėja 18,9 % [53]. Tuo tarpu mineralinių medžiagų pokytis, vykstant siauralapių lubinų (*L. angustifolius*) fermentacijai (20-24 h), nustatytas minimalus: Fe kiekis lubinų sėklose padidėja nuo 4,80 mg/100 g iki 5,08 mg/100 g s.m., Cu kiekis padidėja nuo 0,47 mg/100 g iki 0,67 mg/100 g s.m., o Zn kiekis sumažėja nuo 4,84 mg/100 g iki 4.08 mg/100 g s.m. [88].

1.4 Ultragarso panaudojimo galimybės maisto pramonėje ir fermentacijos procesuose

Ultragarso technologijos pritaikymas maisto pramonėje šiuo metu sulaukia ypatingo mokslininkų dėmesio [89]. Ultragarso bangos – tai mechaninės bangos, kurių dažnis (> 16 kHz) yra aukštesnis nei žmogaus klausos slenkstis. Ultragarsinės bangos skirstomos į aukšto (100 kHz – 1MHz) ir žemo (16 kHz – 100 kHz) dažnio bangas. Mažo intensyvumo aukšto dažnio ultragarso bangos dažniausiai pritaikomos analitiniams maisto fizikinių ir cheminių savybių nustatymams, tokiems kaip standumo, brendos laipsnio, cukraus kiekio, rūgštingumo ir t.t. Tuo tarpu didelio intensyvumo žemo dažnio ultragarso bangas galima pritaikyti norint pakeisti maisto fizikines ir chemines savybes. Šis efektas skystuose kūnuose pasireiškia dėl ultragarsinių bangų savybės sukelti kavitacijos reiškinį [90]. Ultragarso metu formuojasi kavitacijos burbuliukai, kurie padidėjus temperatūrai ir slėgiui sparčiai yra, irimo vietose sukeliama aukštos šlyties energijos bangos ir susidaro turbulenciniai srautai (mikrotekėjimai). Šie paminėti veiksniai (temperatūra, slėgis ir turbulencija) yra pagrindiniai veiksniai, paaiškinantys ultragarsinį poveikį maisto sistemose. Be to, ultragarsas gali paskatinti labai reaktivių laisvųjų radikalų susiformavimą, dalyvaujant vandens molekulėms ($H_2O \rightarrow H + OH$). Šie laisvieji radikalai aktyviai reaguoja su kitomis molekulėmis [90, 91].

Ultragarsinis poveikis jau daugelį metų naudojamas norint pakeisti emulsijų savybes, suardant ląsteles ar skaidant susijungusias medžiagas, tačiau visai neseniai tyrimo kryptis išsiplėtė ir pastebėta, kad ultragarsas gali būti naudingas norint kontroliuoti ir modifikuoti kristalicizacijos procesą, degazuoti skystus maisto produktus, inaktyvuoti fermentus, sustiprinti džiovavimo ir filtracijos procesus ir turėti įtakos oksidacinėms reakcijoms [92, 93, 94].

Įrodyta, kad ultragarsas galėtų būti pritaikomas: ledų gamyboje, siekiant kontroliuoti ledo kristalų formavimąsi [94]; biologiškai aktyviųjų junginių ekstrakcijai iš augalo sėklų, padidinant tirpiklio skverbimąsi į ląstelių membranas; pagreitinant jogurto gamybą ir pagerinant jo konsistensiją; padidinant sėklų daigumą [95]. Be to, nustatytos kitos ultragarso panaudojimo galimybės: cukraus iš ląstelių difuzijos intensyvinimui [96]; kristalų susidarymo ir augimo meduje didinimui [95, 97]; nuotekų valymo proceso intensyvinimui [95]; džiovavimo procesuose, padidinant šilumos perdavimo koeficientą [98]; fermentų ir mikroorganizmų inaktyvavimui [95].

Fermentacijoje ultragaras galėtų būti naudingas siekiant valdyti fermentų ir mikroorganizmų aktyvumą. Įrodyta, kad ultragarso poveikis (60 min, 24 kHz) geba visiškai inaktyvuoti gramneigiamas kaliformines bakterijas, o gramteigiamų (pvz., *Clostridium perfringens*, *streptococci*) bakterijų aktyvumas sumažėja daugiau nei 66 % [99]. Be to, nustatyta, kad vaisių fermentai peroksidazės, lipoksigenazės ir pieno fermentai laktoperoksidazės yra inaktyvuojami, paveikus ultragarsiniu poveikiu [100].

Taigi, ultragarso panaudojimas maisto pramonėje yra perspektyvus. Ultragarsinis apdorojimas gali prisidėti, kuriant ir tobulinant naujus maisto produktų apdorojimo būdus, taip pagerinant produkto saugą bei kokybę. Atsiranda vis daugiau technologinių procesų, kuriuose ultragarsas jau plačiai naudojamas: putų susidarymo, filtravimo, džiovavimo procesuose, funkcionalių junginių iš daržovių gavyboje ir kt. [101]. Ultragarso savybė inaktyvuoti įvairius mikroorganizmus ir fermentus galėtų būti naudinga fermentacijos procesuose [99, 100]. Tačiau ultragarso panaudojimas maisto pramonėje iki šiol dar yra ankstyvoje stadijoje ir reikalingi tyrimai, norint išsiaiškinti ultragarsinio poveikio įtaką maisto produktų savybėms, siekiant plėtoti šią technologiją pramoniniu mastu [101].

2. Tyrimo objektai ir metodai

2.1 Tyrimų kryptys

Tiriamasis projektas, skirtas įvertinti ultragarsinio poveikio įtaką siauralapių maistinių lubinų sėklų baltyminėms medžiagoms, funkcinėms savybėms ir maistinei vertei PRB kietafazės fermentacijos (KF) sąlygose, vykdytas dviem etapais (2.1 pav.).

Pirmojo etapo metu (I) tirti siauralapių lubinų (*Lupinus angustifolius*) sėklų pokyčiai, paveikus jas vien tik KF.

Šio etapo metu įvertinta:

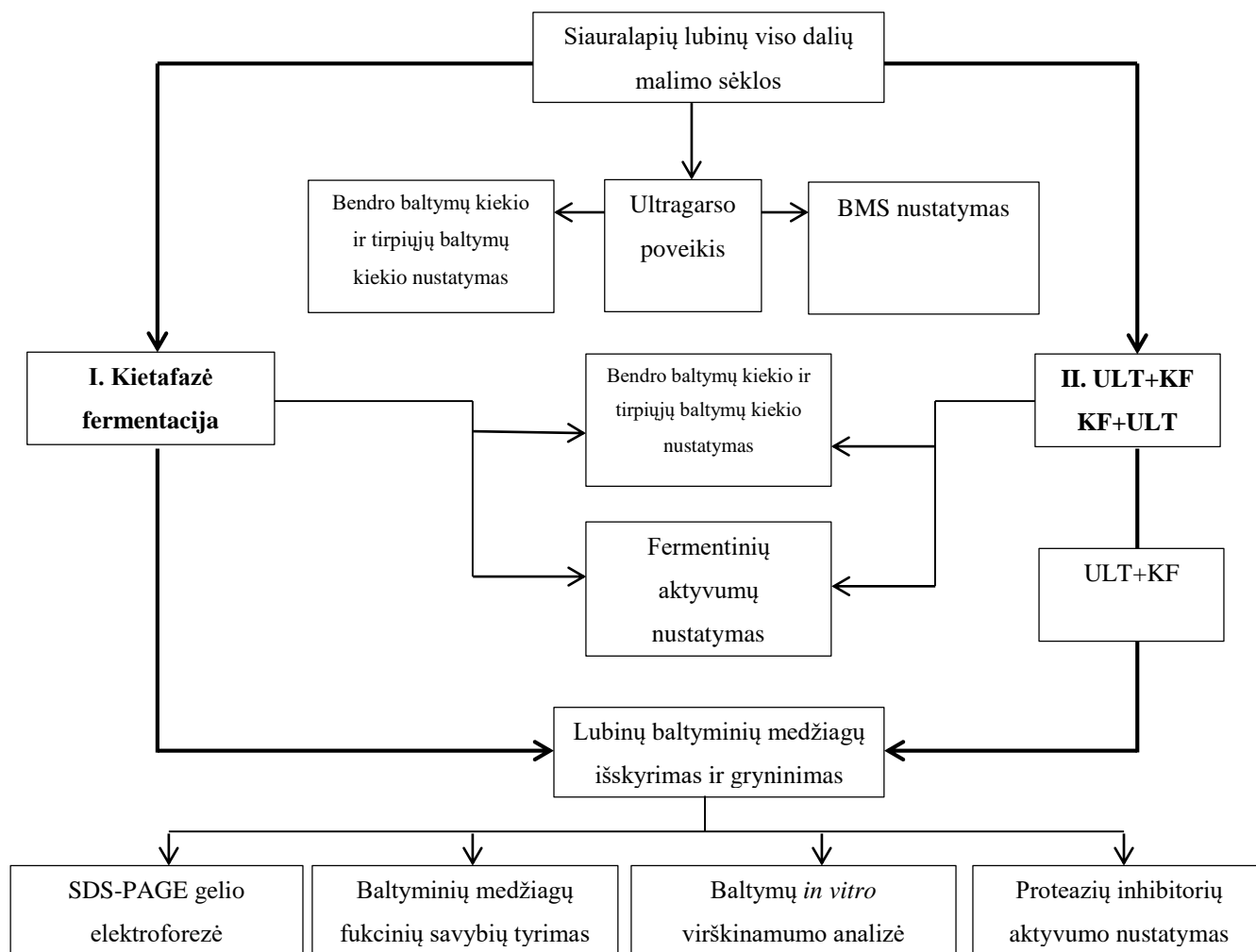
- Bendras ir tirpiųjų baltymų kiekio, fermentinių (proteazių, amilazių, ksilanazių) aktyvumų pokyčiai kietafazės fermentacijos metu;
- Lubinų baltyminių medžiagų funkcinės savybės (emulgavimo ir putojimo), šių medžiagų proteomika kDa SDS-PAGE gelio elektroforezės metodu, *in vitro* virškinamumo ir proteazių inhibitorių aktyvumo pokyčiai KF metu.

Antrojo tyrimo etapo metu (II) tirti siauralapų lubinų (*Lupinus angustifolius*) sėklų pokyčiai paveikus jas ultragarsu KF sąlygose (KF vykdyta prieš arba po ultragarsinio poveikio).

Šio etapo metu įvertinta:

- Skirtingos ultragarsinio poveikio trukmės įtaka lubinų sėklų bendram baltymų kiekiui ir tirpiųjų baltymų frakcijos kiekiui, taip pat BMS;
- Ultragarsinio poveikio įtaka KF sąlygose lubinų sėklų bendram ir tirpiųjų baltymų kiekiui bei fermentiniams (proteazių, amilazių, ksilanazių) aktyvumams, panaudojant ultragarsinį poveikį prieš ir po fermentacijos;
- Lubinų baltyminių medžiagų funkcinės savybės (emulgavimo ir putojimo), šių medžiagų proteomika kDa SDS-PAGE gelio elektroforezės metodu, *in vitro* virškinamumo ir proteazių inhibitorių aktyvumo pokyčiai, paveikus baltymines medžiagas prieš KF ultragarsu.

Literatūroje nėra pateiktos informacijos apie ultragarsinio poveikio įtaką lubinų sėklų (ar kitos augalinės žaliavos) baltyminėms medžiagoms, funkcinėms savybėms ar maistinei vertei KF sąlygose, todėl sprendžiant pagal iškeltus darbo uždavinius, šis tiriamasis darbas yra inovatyvus,.



2.1. pav. Pagrindinės tyrimų kryptys.

Visi tyrimai vykdyti 2014 – 2015 metais, KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje ir KTU Cheminės technologijos fakulteto „Bendrosios mikrobiologijos laboratorijoje“.

2.2 Tyrimo objektai

2.2.1 Maistiniai siauralapiai lubinai

Tirtos 1682 genotipo maistinių siauralapių lubinų (*lupinus angustifolius*) sėklos, veislė – VB „Vilniai“, 2014 metų derlius. Siauralapių pašarinių lubinų veislė sukurta Lietuvos žemdirbystės instituto Vokės filiale. Veislės selekcininkai: dr. Z. Maknickienė, dr. A. Subačius, prof. akad. J. Lazauskas, dr. A. Ražukas.

Šios veislės sėklos yra vidutinio stambumo, 1000 jų vidutinė masė – 150,62 g. Sėklose nustatytas vidutinis baltymų kiekis 31,6 %, o augalo žaliosios masės s.m. – 20,0 %. Šių lubinų sėklų (2005 m. derliaus) s.m. nustatyta 0,035 % alkaloidų. ‘VB Vilniai’ priskiriami mažai alkaloidų turinčių lubinų veislių grupei.

Šios veislės lubinai gali būti auginami pašarui ir žaliajai trąšai. Šių augalų vidutinis aukštis 79 cm. 'VB Vilniai' veislės lubinai atsparūs išgulimui ir sėklų išbyrėjimui iš ankščių, kas vidutiniškai įvertinta po 8 balus. Veislė ankstyva. Žaliai masei derlius nuimamas praėjus vidutiniškai 64 dienoms, o sėklai – 101 dienai (skaičiuojant nuo pilno sėklų sudygimo). Veislė palyginti atspari lubinų ligoms, jų tarpe ir lubinų antraknozei [102].

Tyrimams lubinų sėklos susmulkintos Miag Braunschweig (Vokietija) valciniu malūnu iki 0,2 – 0,7 mm dydžio dalelių.

2.2.2 Kietafazė fermentacija

Kietafazė fermentacija pastaruoju metu sulaukė ypatingo dėmesio, nes yra ekonomiškesnė (fermentacijai naudojama paprastesnė ir mažesnio tūrio įranga) ir saugesnė (esant mažam substrato vandens aktyvumui fermentacijos metu sumažėja mikrobiologinė tarša). Kietafazė fermentacija iki šiol daugiausia naudota įvairių atliekų perdirbimui, tačiau maisto gamyboje plačiai nenaudota [103]. Kietafazė fermentacija yra tokia, kuomet drėgmė fermentuojame produkte yra ne didesnė nei 50 %.

Fermentacijai mėginiai buvo ruošti iš 56,5 % masės maistinių lubinų (*Lupinus angustifolius*) viso dalių malimo sėklų (drėgmė 11,5 %), 40,68 % masės vandens ir pridėjus 2,82 % masės *P. pentosaceus* 9 (Pp9), *P. acidilactici* (Pa), *L. sakei* (Ls) PRB modifikuoto MRS sultinio. Paruošto fermentacijai mišinio drėgmė 50 %. Turinys fermentuotas Renggli A.G. (Šveicarija) termostate 35° C temperatūroje 72 h. Kas 24 h mėginiai atskirti tolimesniems tyrimams, pagal 2.1 pav. pateiktą schemą.

2.2.3 Pieno rūgšties bakterijos

Kietafazei fermentacijai atlikti buvo naudojamos trys antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčios pieno rūgšties bakterijos: *Pediococcus acidilactici* KTU 05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU 05-9 ir *Lactobacillus sakei* KTU 05-6, kurios gamina nedidelės molekulinės masės peptidus – bakteriocinus (pediociną Ac807, pediociną 809, sakaciną 806). Paminėtos PRB buvo išgrynintos iš lietuviškų spontaninių ruginių miltų raugų. Įrodyta, kad šios PRB turi antibakterinį ir antimikrobinį aktyvumą, prieš *B. subtilis* bei kai kurias mikroskopinių grybų rūšis, taip prailgindamos maisto produktų tinkamumo vartoti terminą ir jų šviežumą [52].

PRB saugotos KTU Maisto mokslo ir technologijos katedros laboratorijoje minus 70°C temperatūroje apsauginėje terpėje (*Microbank* sistemoje) ir atgaivintos modifikuotame MRS sultinyje (Oxoid, UK).

2.2.4 Ultragarsinis apdorojimas

Lubinų produktai ultragarsu paveikti proclean 3.0DSP (Vokietija) ultragarso vonelėje. Šio prietaiso galingumas 160 W, o talpa 3 litrai. Ši vonelė keičia elektros energiją į akustinę energiją, kuri vandenyje sukelia fizikinį reiškinį, vadinamą kavitacija.

Kavitacija – tai prisotintų dujų burbuliukų formavimasis skystyje. Garso banga, sklisdama vandenyje, suspaudžia ir įtempia vandens terpę, dėl ko ir sklinda garsas. Garso bangų amplitudei pasiekus tokį lygį, kad vanduo nebegali išlaikyti įtempimo, garso bangos atsiplėšia nuo vandens ir dėl neigiamo slėgio susidaro milijonai vakuuminių burbuliukų. Šių burbuliukų dydis auga tol, kol viršijama jų vidinė pusiausvyra. Viršijus šią pusiausvyrą, vanduo staigiai burbuliukus suspaudžia ir sukuria milijonus smulkių vandens čiurkšlių [104].

Kadangi ultragarso vonelėje ultragarsinės bangos sklinda tik vandeniui, lubinų mėginiai buvo ruošti kaip ir prieš kietafazę fermentaciją, t.y. 50 % drėgnio (sudarant geresnes sąlygas ultragarso bangomis sklisti per tiriamąjį produktą), įdedant jį į ploną polietileninį maišelį ir apklijuojant kraštus lipnia juosta, tikslu išvengti papildomo sąlyčio su vandeniu (2.2 pav.).



2.2 pav. Ultragarsiniam apdorojimui paruoštas lubinų mėginys.

Ultragarsinis poveikis pagal 2.1 pav. atliktas su: 1) lubinų viso dalių malimo sėklomis esant 50 % drėgniui; 2) prieš lubinų produktų kietafazę fermentaciją (ULT+KF) ir 3) po lubinų produktų kietafazės fermentacijos (KF+ULT). Visais atvejais mėginiai buvo 50 % drėgnio, ruošti pagal 2.2.2 skyriuje aprašytą metodiką. Visi mėginiai paveikti 60 min, 37 kHz dažnio bangomis, palaikant ledo pagalba 18-20 °C temperatūrą. Optimalios ultragarsinio poveikio trukmės parinkimo sąlygos aprašytos rezultatų (3.3.1 ir 3.3.2) skyriuose, 3.11 ir 3.12 paveiksluose. Optimali ultragarsinio poveikio trukmė (60 min) parinkta, atsižvelgiant į didžiausią tirpiųjų baltymų kiekio susidarymą ir BMS sumažėjimą.

2.3 Tyrimo metodai

2.3.1 Bendro baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu

Bendras baltymų kiekis lubinų viso dalių malimo sėklose ir jų fermentuotuose ir/ar ultragarsu paveiktuose produktuose buvo nustatytas pagal ISO 20483:2013 standartą [105].

Bendro lubinų viso dalių malimo sėklų baltymų kiekio nustatymui po 1,0 g tiriamo produkto mėginio sudedama į Kjeldalio kolbas, įpilama 20 ml koncentruotos H₂SO₄, įdedamas katalizatorių mišinys (kalio sulfato milteliai (1000 masės dalių), titano dioksidas (30 masės dalių) ir vario sulfato pentahidratas (30 masės dalių)) ir antiputokšlių (cinko šratų). Kjeldalio kolbos „Behr Labor Technik“ (Vokietija) mineralizavimo aparate kaitinamos 100 min, kol mineralizatas tampa skaidrus, t. y. kol produkto organinės medžiagos suskyla ir lieka tik mineraliniai junginiai. Kolbos atvėsinaamos.

Atvėsintos kolbos dedamos į „Behr Labor Technik“ (Vokietija) distiliatorių. Distiliuojama 5 min. Kondensatoriaus išėjimo vamzdelio galiukas turi būtų pamerktas į kūginę 300 ml talpos kolbą distiliatui surinkti, į kurią įpilama boro rūgšties (H₃BO₃) tirpalo. Pasibaigus distiliacijai, į kūginę kolbą įlašinami 2–3 lašai Taširo indikatorius tirpalo ir distiliatas titruojamas 0,1N HCl tirpalu, kol distiliato spalva iš žalios spalvos tampa ryškiai violetine. Atlikti 3 lygiagretūs tyrimai.

Tokiomis pat sąlygomis distiliuojamas ir titruojamas kontrolinis (tuščias) mėginys (sieros rūgštis).

Azoto kiekis (N) % apskaičiuojamas pagal formulę:

$$N = [1,4 \times n \times K(V_1 - V_0)]/m$$

čia 1,4 – azoto kiekis, kurį sujungia 1 ml 0,1 N HCl g,

V₁ – 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas iš distiliuojamo mineralizato išsiskyrusiam amoniakui sujungti ml,

V₀ – 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas tuščiajam mėginiui titruoti ml,

K – druskos rūgšties tirpalo pataisos koeficientas (1)

m – analizuoto mėginio masė g.

Baltymų kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$B_{pr} = N \times k$$

čia:

N – azoto (N) kiekis,

k – koeficientas perskaičiuoti azoto kiekį į baltymų kiekį (6,25).

2.3.2 Tirpiųjų baltymų kiekio nustatymas

Tirpiųjų baltymų kiekio nustatymui pasveriami 5 g lubinų viso dalių malimo sėklų (arba jau fermentacijos ir/ar ultragarso paveiktų mėginių), sudedama į kūginę 100 ml talpos kolbą ir užpilama 20 ml distiliuoto vandens. Įpilama 2 ml 10 % NaCl, kad geriau ištirptų ne tik albuminų, bet ir globulinų grupės baltymai. Mišinys suplakamas ir paliekamas stovėti 10 min, kaskart vis suplakant. Po to filtruojama per vatą. Medžiagos liekana kolboje dar kartą ekstrahuojama užpylus 20 ml vandens ir filtruojama per vatą į tą patį indą. Gautas filtratas supilamas į 50 ml matavimo kolbą, pripilama vandens iki žymės ir sumaišoma.

Pipete paimama 20 ml tirpalo ir supilama į Kjeldalio kolbą, į ją įpilama 20 ml koncentruotos H₂SO₄, įdedamas katalizatorių mišinys (kalio sulfato milteliai (1000 masės dalių), titano dioksidas (30 masės dalių) ir vario sulfato pentahidratas (30 masės dalių)) ir antiputokšlių (cinko šratų). Toliau viskas atliekama kaip ir bendro baltymų kiekio nustatymo metu. Išsiskyrusio azoto kiekis taip pat apskaičiuojamas pagal tą pačią formulę. Atlikti 3 lygiagretūs tyrimai [105].

Tirpiųjų baltymų kiekis mėginiuose surandamas pagal paimtą analizei jo kiekį ir praskiedimo tūrį:

$$B_{pr} = B_f \times 50/G$$

čia:

G – analizei paimtas miltų kiekis, g,

50 – paruošto filtrato, kuriame yra tirpūs baltymai, tūris, ml.

2.3.3 Lubinų baltyminių medžiagų išskyrimas ir gryninimas

Norint atlikti tolesnius eksperimentus su lubinų baltyminėmis medžiagomis, būtina išskirti lubinų baltymus iš maistinių sėklų. Baltyminių medžiagų išskyrimui, lubinų viso dalių malimo sėklų miltai (fermentuoti ir/ar ultragarsu paveikti mėginiai) sumaišyti su distiliuotu vandeniu santykiu 1:10 (miltų:vandens) ir kambario temperatūroje (20±2 °C) retkarčiais pamaisant išlaikomi 30 min Po to 1 M NaOH tirpalu suspensijos pH sureguliuojamas iki 9 ir išlaikoma 1 h nuolat maišant. Suspensija centrifuguojama “Heraeus labofuge 200” (JAV) centrifuga 15 min, esant 3000 aps/min. Į centrifugatą lašinamas 1 M HCl, kol pasiekiamas pH 4,5 ir vėl išlaikoma 1 h. Nusėdę baltymai atskiriami centrifuguojant 15 min, esant 3000 aps/min ir išdžiovinami “Sublimator 3x4x5 Zirbus technology” (Vokietija) sublimatoriuje [106]. Šie baltymai panaudojami SDS-PAGE elektroforezės tyrimui prieš tai juos vėl ištirpinus 0,1 N NaOH tirpale. Analogiškai baltymų išskyrimai atliekami su 24 h, 48 h ir 72 h KF ir/ar ultragarsu paveiktais lubiniais, kurie panaudoti funkcinių savybių, *in vitro* virškinamumo ir proteazių inhibitorių aktyvumo nustatymuose. Pagal šią metodiką buvo išskirtos lubinų albuminų ir gliutelinų frakcijos.

2.3.4 Baltyminių medžiagų analizė SDS-PAGE elektroforezės metodu

SDS – PAGE (iš anglų k. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė) skirta baltymų molekulinės masės nustatymui. Šio tyrimo naudotų reagentų sąrašas ir tirpalų paruošimas pateiktas I priede.

SDS – PAGE analizės darbo eiga. Naudojamos dvi švarios stiklo plokštelės ir dvi stiklo plokštelės su tarpinėmis. Stiklo plokštelės įstatomos į elektroforezės Cleaver scientific CVS10 (Didžioji Britanija) aparato gardelę specialiame stovelyje ir suspaudžiamos spaustukais.

Tarpeliai tarp stiklo plokštelių pripildomi skiriamą ir koncentruojamą poliakrilamido gelio. Skiriamasis gelis ruošiamas 6 % akrilamido koncentracijos, ir susideda iš 2 ml 30 % akrilamido tirpalo, 2,5 ml 4×TRIS·HCl/NDS buferinio tirpalo, kai pH 8,8, 5,4 ml vandens, 100 µl amonio persulfato [(NH₄)₂S₂O₈] tirpalo ir 8 µl TEMED tirpalo. Tuomet supilamas skiriamasis gelis iki plokštelės viršaus paliekant 2 cm koncentruojamajam geliui. Ant skiriamą gelio paviršiaus, užlašinamas sluoksnis distiliuoto vandens, nes deguonis lėtina polimerizacijos reakciją ir gaunamas lygus ir plokščias gelio paviršius. Laukiama, kol įvyks polimerizacijos reakcija ir po 1 h nupilamas vanduo. Koncentruojamasis gelis, kuris susideda iš 1,7 ml 30 % akrilamido tirpalo, 2,5 ml 4×TRIS·HCl/NDS buferinio tirpalo, kai pH 6,8, 5,7 ml vandens, 100 µl amonio persulfato [(NH₄)₂S₂O₈] tirpalo ir 10 µl TEMED tirpalo, supilamas ant skiriamą gelio. Ant plokštelių neturi būti oro burbuliukų. Į užpiltą koncentruojamą gelio sluoksnį įstatomos šukos. Laukiama, kol įvyks polimerizacijos reakcija ir po 45 min atsargiai išimamos šukos ir taip sudaromi šulinėliai.

Būtina tiriamąjį baltymą paruošti elektroforezei, tam tiriamasis baltymo tirpalas santykiu 1:1 skiedžiamas su 2×baltymo denatūravimo buferiniu tirpalu ir kaitinamas 5 min verdančio vandens vonioje. Atvėsinus mėginius švirškštu su tiesiai nupjauta adata ant šulinėlių dugno uždedami ploni paruoštų baltymų sluoksniai ~ 20 µl. Į kraštinius šulinėlius įpilamas etaloninis baltymas SIGMA colorburst „Electrophoresis marker“ ~ 5 µl. Elektroforezės aparato Cleaver scientific CVS10 (Didžioji Britanija) talpykla pripildoma TRIS-glicino buferinio tirpalo ir aparatas prijungiamas prie pastovos elektros srovės: 60 mA ir 220 V įtampa, 1 h trukmė. Po elektroforezės poliakrilamido gelis atsargiai atskiriamas nuo stiklo plokštelių, įdedamas į plastikinę vonelę ir užpilamas Coomassie mėlio dažo tirpalu, dažoma, kol baltymo juostelės nusidažo norimo ryškumo spalva (2-3 h). Baigus dažyti, dažai nupilami ir užpilama 10 % acto rūgšties, vonelė purtoma, kol iš gelio išsiplauna nesusirišę baltymų dažai. Išplovus nesurištus dažus nustatomos lubinų baltymų molekulinės masės pagal standartinį baltymų mišinį [107].

2.3.5 Baltymų funkcinų savybių (putojimo, emulgavimo) įvertinimas

Emulsijos sudarymo pajėgumo tyrimui ruoštos trys 1 % baltymų (pagal 2.3.3 skyriuje aprašytą baltyminių medžiagų išskyrimo metodiką) ir vandens suspensijos. 0,25 g baltymų sumaišoma su 10 ml vandens ir, lašinant 0,1 M NaOH arba 0,1 M HCl tirpalą, suspensijos pH sureguliuojamas iki 4,5, 6 ir 8. Supilama į skirtingas 25 ml matavimo kolbutes ir praskiedžiama iki žymės. 5 ml suspensijos 5 min homogenizuojama „IKA T25 digital“ (Vokietija) homogenizatoriumi, esant 7600 aps/min. Praėjus 5 min, įpilama 5 ml „Obelių“ rapsų aliejaus ir tuo pačiu greičiu homogenizuojama dar 5 min. Vėliau emulsija centrifuguojama „Heraeus labofuge 200“ (JAV) centrifuga 10 min 3000 aps/min greičiu. Emulsijos sudarymo pajėgumas (ESP) apskaičiuojamas pagal formulę [108]:

$$ESP = (\text{emulsijos sluoksnio tūris (ml)}/\text{bendras suspensijos tūris (ml)}) \cdot 100, \%$$

Emulsijos stabilumo tyrimui mėginiai ruošti taip pat, kaip ir emulsijos susidarymo pajėgumui nustatyti. Tik prieš centrifugavimą mėginiai papildomai pakaitinami 85 °C temperatūroje 30 min, tuomet atvėsunami iki kambario temperatūros (20±2°C), 5 min laikant mėgintuvėlius po šaltu vandeniu. Atvėsinti mėginiai centrifuguojami “Heraeus labofuge 200” (JAV) centrifuga 10 min 3000 aps/min greičiu. Emulsijos stabilumas (ES) apskaičiuojamas pagal formulę [108]:

$$ES = (\text{emulsijos sluoksnio tūris (ml)}/\text{bendras suspensijos tūris (ml)}) \cdot 100, \%$$

Putų sudarymo pajėgumo tyrimui ruoštos trys 1% baltymų (pagal 2.3.3 skyriuje aprašytą baltyminių medžiagų išskyrimo metodiką) vandens suspensijos 0,25 g baltymų sumaišoma su 10 ml vandens ir, lašinant 0,1 M NaOH arba 0,1 M HCl tirpalą, suspensijos pH sureguliuojamas iki 4,5, 6 ir 8. Supilama į skirtingas 25 ml matavimo kolbutes ir praskiedžiama iki žymės. Po to imama 10 ml suspensijos ir plakama “IKA T25 digital” (Vokietija) plakikliu 5 min. Putų sudarymo pajėgumas (PP) apskaičiuojamas pagal formulę [109]:

$$PSP = (\text{putų tūris (ml)}/\text{bendras suspensijos tūris (ml)}) \cdot 100, \%$$

2.3.6 Baltymų virškinamumo ir proteazių inhibicinio aktyvumo nustatymas

Baltymų *in vitro* virškinamumo nustatymui tirtos lubinų viso dalių malimo sėklų albuminų ir gliutelinų frakcijos (pagal 2.3.3 skyriuje aprašytą baltyminių medžiagų išskyrimo metodiką). Mėginiai (62,5 mg baltymų) sumaišyti su 10 ml distiliuoto vandens, centrifuguoti “Heraeus labofuge 200” (JAV) (2000 aps/min, 5 min). Gauto tirpalo pH sureguliuotas iki 8, naudojant 0,1 M NaOH. Baltymų suspensija sumaišyta su fermentų mišiniu, sudarytu iš tripsino (1,6 mg), α-chimotripsino (3,1 mg) ir peptidazės (1,3 mg), santykiu 10:1. Mišinio pH matuotas tiksliai po 10 min Baltymų virškinamumas (V, %) *in vitro* įvertintas pagal hidrolizuotų baltymų kiekį [110]:

$$V = 210,464 - 18,103 \times \text{pH}, (\%)$$

Proteazių baltymuose inhibitorių aktyvumas vertintas pagal tripsino ir chimotripsino inhibitorių aktyvumą lubinų viso dalių malimo sėklų albuminų ir gliutelinų frakcijose (pagal 2.3.3 skyriuje aprašytą baltyminių medžiagų išskyrimo metodiką), naudojant kazeiną kaip substratą.

Reakcijos mišinys sudarytas iš 1,0 ml fosfatinio buferio, 0,5 ml proteazės tirpalo (1 mg/ml), 0,5 ml 1 mM HCl ir 1 ml mėginio tirpalo (1g/10 ml fosfatinio buferio), į kurį po 30 min inkubacijos 37 °C temperatūroje, įpilta 2 ml kazeino tirpalo (2 %). Reakcija vykdyta 37 °C temperatūroje 20 min, po to sustabdyta, įpylus 6 ml 5 % trichloracto rūgšties. Tirozino kiekis

nustatytas pagal tirpalo absorbciją, išmatuotą Genesys 10 UV (JAV) spektrofotometru, esant 660 nm bangos ilgiui. Inhibicinis aktyvumas (%) apskaičiuotas pagal proteolitinio aktyvumo sumažėjimą mėginiuose su inhibitoriaus tirpalu ir be jo [110].

2.3.7 Spektrofotometriniai metodai lubinų fermentinių aktyvumų nustatymui

Nustatyti fermentiniai (proteazių, amilazinių ir ksilanazių) lubinų sėklų aktyvumai, apdorojant jas ultragarsu, kietafaze fermentacija ar ultragarsu KF sąlygose.

Proteazės aktyvumo nustatymui lubinų produktuose taikomas kolorimetrijos metodas – proteazės reakcija, naudojant tirosiną, kaip standartą (Sigma, Kokybės kontrolės bandymai SSCASE01.001, 1999) [111].

Metodo esmė. Veikiant proteazei, kazeinas suskaldomas iki aminorūgščių ir jų kiekis nustatomas kolorimetriniu metodu pagal spalvoto tirpalo, susidariusio joms reaguojant su Folin-Ciocalteu fenoliniu reagentu, optinį tankį. Proteazės aktyvumo vienetas (PV) – tai fermento kiekis, kuris sugeba suskaidyti 1 g kazeino iki aminorūgščių, vykdant hidrolizę nustatytomis sąlygomis (10 min, 37 °C temperatūra, terpės pH 7,5). Kaip substratas naudojamas 0,65 % kazeino tirpalas.

Medžiagos. Kalio fosfatas, kazeinas, trichloracetato rūgštis, Folin-Ciocalteu fenolinis reagentas, natrio karbonatas, natrio acetatas, kalcio acetatas, tirozinas.

Kalio fosfato buferinis tirpalas (0,05 M; pH 7,5). 3,4 g KH_2PO_4 ištirpinama nedideliame kiekyje vandens, pašildoma iki 37 °C temperatūros ir sureguliuojamas pH 7,5. Paruoštas tirpalas praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 500 ml. Laikoma stiklo butelyje patalpos temperatūroje.

0,65 % kazeino tirpalas (pH 7,5). 1,3 g kazeino ištirpinama nedideliame kiekyje kalio fosfato buferio (pH 7,5). Tada pašildoma iki 80-90 °C temperatūros ir maišant kaitinama 10 min. Po kaitinimo atvėsinama iki 37 °C temperatūros ir sureguliuojamas pH 7,5. Paruoštas tirpalas praskiedžiamas kalio fosfato buferiu iki 200 ml. Laikoma stiklo butelyje 0 - 4 °C temperatūroje.

Trichloracetato rūgšties reagentas (0,11 M). 9 ml trichloracetato rūgšties praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 500 ml. Laikoma stiklo butelyje patalpos temperatūroje.

Folin-Ciocalteu fenolinis reagentas. 10 ml Folin-Ciocalteu fenolinio reagento praskiedžiama vandeniu iki 50 ml. Laikoma tamsaus stiklo butelyje patalpos temperatūroje.

Natrio karbonato tirpalas (0,5 M). 26,5 g bevandenio Na_2CO_3 ištirpinama nedideliame kiekyje distiliuoto vandens ir praskiedžiama iki 500 ml. Laikoma stiklo butelyje patalpos temperatūroje.

Kalcio acetato (0,005 M) ir natrio acetato trihidrato (0,01 M) buferinis tirpalas. 1,36 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ir 0,88 g $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ ištirpinama nedideliame kiekyje distiliuoto vandens,

pašildoma iki 37 °C temperatūros ir sureguliuojamas pH 7,5. Paruoštas tirpalas praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1000 ml. Laikoma stiklo butelyje patalpos temperatūroje.

L-Tirozino etaloninis tirpalas (0,0011 M). 0,199 g tirozino sumaišoma su nedideliu kiekiu distiliuoto vandens ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 100 ml. Laikoma stiklo butelyje patalpos temperatūroje.

Lubinų ekstrakto paruošimas. 5±0,01 g lubinų viso dalių malimo sėklų (KF ir/ar ultragarsu paveiktų mėginių) ir 50 ml (0,01 M natrio acetato ir 0,005 M kalcio acetatas) buferio tirpalo homogenizuojama (9500 aps./min; 5 min). Gautas homogenizatas centrifuguojamas (3000 aps./min, 10 min) ir nustatomas centrifugato tūris.

Kalibracinės keivės sudarymas. 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,5 ml etaloninio tirozino tirpalo praskiesta vandeniu iki 2 ml. Paruošti darbiniai tirozino tirpalai sumaišyti su 5 ml 0,5 M natrio karbonato tirpalu, 1 ml Folin-Ciocalteu fenolinio reagentu ir išlaikius 30 min 37 °C temperatūros vandens vonioje, Genesys 10 UV (JAV) spektrofotometru ($\lambda = 660$ nm) išmatuotas jų optinis tankis, analogiškai ruošiamas tuščias bandinys, be tirozino. Sudarant tirozino kalibracinę kreivę (pateikta 2 priede) nustatyta, kad tarp tirozino koncentracijos tirpale ir jo optinio tankio yra stipri tiesinė priklausomybė, kuri aprašyta lygtimi $y=0,1314x + 0,0176$ (čia: y – optinis tankis, x – tirozino tirpalo koncentracija, μM). Determinacijos koeficientas R^2 tarp šių dydžių yra lygus 0,9945. Tai rodo, kad kalibracinė kreivė yra tiksli ir gali būti taikoma tirozino kiekiui nustatyti.

Analizės atlikimas. Į mėgintuvėlį įpilama 5 ml kazeino tirpalo ir 1 ml lubinų ekstrakto. Gerai sumaišius, išlaikoma 30 min 37 °C temperatūros vandens vonioje. Lygiagrečiai atliekamas kontrolinis bandymas, be lubinų ekstrakto. Po to į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 5 ml 0,11 M trichloracetato rūgšties, į tuščiąjį mėginį – papildomai 1 ml lubinų ekstrakto ir gerai išmaišius, išlaikoma 30 min 37 °C temperatūros vandens vonioje. Analogiškai ruošiami ir kontroliniai mėginiai, tik filtratas imamas iš kontrolinio mėginio. Vėliau filtruojama per 0,45 μm popierinį filtrą. Sumaišoma 2 ml filtrato su 5 ml 0,5 M natrio karbonato tirpalu ir 1 ml Folin-Ciocalteu fenoliniu reagentu ir išlaikius 30 min 37 °C temperatūros vandens vonioje spektrofotometru Genesys 10 UV (JAV) matuojamas tirpalo optinis tankis ($\lambda = 660$ nm). Eksperimentas kartojamas tris kartus, vidutinė absorbcijos vertė naudojama tirozino kiekiui nustatyti ir proteazės aktyvumui apskaičiuoti.

Iš kalibracinės kreivės, nustatius tirozino kiekį (T), proteazės aktyvumas lubinų ekstrakto apskaičiuojamas pagal formulę:

$$PV = \frac{T \cdot PF}{1 \cdot 30 \cdot 2 \cdot m}, PV/g$$

čia: T – tirozino ekvivalentas standartinėje tiesėje, $\mu\text{mol/ml}$; PF – praskiedimo faktorius (11); 1 – tiriamojo tirpalo tūris, ml; 30 – hidrolizės trukmė, min; 2 – reakcijos mišinio tūris, paimtas kolorimetrinei analizei, ml; m – lubinų masė, paimta 1 ml ekstraktui paruošti, g

Proteazės aktyvumas lubinuose (PV/g) nustatomas, žinant sėklų masę, paimtą ekstraktui paruošti (5 g), ir gauto ekstrakto tūrį (43,5 ml).

α -amilazės aktyvumas lubinų produktuose nustatomas pagal ICC metodą Nr. 108 (ICC, 1998) [112].

Metodo esmė. Veikiant α -amilazei, tirpus krakmolą hidrolizuojamas iki įvairios molekulinės masės dekstrinų. Likusio nehidrolizuoto krakmolo kiekis nustatomas kolorimetriniu metodu pagal spalvoto tirpalo, susidariusio reaguojant krakmolui su jodo tirpalu, optinį tankį. α -Amilazės aktyvumo vienetas (AV) – tai fermento kiekis, kuris sugeba suskaidyti 1 g tirpaus krakmolo iki įvairios molekulinės masės dekstrinų, vykdant hidrolizę nustatytomis sąlygomis (10 min, 30 °C temperatūra, terpės pH 4,7). Kaip substratas naudojamas 1 % tirpaus krakmolo tirpalas.

Medžiagos. Ledinė acto rūgštis, natrio acetatas, J_2 , KJ, bevandenis CaCl_2 , krakmolą, 0,1 M HCl.

1 % krakmolo tirpalas. 1 g krakmolo sumaišomas su 50 ml vandens, išmaišoma. 10 min tirpalas yra dedamas į verdantį vandenį ir intensyviai maišomas. Atvėsinamas iki kambario temperatūros, įpilama 10 ml acetato buferio. Tirpalas praskiedžiamas vandeniu iki 100 ml. Laikoma stiklo butelyje 0 - 4 °C temperatūroje.

Acetatinis buferis (0,2 M, pH 4,7). 12,010 g ledinės acto rūgšties sumaišoma su nedideliu kiekiu distiliuotu vandens. 27,216 g natrio acetato trihidrato $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ištirpinamas ledinėje acto rūgštyje su distiliuotu vandeniu. Sureguliuojamas pH 4,7 ir tirpalas praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1 l. Laikoma stiklo butelyje patalpos temperatūroje.

Standartinis jodo tirpalas. 0,5 g jodo ir 5 g KJ ištirpinami nedideliame kiekyje vandens. Tirpalas maišomas su magnetine maišykle. Tirpalas praskiedžiamas iki 200 ml talpos matavimo kolboje su distiliuotu vandeniu. Laikoma tamsaus stiklo butelyje patalpos temperatūroje.

Praskiestas jodo tirpalas. 2 ml standartinio jodo tirpalo praskiedžiama su 0,1 M HCl iki 100 ml. Sureguliuojama tirpalo absorbcija $0,22 \pm 0,01$, esant $\lambda = 440$ nm.

CaCl_2 tirpalas (pH 6,0). 0,1 g bevandenio CaCl_2 ištirpinama su distiliuotu vandeniu, pH sureguliuojamas iki 6,0. su 0,2 M NaOH ir praskiedžiama iki 1 l su distiliuotu vandeniu. Laikoma stiklo butelyje patalpos temperatūroje.

Lubinų ekstrakto paruošimas. $3 \pm 0,01$ g viso dalių malimo lubinų sėklų (KF ir/ar ultragarsu paveiktų mėginių) ir 30 ml CaCl_2 tirpalo (pH 6,0) homogenizuojama (9500 aps./min; 5 min).

Gautas homogenizatas centrifuguojamas (3000 aps./min, 10 min) ir nustatomas centrifugato tūris.

Analizės atlikimas. Į mėgintuvėlius įpilama po 10 ml 1 % krakmolo tirpalo ir išlaikoma 10 min 30 °C temperatūros vandens vonioje. Tada įpilama 5 ml tiriamojo lubinų ekstrakto, o į tuščią tyrimo mėgintuvėlį – 5 ml CaCl₂ tirpalo. Gerai išmaišoma ir vėl laikoma 10 min 30 °C temperatūros vandens vonioje. Iš kiekvieno mėgintuvėlio imama po 0,5 ml tiriamojo mišinio, sumaišoma su 50 ml praskiesto jodo tirpalo ir iš karto Genesys 10 UV (JAV) spektrofotometru (λ =670 nm) matuojamas gauto tirpalo optinis tankis. Eksperimentas kartojamas tris kartus, vidutinė absorbcijos vertė naudojama fermento aktyvumui apskaičiuoti.

α-amilazių aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$AV = \frac{7,264 \cdot m + 0,03766}{m_1} \cdot 1000, AV/g$$

čia: m – hidrolizuoto krakmolo kiekis, g; m₁ – lubinų masė, paimta 5 ml ekstraktui paruošti, g.

Hidrolizuoto krakmolo kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$m = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \cdot 0,1, g$$

čia: D₁ – tuščiojo mėginio optinis tankis; D₂ – tiriamojo mėginio optinis tankis, 0,1 – krakmolo kiekis, paimtas tyrimui.

Ksilanazės aktyvumas lubinų produktuose nustatomas kolorimetriniu metodu, naudojant 3,5-dinitrosalicilo rūgšties reagentą (Miller, 1959) [113, 114].

Metodo esmė. Veikiant ksilanazei, ksilanas suskaldomas iki redukuojančių sacharidų (daugiausiai ksilozės) ir jų kiekis nustatomas kolorimetriniu metodu pagal spalvoto tirpalo, susidariusio reaguojant ksilozei su 3,5-dinitrosalicilines rūgšties reagentu, optinį tankį. Ksilanazės aktyvumo vienetu (KV) laikomas toks fermento kiekis, kuris nustatytomis sąlygomis veikdamas ksilaną (40 °C temperatūroje, terpes pH 4,5) per 1 min sugeba atskelti 1 μmol ksilozės. Kaip substratas naudojamas 1 % beržo medienos 4-0-metilo-D-gliukurono-D-ksilano tirpalas.

Medžiagos. D-ksilozė, 3,5-dinitrosalicilo rūgštis; natrio acetatas, ledinė acto rūgštis, natrio hidroksidas, natrio-kalio tartratas; beržo ksilanas.

Acetatinis buferis (0,1 M; pH 4,5). Ledinė acto rūgštis (5,76 ml) ir natrio acetatas (13,6 g) ištirpinami 1 litre distiliuoto vandens, sureguliuvus tirpalo pH iki 4,5±0,01. Laikoma stiklo butelyje patalpos temperatūroje.

DNS reagentas. 3,5-dinitrosalicilo rūgštis (1±0,01 g) ir natrio-kalio tartratas (30±0,01 g) ištirpinami 100 ml 0,4 M NaOH. Laikoma stiklo butelyje patalpos temperatūroje.

Ksilano (0,5 %) tirpalas. Beržo ksilanas ($0,5 \pm 0,01$ g) ištirpinamas 0,1 M natrio acetato buferyje (100 ml; pH 4,5; 50 °C). Laikoma stiklo butelyje 0 – 4 °C temperatūroje.

Lubinų ekstrakto paruošimas. $3 \pm 0,01$ g viso dalių malimo lubinų sėklų (KF ir/ar ultragarsu paveiktų mėginių) ir 30 ml 0,1 M natrio acetaro buferio (pH 4,5) homogenizuojama (9500 aps./min, 5 min). Gautas homogenizatas centrifuguojamas (3000 aps./min, 10 min) ir nustatomas centrifugato tūris.

Kalibracinės kreivės sudarymas. Ksilozės kalibravimo kreivei sudaryti naudojamas darbinis 1 % D-ksilozės tirpalas (10 mg/ml). 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 250 µl darbiniai ksilozės tirpalai praskiesti su DNS reagentu iki 500 µl. Įpilama 500 µl distiliuoto vandens. Mėginiai kaitinami tiksliai 5 min 100 °C temperatūros vandens vonioje. Atlikus redukciją 3,5-dinitrosalicilo rūštimi, gauti tirpalai atšaldomi iki kambario temperatūros, įpilama 4 ml distiliuoto vandens (bendras tirpalo tūris 5 ml) ir Genesys 10 UV (JAV) spektrofotometru matuojamas tirpalų spalvos intensyvumas ($\lambda = 540$ nm). Sudarant kalibracinę kreivę (pateikta 2 priede) nustatyta, kad tarp optinio tankio ir ksilozės kiekio tirpale yra stipri tiesinė priklausomybė, kuri aprašyta lygtimi $y = 0,7877x + 0,0142$ (čia: y – optinis tankis, x – jį atitinkantis ksilozės kiekis, mg/ml). Determinacijos koeficientas R^2 tarp šių dydžių yra lygus 0,9959. Tai rodo, kad kalibracinė kreivė yra tiksli ir gali būti taikoma ksilozės kiekiui nustatyti.

Analizės atlikimas. Reakcijos mišinys (1ml), sudarytas iš lubinų ekstrakto (200 µl), beržo ksilano tirpalo (50 µl) ir acetatinio buferio (750 µl, 0,1 M, pH 4,5), inkubuotas 1 h 40 °C temperatūroje. Tuomet ekvivalentiškai tirpalo ir DNS reagentos kiekiai (po 500 µl) sumaišomi, įpilama 1 ml distiliuoto vandens, gautas mišinys kaitintamas 5 min 100 °C temperatūros vandens vonioje, atvėsintas iki kambario temperatūros, įpilama 3 ml distiliuoto vandens (bendras tirpalo tūris 5 ml) ir spektrofotometru Genesys 10 UV (JAV) matuojama tirpalo absorbcija ($\lambda = 540$ nm). Eksperimentas kartojamas 3 kartus, vidutinė absorbcijos vertė naudojama fermentų aktyvumui apskaičiuoti. Lygiagrečiai tiriami du kontroliniai mėginiai: mėginys tik su lubinų ekstraktu ir mėginys tik su beržo ksilanu.

Fermentų aktyvumui apskaičiuoti sudaryta absorbcijos verčių priklausomybė nuo ksilozės koncentracijos tirpale.

Lubinų ksilanazių aktyvumas apskaičiuojamas pagal lygtį:

$$KV = \frac{\alpha \cdot PF \cdot \Delta A \cdot V}{b \cdot s \cdot \Delta t \cdot m}, KV/g$$

čia: α – reakcijos mišinio tūris, ml; b – lubinų ekstrakto kiekis reakcijos mišinyje, ml; s – ksilozės standartinės tiesės polinkis, mg/ml; PF – praskiedimo faktorius; Δt – reakcijos trukmė, min; m – lubinų masė, naudota ekstraktui paruošti, g; V – lubinų ekstrakto tūris, ml; ΔA – absorbcijos pokytis ($\Delta A_{\text{mėginio}} - \Delta A_{\text{substrato}} - \Delta A_{\text{ekstrakto}}$).

2.3.8 Bendro mikroorganizmų skaičiaus (BMS) nustatymas

Mikroorganizmai – bakterijos, mielės ir pelėsiniai grybai, sudarantys skaičiuojamas kolonijas, augančios LST EN ISO 4833:2003 standarte nurodytomis sąlygomis.

Tyrimas atliekamas pagal LST EN ISO 4833:2003 Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis metodas. Kolonijų skaičiavimo 30 laipsnių temperatūroje metodas [12].

Tyrimo principas: Tiriamoji mėginio dalis atsverama svarstyklėmis ir praskiedžiama specialiu skiedikliu santykiu 1:9. Šis mišinys purtykle Tamson (Olandija) gerai išmaišomas. Homogenato dalis vėl skiedžiama santykiu 1:9 tiek kartų kiek reikia. Kiekvieno praskiedimo 1 ml suspensijos įlašinama į sterilią Petri lėkštelę, o vėliau į ją įpilama apie 15 ml Agaro mitybinės terpės bendram bakterijų skaičiui nustatyti. Pasėlis su terpe rūpestingai išmaišomas sukant Petri lėkšteles ir leidžiama mišiniui sustingti. Paruoštos lėkštelės inkubuojamos 72 h termostate Renggli A.G. (Šveicarija) +30° C temperatūroje. Pasibaigus inkubavimo laikui bakterijų kolonijos suskaičiuojamos ir apskaičiuojamas jų kiekis 1g tiriamojo mėginio.

Norint įvertinti ultragarsinio poveikio įtaką antimikrobiniam aktyvumui, lubinų viso dalių malimo sėklos buvo paveiktos 20, 40, 60 ir 80 min ultragarsu (37 kHz 18-20 °C temp.). Bandymas kartotas 2 kartus, vidutinei vertei apskaičiuoti įvertintos 3 lėkštelės, BMS išreikšti paimtas aritmetinis vidurkis. Šaldyto ledo pagalba ultragarso vonelėje palaikyta pastovi temperatūra, kuri buvo 18-20 °C.

Kolonijas sudarančių vienetų (KSV) skaičius 1 g lubinų mėginiuose apskaičiuojamas pagal formulę;

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

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

V – užsėtos medžiagos ar skiedinio tūris lėkštelėje mililitrais;

n_1 – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

n_2 – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

d – pirmojo vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas [d=1, kai tiriamas mėginys yra neskiestas].

2.3.9 Matematinė statistinė duomenų analizė

Visų atliktų tyrimų kartojamumas – 3. Gautų rezultatų vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti, naudojant MS Excel programinį paketą. Mikrobiologinių tyrimų kartoti 2 kartus.

Matematinė statistinė tyrimo duomenų analizė atlikta, naudojant MS Excel programinį paketą.

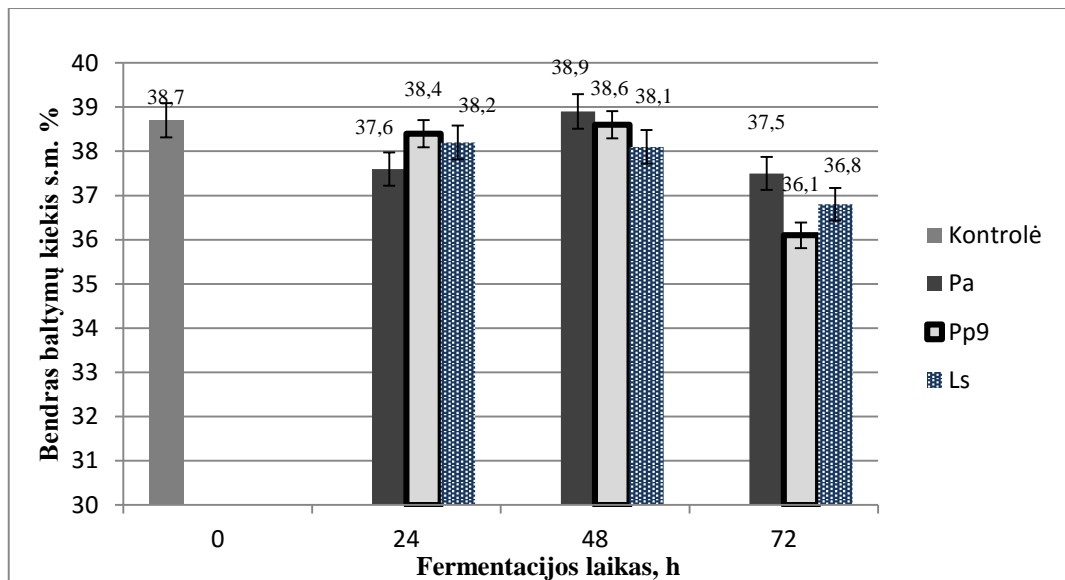
3. Rezultatai ir jų aptarimas

Pradiniame eksperimento etape atlikti kompleksiniai tyrimai, vertinant PRB kietafazės fermentacijos (KF) įtaką lubinų produktų cheminiai sudėčiai ir funkcinėms savybėms. Šiame etape siekta išsiaiškinti KF savitumus ir galimybę panaudoti fermentuotus lubinų produktus kepinių ruošimui. Šiame etape gauti rezultatai leido priimti sprendimus, išbandant ultragarsinį poveikį (II etapas) KF efektyvumo didinimui.

3.1 Kietafazės fermentacijos įtaka lubinų baltyminėms medžiagoms

Nustatyti bendri ir tirpūs lubinų baltymų pokyčiai kietafazės fermentacijos (KF) metu, naudojant skirtingas PRB padermes ir fermentacijos trukmę. Kaip kontrolė, nustatant bendrą baltymų kiekį sausosioms medžiagoms, panaudotos lubinų viso dalių malimo sėklos.

Lubinų sėklų bendras baltymų pokytis KF metu pavaizduotas 3.1 paveiksle.

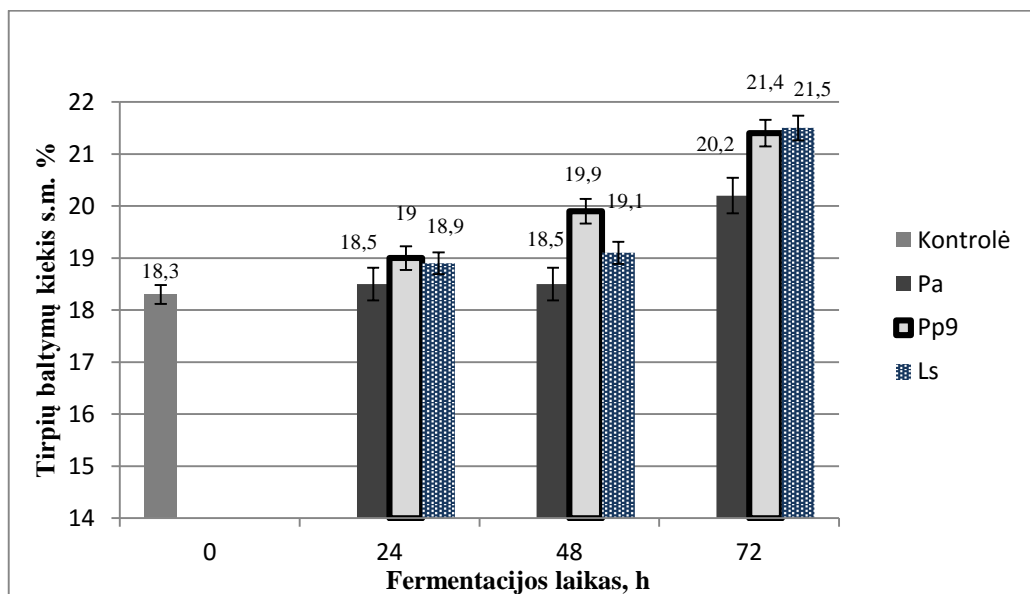


3.1 pav. KF įtaka bendram baltymų kiekiui lubinų sėklose

Vertinant KF proceso įtaką lubinų baltymų pokyčiams, stebimas baltymų mažėjimas, (lyginant su kontrole be fermentacijos) ir jis yra ryškiausias po 72 h fermentacijos (sumažėjimas sudaro vidutiniškai 4,91 %). Kitais fermentacijos etapais (po 24 h ir 48 h), baltymų pokyčiai nustatyti mažesni ir jie sudarė, atitinkamai 1,63 ir 0,44 %.

Vertinant PRB padermės įtaką baltymų pokyčiams, išryškėjo po 72 h skirtinga jų įtaka analizuojamam kriterijui. Didžiausi baltymų pokyčiai (6,48 %) nustatyti tiriamose sistemose, fermentuojant lubinus su Pp9, o mažiausi – naudojant Pa paderme (3,6 %). Baltymų pokyčiai, gauti fermentuojant lubinus su Ls, užėmė tarpinę padėtį ir sudarė 3,67 %.

Tirpiųjų baltymų (albuminų ir globulinų) pokytis lubinų sėklose KF metu pavaizduotas 3.2 pav.

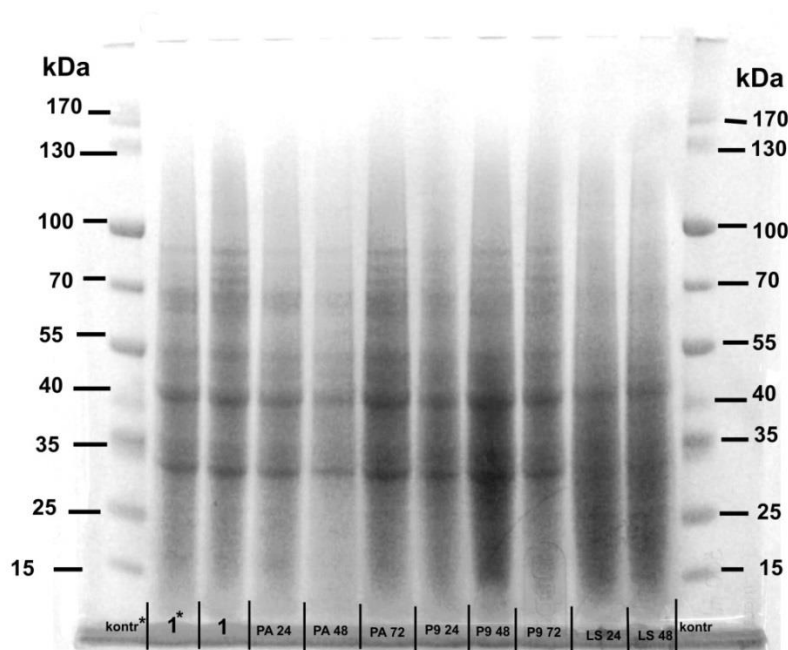


3.2 pav. KF įtaka tirpiųjų (albuminų ir globulinų) baltymų kiekiui lubinų sėklose

Iš gautų rezultatų matyti, kad vykstant KF tirpiųjų baltymų kiekis lubinuose didėja ir šis pokytis, lyginant su kontrole (be fermentacijos), didžiausias nustatytas po 72 h ir sudaro vidutiniškai 14,91 %. Po 24 h KF tirpiųjų baltymų kiekis, lyginant su kontrole, padidėjo 2,73 %, o po 48 h fermentacijos tirpiųjų baltymų prieaugis sudarė 4,75 %.

Vertinant atskirų PRB poveikį tirpiųjų baltymų kiekiui, pastebėta, kad Pp9 bakterijomis fermentuose lubinuose nustatyti po 24 h ir 48 h didžiausi tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiai, atitinkamai 3,83 % ir 8,74 %. Su kitomis PRB (Pa ir Ls) fermentuotuose lubinuose tirpiųjų baltyminių medžiagų padidėjimas pirmųjų KF etapų metu (po 24 ir 48 h) nustatytas, lyginant su kontrole, atitinkamai, 1,1 %; 1,1 % ir 3,28 %; 4,38 %. Vertinant atskirų PRB įtaką tirpiųjų baltymų susidarymui, po 72 h lyginant su 48 h KF, didžiausias jų padidėjimas fiksuotas fermentuojant lubinus su Ls (12,56 %) ir Pa (9,19 %), kai su Pp9 padidėjimas sudarė 7,54 %.

Tiriant KF įtaką lubinų baltyminių medžiagų frakcijų pokyčiams, tirtos vandenyje tirpiųjų albuminų ir šarmuose tirpiųjų glutelinų (konglutinų) frakcijos. Šių frakcijų SDS – PAGE elektroforezės metodu gauti tyrimų rezultatai pateikti 3.3 paveiksle.



3.3 pav. Fermentuotų lubinų produktų baltymų elektroforezė 6 % poliakrilamido gelyje

*0 – baltymo standartas SIGMA colorburst „Electrophoresis marker“; 1 – nefermentuoti lubinų baltymai; **nuo24 h iki 72 h P. acidilactici* 7 (Pa), *P. pentosaceus* 9 (Pp9) ir *L. sakei* 6 (Ls) bakterijomis fermentuotos lubinų sėklos ir iš jų iškirtos baltyminės medžiagos.

Pagal nustatytus atskirų baltyminių medžiagų molekulių masių pokyčius (kDa) mėginiuose (be fermentacijos ir naudojant KF fermentaciją) buvo analizuojami fermentacijos su įvairiomis PRB ypatumai. Eksperimento metu, nustatytų lubinų baltyminių medžiagų molekulinės masės, kito ribose nuo 32 kDa iki 100 kDa. Juose vyrauja baltyminės frakcijos, turinčios 32 kDa ir 40 kDa molekulinės masės.

Fiksuoti baltyminių medžiagų (BM) skirtumai fermentuotuose lubinų mėginiuose ir kontroliniame mėginyje (be fermentacijos). Kontroliniuose mėginiuose nustatytos BM frakcijos, kurių molekulinės masės sudarė 80 ir 90 kDa. Po 72 h fermentacijos, lyginant su kontrole, nustatytos mažesnės molekulinės masės BM (ribose nuo 25 iki 75 kDa) ir tokia tendencija buvo stebima su visomis tirtomis PRB. Tarpiniuose fermentacijos etapuose (po 24 h ir 48 h) išryškėjo fermentacijos su kai kuriomis PRB ypatumai. Naudojant Ls lubinų fermentacijai, lyginant su kitomis PRB (Pa ir Pp9), nustatyti didesni BM pokyčiai jau po 24 h. Fermentacijos terpėje su šia PRB nustatytos mažesnės molekulinės masės BM (25 – 45 kDa), kai su kitomis PRB tokių BM neužfiksuota. Ta pati tendencija išliko ir po 48 h fermentacijos, stebint didžiausius BM molekulinės masės pokyčius Ls fermentuotuose lubinų mėginiuose.

Literatūroje pateikiamas baltymų kiekis lubinų sėklose priklausomai nuo klimato sąlygų, veislės, naudojamų trąšų kiekio gali svyruoti nuo 24 % iki 61 % [7]. Tirtuose lubinų *Lupinus angustifolius* „Vilniai“ veislės sėklose bendras baltymų kiekis nustatytas $38,7 \pm 1\%$ s.m..

Pagal valstybinės augalininkystės tarnybos 2005 m. paskelbtą pranešimą, šios veislės lubinų sėklose bendras baltymų kiekis nustatytas mažesnis nei fiksuotas eksperimento metu ir sudarė 31,6 % s.m. [102]. Tokiems baltymų skirtumams galėjo turėti įtakos skirtingi kultivavimo metai, dirvožemis ar tręšimas.

Vykdyto eksperimento metu buvo stebimas bendro baltymų kiekio lubinų sėklose mažėjimas KF metu (72 h laikotarpyje), o tirpiųjų baltymų didėjimas. Be to, lubinų sėklose fermentacijos metu susidaro daugiau mažesnės molekulinės masės baltyminių medžiagų (< 45 kDa).

Literatūroje, vertinant fermentacijos įtaką augalinės žaliavos bendram baltymų kiekiui, pateikiami rezultatai, gauti analizuojant kakavos pupeles. Vykstant kakavos pupelių fermentacijai, baltymų kiekis po 3 parų sumažėjo nuo 28,9 % iki 28,1 %, o po 6 parų – iki 24,7 %. Šio proceso metu pasireiškia proteolitinių fermentų veikla, skaldanti baltymus iki peptidų, kurie gali būti prijungti prie fenolinių junginių polimerizacijos reakcijų metu. Be to, šis baltymų pokytis aiškinamas tuo, kad oligopeptidai geba prisijungti fermentacijos metu susidariusias laisvasias aminorūgštis [116].

Kitų autorių darbuose, baltymų sumažėjimas augalinių produktų fermentacijos metu taip pat siejamas su proteolitinių fermentų sąlygojamu hidrolizės procesu, nurodant, kad fermentacijos metu kviečiuose tirpiųjų baltymų kiekis gali padidėti iki 10 – 11 % [117].

Tiriant lubinų atskirų baltyminių medžiagų frakcijas, Garzón-de la Mora ir G. Avalos-Alcantara nustatė, kad konglutinų frakcijoje BM molekulinės masės kito ribose nuo 15 iki 75 kDa, o albuminų frakcijoje – nuo 60 iki 120 kDa [118]. Eksperimento metu gautos BM molekulinės masės kontroliniame mėginyje (be fermentacijos) kito tose pačiose ribose, kaip nurodyta šioje literatūroje.

Įvertinant apdorojimo *Aspergillus oryzae* GB-107 įtaką sojos baltymų pokyčiams, nustatyta, kad fermentacijos metu susidaro mažesnės molekulinės masės baltymai (<20 kDa), o taip pat, ilgėjant fermentacijos trukmei (48 h), mažėjo baltymų, kurių molekulinė masė didesnė nei 60 kDa [119].

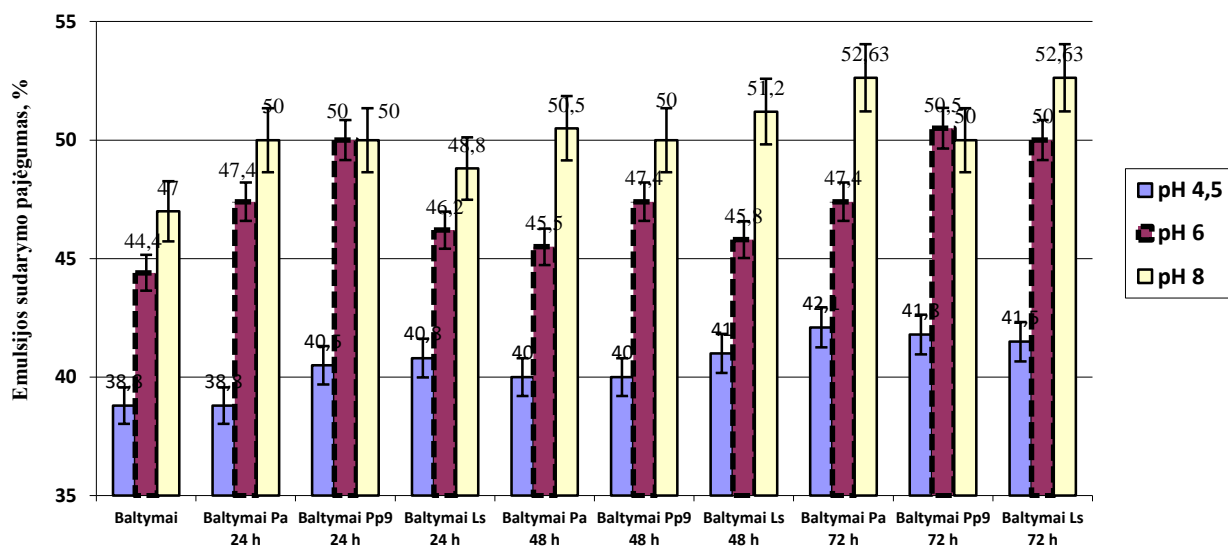
Tolesnio etapo metu tirta KF įtaka lubinų sėklų baltyminių medžiagų funkcinėms savybėms.

3.1.1 Kietafazės fermentacijos ir pH įtaka lubinų sėklų baltyminių medžiagų funkcinėms savybėms

Tyrimų eigoje analizuota KF ir pH įtaka išskirtų iš lubinų sėklų baltyminių medžiagų funkcinėms savybėms, tokioms kaip emulgavimas (emulsijos pajėgumas ir stabilumas) ir putojimas (putų susidarymo pajėgumas). Apie baltyminių medžiagų emulgavimo pokyčius (priklausomai nuo šių faktorių) buvo sprendžiama pagal emulsijų susidarymo pajėgumą ir

stabilumą (3.4 ir 3.5 pav.), o apie putų savybes - pagal putų sudarymo pajėgumą (3.6 pav.). Kaip kontrolė naudoti baltymai, išskirti iš lubinų viso dalių malimo sėklų (be KF).

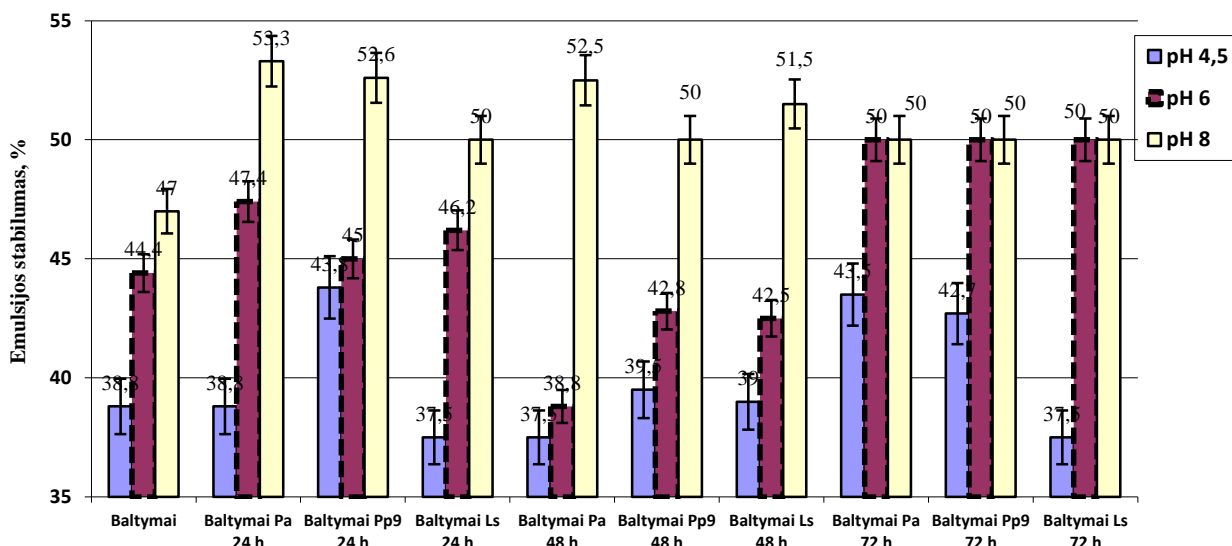
Emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas. Tiriant KF įtaką emulsijų susidarymo pajėgumui (pH 4,5), išryškėjo fermentacijos trukmės įtaka šiam parametru, fiksuojant jo verčių padidėjimą vidutiniškai 2,5 % – po 48 h ir 3,5 % – po 72 h KF (3.4 pav.).



3.4 pav. Lubinų baltyminių medžiagų emulsijos sudarymo pajėgumas, esant skirtingoms pH vertėms

Kai kuriais atvejais, išryškėjo PRB padermės įtaka emulsijų susidarymo pajėgumui (Ls po 24 h ir 48 h). Šarminant iš fermentuotų lubinų sėklų išskirtas baltymines medžiagas iki pH 6 ir pH 8, abiem atvejais emulsijos susidarymo pajėgumas didėjo ir nustatytas, lyginant su pH 4,5, vidutiniškai 14 % ir 20 % didesnis. Visais atvejais nustatytas emulsijų susidarymo pajėgumo padidėjimas, šarminant (nuo pH 4,5 iki pH 8) baltymines medžiagas, 72 h trukusioje fermentacijoje.

Analizuojant baltyminių medžiagų emulsijų stabilumą KF metu (pH 4,5), nustatyta atskirų PRB padermių įtaka šio parametro vertėms, tuo tarpu fermentacijos trukmė neturėjo įtakos emulsijų stabilumo pokyčiams. Didžiausias emulsijų stabilumas nustatytas naudojant lubinų sėklų KF Pp9 (43,8% – po 24 h ir 39,5 % – 48 h) ir Pa padermes (43,5 % – 72 h), kai kontroliniame mėginyje šio parametro vertės buvo, atitinkamai, 11,41 %; 1,77 % ir 10,8 % mažesnės.



3.5 pav. Lubinų baltyminių medžiagų emulsijos stabilumas, esant skirtingoms pH vertėms

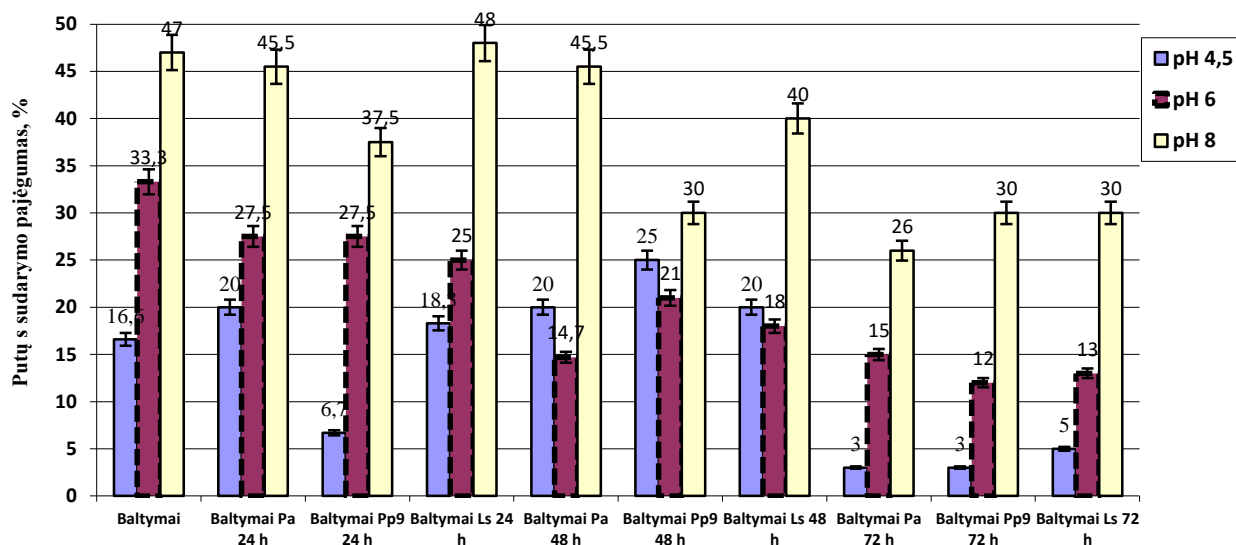
Šarminant išskirtas baltymines medžiagas iki pH 6 ir pH 8, buvo stebima tiek PRB padermės įtaka emulsijų stabilumui, tiek ir KF trukmės. Esant pH 6, po 24 h KF emulsijų stabilumo vertės kito ribose nuo 45 % iki 47,5 %, po 48 h – nuo 38,8 % iki 42,8 % ir po 72 h jos nustatytos vidutiniškai 8 % ir 18,4 % didesnės nei tiriamųjų fermentuotų mėginių ir 11,2 % didesnės nei kontrolės (be fermentacijos). PRB padermės įtaka emulsijų stabilo didėjimui stebima tik po 24 h fermentacijos (Pa) ir 48 h (Pp9). Didžiausia pH įtaka emulsijos stabilumui nustatyta, šarminant baltymines lubinų medžiagas iki pH 8 ir šio veiksnio poveikis efektyviausias buvo po 24 h ir 48 h KF, emulsijų stabilumo vertės šiais laikotarpiais buvo, lyginant su pH 4,5 ir pH 6, vidutiniškai 22,6 %; 25,5 % ir 13,2 %; 17,64 % didesnės. Pastebėta, kad po 72 h fermentacijos neaptikta skirtumų tarp mėginių, ruošų naudojant pH 6 ir pH 8. PRB padermės įtaka esant pH 8 išryškėjo (analogiškai kaip ir pH 6 atveju) po 24 h ir 48 h trukusios KF, tačiau šiuo atveju didžiausią emulsijų stabilumą rodė tiriamas mėginys, kurio KF naudota Pa padermė.

Putų sudarymo pajėgumas. Lubinų baltyminių medžiagų putų sudarymo pajėgumas pavaizduotas 3.6 pav.

Iš gautų rezultatų matyti, kad lubinų baltymų putojimo savybėms daugiausia įtakos turi pH. Šarminant fermentacijos terpę (pH nuo 4,5 iki 8), putų susidarymo pajėgumas didėjo, tačiau ne vienodu intensyvumu. Keičiant pH nuo 4.5 iki 6, putų sudarymo pajėgumas padidėjo vidutiniškai 9 %, o pH kintant nuo 6 iki 8 – šio parametro pokytis nustatytas 2 kartus didesnis ir siekė 17 %.

Pirmųjų 48 h metu fermentacija, nepriklausomai nuo naudotos PRB padermės, neturėjo neigiamos įtakos putų susidarymo pajėgumui ir išliko tokiam pačiam lygyje, kaip ir kontrolė (be

fermentacijos). Tačiau po 72 h fermentacijos, buvo stebimas šio parametro verčių mažėjimas ir ši tendencija buvo fiksuojama prie įvairių pH verčių (vidutiniškai 2,5 kartų, t.y. esant pH 4,5 – 4 kartais; pH 6 – 2 kartais; pH 8 – 1,5 kartų).



3.6 pav. Lubinų baltyminių medžiagų putų sudarymo pajėgumas, esant skirtingoms pH vertėms

Lyginant gautus rezultatus su pateiktais literatūroje, vykdyto eksperimento metu išryškėjo didesnė pH įtaka emulsijų susidarymo pajėgumui: kintant pH nuo 4,5 iki 8, emulsijos sudarymo pajėgumas didėjo nuo 40 % iki 53 %. Pagal literatūrą, didėjant pH nuo 4 iki 8, emulsijos sudarymo pajėgumas kito nuo 51 % iki 53,4 % [106]. Tiriant putų susidarymo pajėgumą, kintant pH šarminės reakcijos link (nuo 4,5 iki 8), putų susidarymas taip pat didėjo (26 %). Pasitvirtinantys teiginiai vyrauja ir literatūroje, tačiau šio parametro verčių pokytis priklausomai nuo pH kitimo ribų (4,5 – 8) buvo didesnis ir sudarė 37 % [106].

Toks ryšys tarp pH pokyčių šarminant ir putų susidarymo didėjimo siejamas su galimu skirtingu baltymų tirpumu. Pagal Kwon [120] putų susidarymo efektyvumui įtakos turi du faktoriai: (i) baltymų tirpumas ir (ii) baltymų struktūriniai pokyčiai. Kai pH priartėja prie baltymų izoelektrinio taško, keičiasi sistemoje veikiančios elektrostatinės jėgos ir jos būna minimalios. Baltymai šiame taške yra ne tokie tirpūs, jų molekulės linkusios mažiau išsivynioti ir tai turi įtakos paviršiaus įtempimo padidėjimui. Tokiu būdu, mažiau baltymų adsorbuojasi ant putų burbuliukų paviršiaus ir tai sąlygoja putų susidarymo sumažėjimą. Iš kitos pusės, pH poslinkis šarminės pusės link, sąlygoja elektrostatiinių jėgų padidėjimą, baltymų molekulės linkusios sudaryti tarpusavyje stipresnius ryšius ir tai turi įtakos geresniam baltymų putų susidarymui [120].

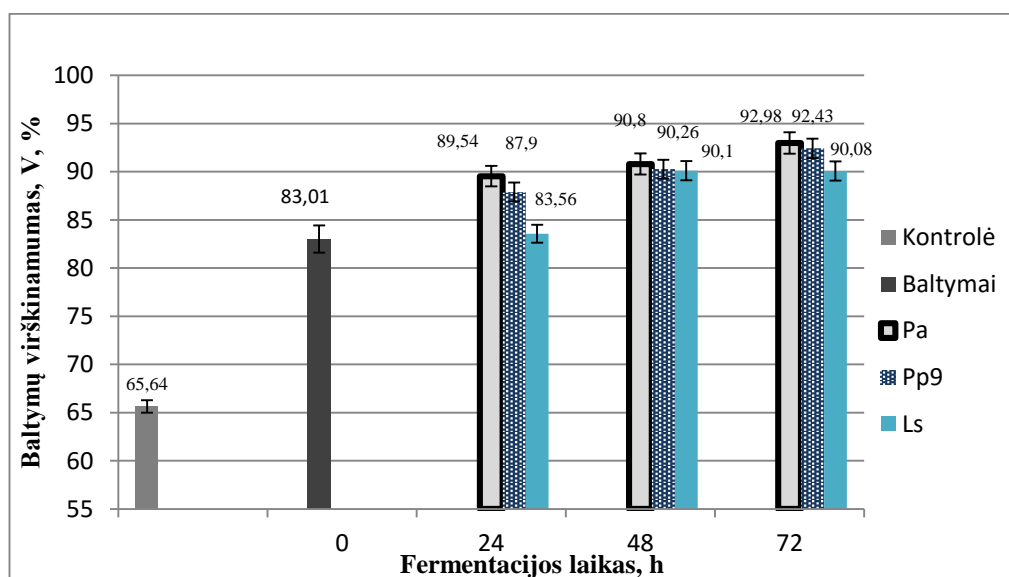
Panašiai aiškinamas ir emulsijos sudarymo pajėgumo verčių didėjimas, šarminant baltymų tirpalus. Kai baltymo molekulės pH priartėja prie izoelektrinio taško, molekulių tirpumas sumažėja dėl aukščiau aprašytų priežasčių, tuo tarpu šarminant baltymų tirpalus, hidrofobinės

(lipofilinės) grupės yra nukreipiamos į baltymo molekules išorinę pusę, kurios lengviau prijungia riebalų daleles, taip padidindamos emulsijos sudarymo pajėgumo vertes [121].

3.1.2 Baltymų virškinamumo ir proteazių inhibitorių aktyvumai

Fermentacijos įtaka lubinų baltymų pasisavinamumui vertinta analizuojant baltymų *in vitro* virškinamumą ir proteazių inhibitorių aktyvumą (3.7 ir 3.8 paveikslai).

Baltymų *in vitro* virškinamumas lubinų baltyminių medžiagų mėginiuose, apdorotuose KF, nustatytas vidutiniškai 6,4 % didesnis nei kontroliniuose mėginiuose, ruoštuose be fermentacijos (3.7 pav.).



3.7 pav. KF įtaka lubinų baltyminių medžiagų *in vitro* virškinamumui

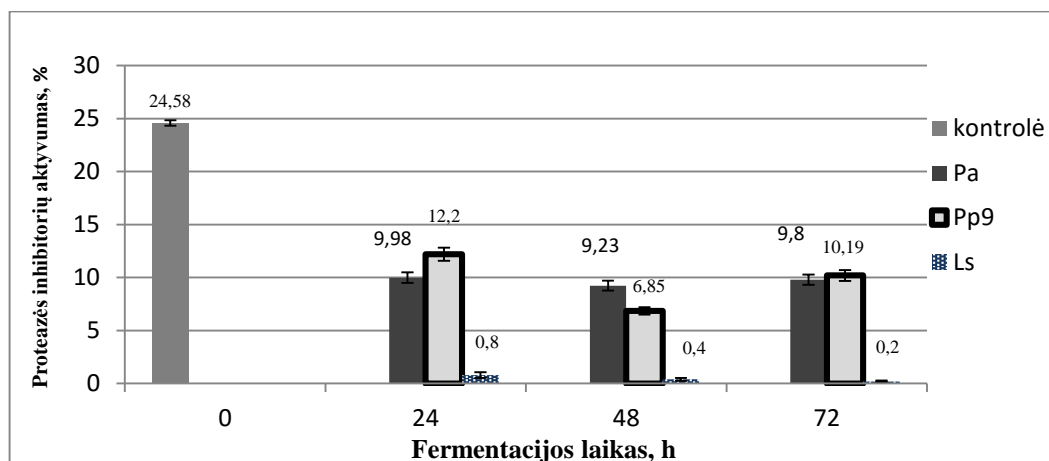
Baltymų virškinamumui taip pat turėjo įtakos ir fermentacijos trukmė: didėjant fermentacijos trukmei baltymų virškinamumas kito ribose nuo 87,00 % iki 91,83 %, tačiau skirtingu prieaugio intensyvumu. Didžiausias baltymų virškinamumo padidėjimas (4 %) nustatytas po 24 h KF. Tolesnės fermentacijos metu (po 48 ir 72 h) šio parametro pokyčių vertės buvo mažesnės ir sudarė, atitinkamai, 3,36 % ir 1,74 %, lyginant su 24 h ir 48 h fermentuotais mėginiais.

Pastebėta, kad baltymų virškinamumas priklauso ir nuo KF naudotos PRB padermės. Pa paderme fermentuotuose mėginiuose nustatytos visos fermentacijos metu (po 24 h, 48 ir 72 h) didžiausios baltymų virškinamumo vertės, kurios sudarė, atitinkamai, 89,54 %, 90,8 % ir 92,98 %. Skirtingai nei su Pa paderme, Ls fermentuotuose mėginiuose visais fermentavimo tarpsniais aptiktos 6,6 %; 0,77 % ir 3,11 % mažesnės baltymų virškinamumo vertės. Lubinų mėginiuose, fermentuotuose su Pp9 paderme, nustatytos baltymų virškinamumo vertės užėmė tarpinę padėtį ir kito fermentacijos metu nuo 87,9 % iki 92,43 %.

Tolesnio darbo etapo metu tirtas proteazių inhibitorių baltymuose aktyvumas.

Proteazių inhibitorių baltymuose aktyvumas vertintas, analizuojant proteazių aktyvumo pokyčius sistemose su tiriamais lubinų baltymais. Gauti tyrimų rezultatai lyginti su proteazių aktyvumo tyrimais be inhibitorių priedų.

Proteazių inhibitorių aktyvumas, pridėjus fermentuotų lubinų baltymų į mėginį, pavaizduotas 3.8 pav., kontrolė - nefermentuoti lubinų baltymai.



3.8 pav. KF įtaka proteazių inhibitorių aktyvumui

Iš gautų rezultatų matome, kad lubinų baltymai be KF apdoravimo daugiausiai slopino proteazės aktyvumą (24,58 %) ir pasižymėjo didžiausiu inhibitoriniu poveikiu. KF visais atvejais slopino inhibitorių aktyvumą, kuris sumažėjo vidutiniškai nuo 12,2 % iki 0,2 %. Didžiausias fermentacijos efektas pastebėtas po 48 h (5,48 %), kai tolesnės KF metu šio parametro vertės reikšmingai nekito.

Paminėtina, kad PRB padermė turi reikšmingą įtaką proteazių inhibitorinio aktyvumo sumažėjimui. Išskirtiniu proteazių inhibitorių aktyvumo slopinimu pasižymėjo Ls padermė (0,2 – 0,8 %), kai kitų PRB poveikis nustatytas mažesnis ir sudarė, atitinkamai, 9,67 % ir 9,75 %.

Gauti tyrimų rezultatai lyginami su kitų tyrėjų darbais, kuriuose tirti KF sąlygose (45% drėgmė, Pa, Pp9 ir Ls PRB) sojų ir lubinų *in vitro* virškinamumo didėjimo pokyčiai [87]. Didžiausias lubinų baltymų virškinamumas nustatytas, fermentuojant sėklas su Pp9, o mažiausias – su Pa paderme (užfiksuotos 6 % mažesnės vertės, nei Pp9), kai šio eksperimento metu Pa PRB paderme fermentuoti baltymai pasižymėjo didžiausiomis baltymų virškinamumo vertėmis.

Šių autorių darbe [87], po fermentacijos, lyginant su kontrole, bendras lubinų baltymų virškinamumas padidėjo 18,3 % o sojų 15,9 %. Kontrolinio mėginio (lubinų baltymų be fermentacijos) virškinamumas užfiksuotas 72,56 %.

Šio eksperimento metu lubinų baltymų virškinamumas padidėjo vidutiniškai 8 – 9 %, o kontrolėje (be fermentacijos) baltymų virškinamumas nustatytas 10,45 % didesnis, nei autorių publikuotuose rezultatuose.

Virškinamumo padidėjimas, fermentacijos procesuose, aiškinamas tirpiųjų baltymų kiekio padidėjimu, kurie yra lengviau pasisavinami žmogaus skrandžio fermentų. Taip pat galimi sudėtingų baltymų struktūrų pokyčiai, susiję su baltymų molekulių masių mažėjimu ir lengvesniu skrandžio fermentų pasisavinimu [122].

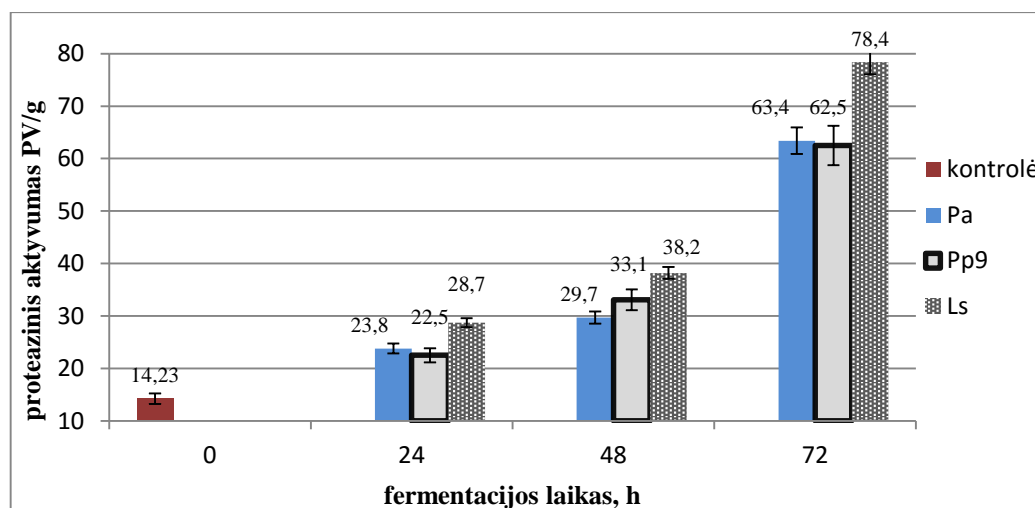
Literatūroje pateikti tyrimų rezultatai, gauti tiriant fermentacijos įtaką sorų inhibicinių medžiagų aktyvumo pokyčiams. Po 24 h sorų fermentacijos nustatytas tripsino inhibicinio aktyvumo sumažėjimas (9 %) aiškinamas tuo, kad vykstant fermentacijai suskaidomos inhibiciniu poveikiu pasižyminčios baltyminės medžiagos [123]. Tendencijos išlieka ir šio eksperimento metu, kadangi užfiksuotas fermentuotų lubinų inhibicinio aktyvumo žymus sumažėjimas.

3.2 Fermentinių aktyvumų pokyčiai lubinų produktuose kietafazės fermentacijos sąlygose

Šiame skyriuje pateikti proteazių, amilazių ir ksilanazių aktyvumų pokyčiai, nustatyti lubinų produktuose KF sąlygose (3.9 pav.; 3.10 pav.; 3.1 lentelė). Gauti rezultatai lyginti su kontrole – lubinų viso dalių malimo sėklomis be fermentinio apdorojimo.

3.2.1 Proteazių aktyvumai

Lubinų sėklose (be fermentacijos) proteazinis aktyvumas nustatytas $14,23 \pm 3$ % PV/g. Iš gautų rezultatų (3.9 pav.) matome, kad lubinų produktų KF metu proteaziniai aktyvumai visuose mėginiuose didėjo. Tiriamuose mėginiuose, po 24 h KF, lyginant su kontrole, proteazinis aktyvumas lubinų produktuose padidėjo vidutiniškai 1,78 karto, po 48 h KF – 2,4 karto, o po 72 h KF – 4,83 karto.

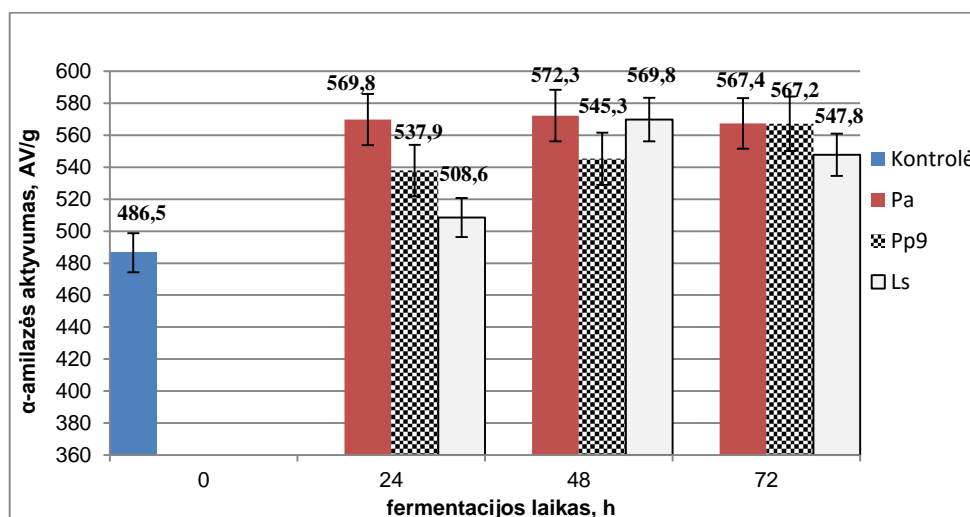


3.9 pav. KF įtaka lubinų sėklų proteaziniams aktyvumams

Vertinant atskirų PRB padermių įtaką proteazinių fermentų aktyvumui, užfiksuota, kad Ls paderme fermentuoti lubinų produktai pasižymėjo didžiausiomis šio parametro vertėmis visuose tirtuose KF etapuose. Ls paderme fermentuotuose lubinuose, lyginant su kitomis naudotomis padarmėmis (Pa ir Pp9), po 24 h fermentacijos proteazinis aktyvumas nustatytas vidutiniškai 17,07 % ir 21,6 % didesnis, po 48 h KF – 21,47 % ir 13,16 %, o po 72 h KF – 19,2 % ir 20,91 %, atitinkamai. Tarp kitų Pa ir Pp9 PRB reikšmingų skirtumų tiriant proteazinius aktyvumus KF metu nenustatyta.

3.2.2 Amilazių aktyvumai

Iš pateiktų rezultatų (3.10 pav.) matome, kad fermentacijos metu, lyginant su kontrole, fiksuojamas α -amilazių aktyvumų didėjimas, kuris po 24 h fermentacijos vidutiniškai sudarė 10,47 %, po 48 h – 15,22 %. Tolesnės fermentacijos metu (po 72 h) α -amilazių aktyvumai nekito ir prilygo po 48 h fermentacijos nustatytoms vertėms (560,8 AV/g).



3.10 pav. KF įtaka lubinų sėklų α -amilazių aktyvumui

Vertinant atskirų PRB padermių įtaką α -amilazės aktyvumui, didžiausias padidėjimas po 24 h užfiksuotas naudojant Pa paderme lubinų fermentacijai (17 %). Tolimesniame fermentacijos tarpsnyje (po 48 h), Pa fermentuotose lubinuose α -amilazių aktyvumai nepadidėjo. Tuo metu reikšmingas fermentinių aktyvumų padidėjimas (tarpsnyje nuo 24 h iki 48 h) fiksuotas Ls fermentuotame produkte (12,03 %). Pp9 fermentuotuose lubinuose, tiek po 24 h, tiek ir po 48 h fermentacijos, stebimas fermentinių aktyvumų padidėjimas, lyginant su kontrole, atitinkamai 9,5 % ir 10,82 %. Tačiau šie pokyčiai po 24 h ir 48 h, lyginant su Pa paderme, buvo mažesni ir sudarė 5,62 % ir 4,7 %. Fermentuojant mėginius iki 72 h, amilazinių aktyvumų reikšmingo padidėjimo nei su viena PRB nenustatyta.

Tokiu būdu, KF metu stebima PRB padermės įtaka α -amilazių aktyvumams: Pa paderme fermentuotų mėginių vidutinė α -amilazės aktyvumo vertė užfiksuota 569,6 AV/g, o Pp9 ir Ls fermentuotuose mėginiuose šios vertės buvo vidutiniškai 3,44 % ir 4,81 % mažesnės.

3.2.3 Ksilanazių aktyvumai

KF po 24 h sąlygojo ksilanazių aktyvumų padidėjimą (vidutiniškai 34,1 %), lyginant su kontrole – lubinų viso dalių malimo sėklomis be fermentacijos (7,25 KV/g), ir ši tendencija buvo stebima su visomis tirtomis PRB padermėmis.

3.1 lentelė. Lubinų sėklų ksilanazinis aktyvumas KF salygoje

| Fermento ksilanazės aktyvumas, KV/g | Pa* | | | Pp9* | | | Ls* | | |
|-------------------------------------|---------------|------|------|---------------|------|------|--------------|------|------|
| | 24h | 48 h | 72 h | 24 h | 48 h | 72 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| 1.KF* | 13,17± 5 % | - | - | 12,00± 5 % | - | - | 8,01± 5 % | - | - |

*nuo 24 h iki 72 h *pediococcus acidilactici* 7 (PA), *pediococcus pentosaceus* 9 (PP9) ir *lactobacillus sakei* 6 (LS) bakterijomis fermentuotos lubinų sėklos

1. Kietafazės fermentacijos įtaka lubinų sėklų ksilanazių aktyvumui

Tolesnės fermentacijos metu (48 h ir 72 h), lubinų produktuose jau nebuvo aptikta ksilanazinių aktyvumų.

Gauti proteazių ir amilazių aktyvumų rezultatai, rodantys, kad fermentiniai aktyvumai didėja fermentacijos metu, sutampa su pateikta literatūroje informacija. Proteazinis aktyvumas fermentacijos metu (po 48 h) kito ribose nuo 75,6 (Pp9) – 90,2 AU/g (Ls), o proteolitiškai aktyviausia PRB nustatyta Ls padermė. Taip pat α -amilazinis aktyvumas kito - nuo 106.5 AU/g iki 552.0 AU/g ir šie pokyčiai priklausė nuo PRB padermės [18]. Vykdyto eksperimento metu tendencijos išlieka tokios pačios, nes tiek amilazinis, tiek ir protezinis aktyvumas fermentuotuose lubinų produktuose didėjo.

Gauti tyrimų rezultatai duoda vertingą informaciją apie galimybę gerinti kvietinių kepiinių su fermentuotais lubinų priedais kokybę. Reikia atkreipti dėmesį, kad pridintos amilazinio aktyvumo vertės gali sąlygoti krakmolo hidrolizę ir padidintą dekstrinų susidarymą. Didesni proteazių aktyvumai gali padidinti tirpiųjų baltymų susidarymą ir taip pat turėti neigiamos įtakos tešlos reologinėms savybėms. Pastebėta, kad tirtos PRB pasižymi skirtingu fermentiniu aktyvumu: Pa padermė pasižymėjo didžiausiu amilaziniu ir ksilanaziniu aktyvumu, o Ls – proteaziniu. Tokiu būdu, kvietinių kepiinių gamybai reikėtų atrinkti PRB padermes priklausomai nuo kvietinių miltų kepimo savybių [124]. Kvietiniams miltams, pasižymintiems aukštomis kritimo skaičiaus vertėmis (300 s ir daugiau), reiktų parinkti lubinų fermentuotų produktų gamybai PRB, pasižyminčias didesniu amilaziniu aktyvumu. PRB padermes, kurios pasižymi

didesniu proteaziniu aktyvumu, tikslinga būtų naudoti ruošiant kvietinius kepinus iš miltų su dideliu baltymų kiekiu ir stipriu glitimu [125].

Nurodytų technologinių problemų sprendimui, prasminga būtų išbandyti ultragarsinį apdorojimą, įvertinant jo galimą poveikį fermentaciniams procesams, pradedant nuo žaliavos apdorojimo.

3.3 Ultragarsinio poveikio įtaka lubinų sėklų sudėčiai ir technologinėms savybėms kietafazės fermentacijos sąlygose

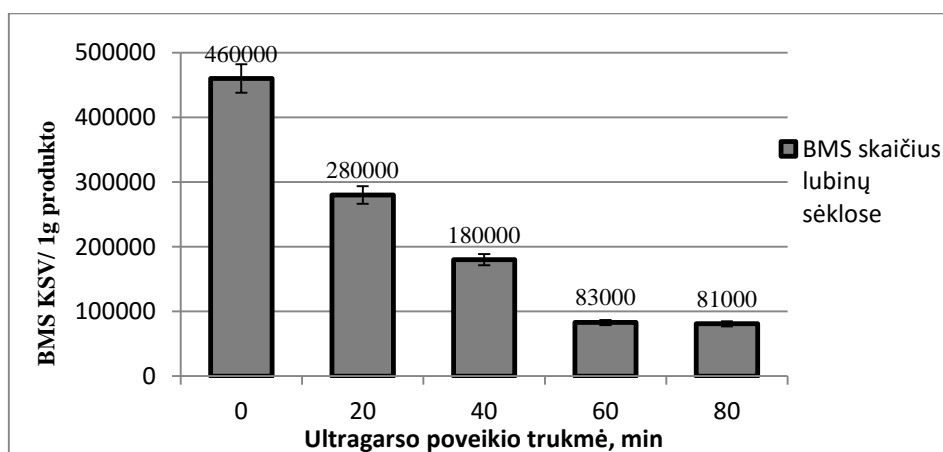
Tiriant ultragarsinio poveikio panaudojimo galimybes KF procesuose, eksperimentas vykdytas keliais etapais: (i) įvertinant ultragarsinio apdorojimo įtaką mikrobiologiniam terpės užterštumui; (ii) baltyminių medžiagų pokyčiams; (iii) fermentiniams aktyvumams.

Tokiu būdu, šiame darbo etape pagrindinis dėmesys buvo skirtas ultragarso panaudojimui kombinacijoje su fermentaciniais procesais. Ypatingas dėmesys skirtas optimalios ultragarsinio poveikio trukmės parinkimui.

3.3.1 Ultragarsinio apdorojimo įtaka lubinų mikrobiologinės taršos mažinimui

Fermentacijos terpėje pašalinė mikroflora turi labai svarbią įtaką KF procesui ir gali iškreipti fermentacijos procesą. Tai gali būti susiję su nepageidaujamų metabolitų susidarymu, kai pagrindines kultūras užvaldo nepageidaujami mikroorganizmai. Šiame etape pagrindinis dėmesys skirtas ultragarsinio poveikio įvertinimui bendram mikroorganizmų skaičiui (BMS) lubinų sėklose

BMS tyrimų rezultatai lubinų produktuose, paveiktuose ultragarsiniu poveikiu skirtingą trukmę (20, 40, 60 ir 80 min) pateikti 3.11 paveiksle.



3.11 pav. Ultragarsinio poveikio trukmės įtaka lubinų sėklų BMS

Kontroliniame lubinų mėginyje BMS nustatytas 460000 KSV/1 g produkto. Ultragarso poveikis mažina bendrą mikroorganizmų skaičių (BMS) ir šis efektas didėjo, ilgėjant ultragarsinio apdorojimo trukmei. Po 20 min trukusio lubinų apdorojimo ultragarsu, BMS

lubinų miltų sėklose nustatytas 40 % mažesnis nei kontrolėje, po 40 min – 61 %. Didžiausias BMS sumažėjimas (lyginant su kontrole – be apdoravimo) fiksuotas, apdorojant lubinus 60 min ultragarsu (5,5 kartų) ir nepakito, išliekant mažiausioms BMS vertėms ir po 80 min trukusio ultragarsinio apdoravimo ($8,1 \times 10^4$ KSV/1 g).

Atlikti tyrimai rodo reikšmingą ultragarsinio poveikio įtaką fermentacijos terpės mikrobiologinės taršos mažinimui, tuo užtikrinant stabilią fermentacijos proceso eigą. Tyrimai rodo, kad svarbu parinkti optimalią ultragarsinio apdoravimo trukmę, kuri sąlygotų didžiausią BMS sumažėjimą. Šio eksperimento metu, didžiausias BMS sumažėjimas pasiektas naudojant 60 min trukusį ultragarsinį poveikį. Tolesnio darbo etapuose tokia laiko trukmė buvo veikiami visi KF ruošiami lubinų mėginiai.

Literatūroje teigiama, kad aukšto dažnio bangos (>24kHz) geba naikinti įvairius mikroorganizmus, įskaitant ir patogenines bakterijas. Šis reiškinys aiškinamas ultragarso efektu naikinti pašalinę mikroflorą [126].

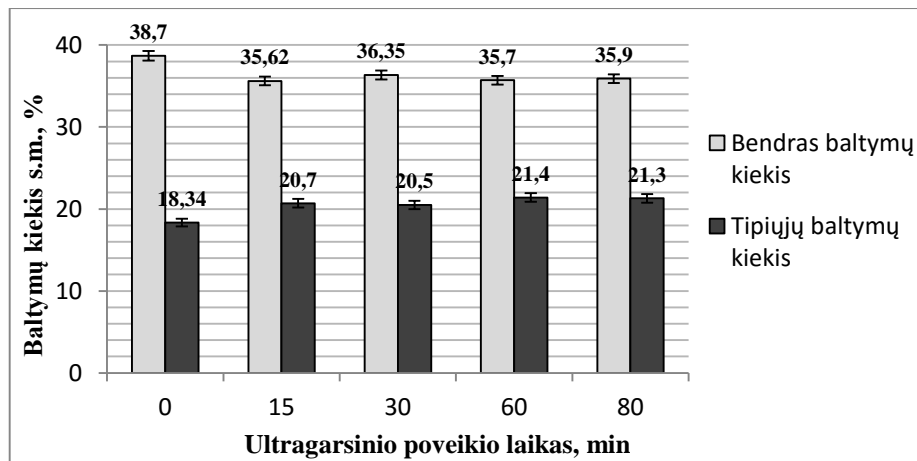
Atliktų ultragarsinių bandymų, siekiant išvalyti nuotekas [127], tyrimų rezultatai įrodė, kad šiuo poveikiu galima sunaikinti gramteigiamas bakterijas (pvz., *Clostridium perfringens*). Kiti tyrimai patvirtina, kad veikiant ultragarsu, galima sunaikinti ir gramneigiamas bakterijas (pvz., *Escherichia coli*) [128]. Įrodyta, kad gramneigiamos bakterijos yra jautresnės ultragarso poveikiui, nes jų membranos yra plonesnės (mažiau peptidoglikano) ir jos lengviau pažeidžiamos ultragarso bangų [99].

Gauti rezultatai leidžia manyti, kad ultragarso bangos yra perspektyvus metodas, siekiant sunaikinti patogenines bakterijas ir maistinėse sistemose.

3.3.2 Bendro baltymų kiekio ir tirpiųjų baltymų analizė

Kadangi lubinų produktai priskiriami baltymingai augalinei žaliavai ir su baltymais siejama tiek maistinė produkto vertė, tiek ir technologinės savybės, šiame etape buvo vertinta ultragarsinio poveikio įtaka žaliavos (be KF) baltyminių medžiagų pokyčiams (3.12 pav.) ir paveiktiems KF (3.13 pav. ir 3.14 pav.), palaikant pastovias apdoravimo ultragarsu sąlygas (60 min, 37 kHz, 18-20 °C temp.).

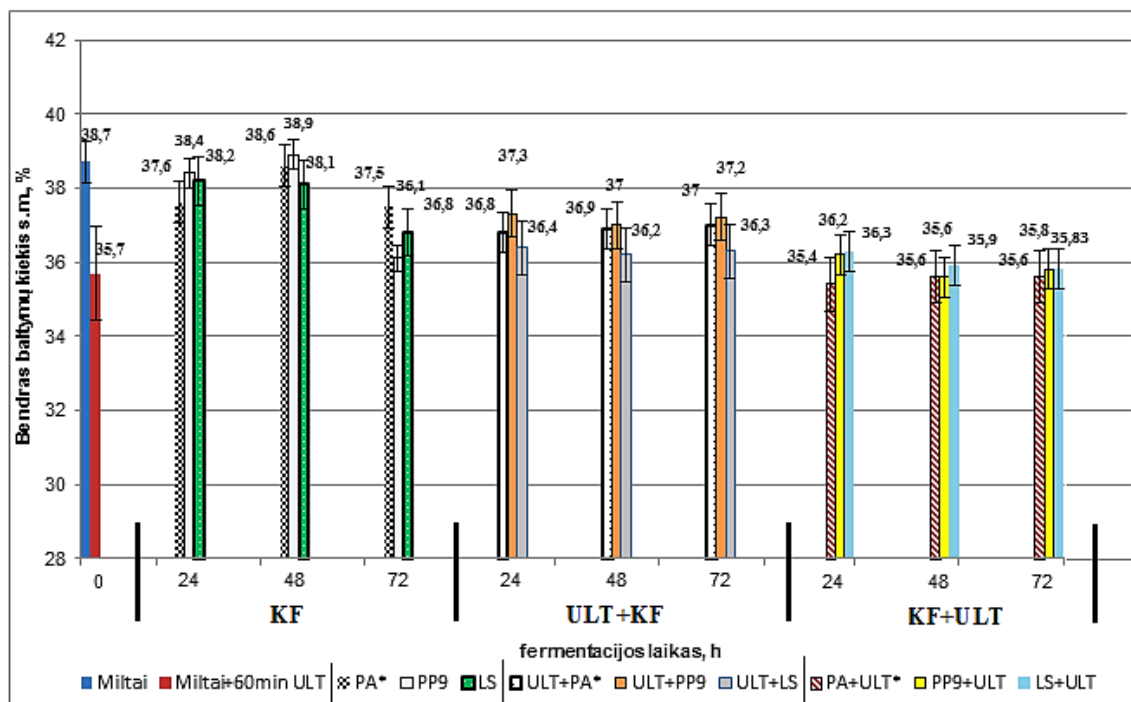
Iš gautų rezultatų (3.12 pav.) matyti, kad lubinų sėklas, paveikus 15 min ultragarsu, tirpiųjų baltymų kiekis padidėjo nuo 18,34 % iki 20,7 % s.m. (11,4 %). Ilgėjant ultragarsinio poveikio trukmei (> 30 min), tirpiųjų baltymų kiekis reikšmingai nekito.



3.12 pav. Ultragarsinio poveikio įtaka lubinų sėklų bendram ir tirpiųjų baltymų kiekiui

Tiriant ultragarsinio apdorojimo įtaką bendram baltymų kiekiui įvairiai apdorotuose lubinuose (kontrolėje ir su KF), nustatytos kitos tendencijos (3.12 pav.). Pirmųjų 15 min apdorojimo metu stebima bendrojo baltymų kiekio lubinuose (be fermentacijos) mažėjimo tendencija (~3 %), tačiau tolesnio apdorojimo metu šio parametro vertės reikšmingai nekito.

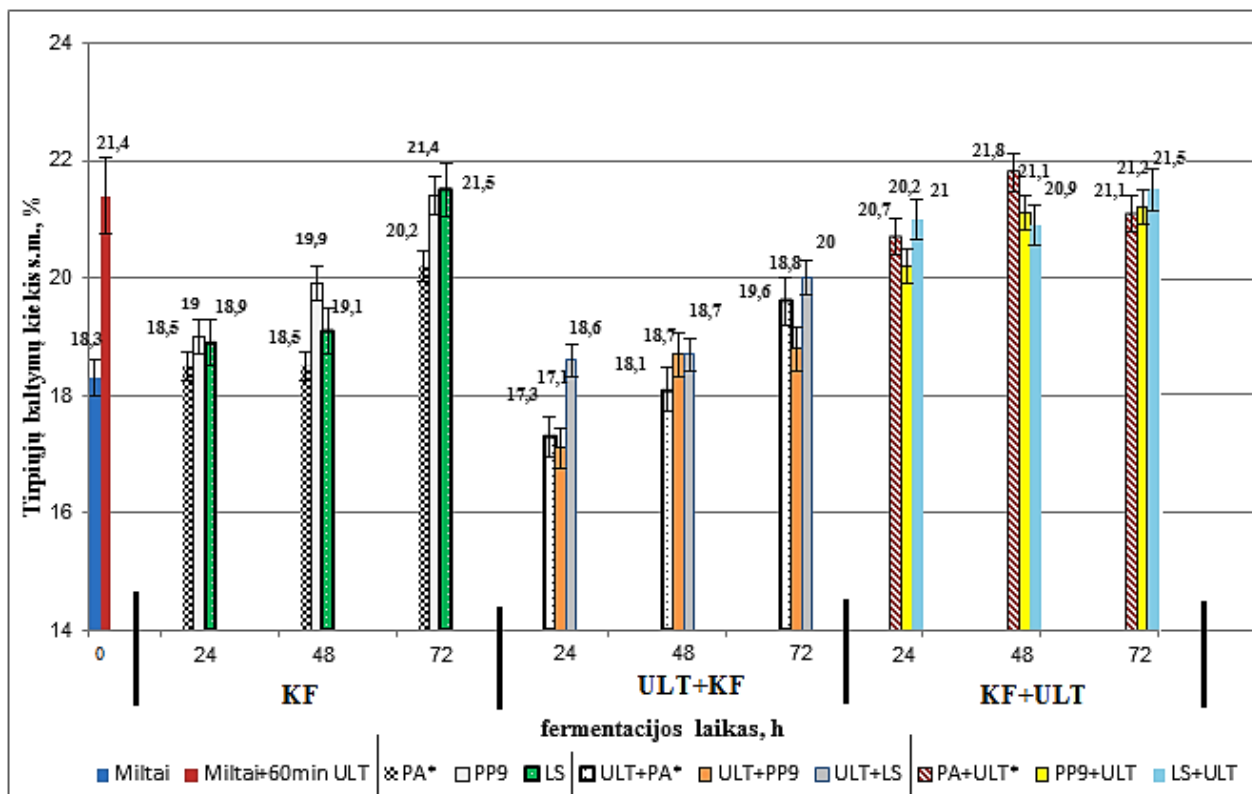
Veikiant lubinus ultragarsu prieš fermentaciją (ULT+KF mėginiai) ir po fermentacijos (KF+ULT mėginiai), bendras baltymų kiekis lubinuose mažėjo, kaip ir vykdant, vien tik KF (be ultragarsinio poveikio), tačiau skirtingu intensyvumu (3.13 pav.). Daugiausiai bendras baltymų kiekis sumažėjo sistemose (~6,9 %), paveiktose ultragarsu po fermentacijos (KF+ULT mėginiai). Veikiant lubinų produktus ultragarsu prieš fermentaciją (ULT+KF mėginiai), nustatytas bendro baltymų kiekio sumažėjimas buvo analogiškas šio parametro pokyčiui, gautam be ultragarsinio apdorojimo (tik naudojant KF po 72 h).



3.13 pav. Ultragarsinio poveikio įtaka lubinų sėklų baltymų pokyčiams KF salygoje

Ultragarsinio poveikio įtaka lubinų tirpiųjų baltymų pokyčiui KF sąlygose pavaizduoti 3.14 paveiksle.

Tirpiųjų baltymų pokytis ultragarsinio poveikio įtakoje nustatytas priešingas nei bendro baltymų kiekio kitimui, t.y. mažėjant bendram baltymų kiekiui, tirpiųjų baltymų kiekiai didėja. Tirpiųjų baltymų kiekio padidėjimas (14,49 %) fiksuotas didesnis, veikiant ultragarsu žaliavinius lubinus (be fermentacijos). Ultragarso poveikis KF metu tirpiųjų baltymų padidėjimui (6 %) mėginiuose (ULT+KF), apdorotuose prieš fermentaciją ultragarsu, lyginant su kontrole – žaliaviniais lubiniais be KF, išryškėjo tik galinės fermentacijos stadijos metu (po 72 h). Esant trumpesnei fermentacijos trukmei (24 h ir 48 h), reikšmingo tirpiųjų baltymų kiekio padidėjimo, veikiant ultragarsu lubinus prieš KF, nenustatyta. Visais KF etapais reikšmingesnis ultragarso poveikis tirpiųjų baltymų padidėjimui (vidutiniškai 13,27 %) išryškėjo mėginiuose, apdorotuose ultragarsu po KF (KF+ULT mėginiai), ir jos prilygo tirpiųjų baltymų kiekio padidėjimui, nustatytam žaliavinius lubinus paveikus ultragarsu. Pažymėtina, kad maksimalios tirpiųjų baltymų vertės, pasiektos šiuose mėginiuose jau 48 h KF, tolesnės fermentacijos metu nekito.



3.14 pav. Ultragarsinio poveikio įtaka lubinų sėklų tirpiųjų baltymų pokyčiams KF sąlygose

Gauti tyrimų rezultatai sutampa su kitų tyrėjų literatūroje paskelbtais duomenimis, kad veikiant ultragarsu (40 kHz, 15 min) išrūgų baltymus taip pat fiksuojamas tirpiųjų baltymų kiekio didėjimas, kuris sudarė 18,2 % [129].

Be to, paskelbti tyrimų rezultatai, gauti veikiant ultragarsu (40 kHz, 30 min) sojų baltymų izoliatus. Šiuo atveju taip pat konstatuotas tirpiųjų baltymų padidėjimas, kuris sudarė vidutiniškai nuo 64,3 iki 78 % [89]. Veikiant ultragarsu tiek žaliavinius lubinus prieš fermentaciją, tiek ir įvairiuose fermentacijos tarpsniuose, nustatyti mažesni tirpiųjų baltymų kiekio padidėjimai nei skelbiami publikacijose. Tai galima paaiškinti šiame eksperimente naudotu mažesniu ultragarsinės įrangos dažniu (37 kHz). Be to, įtakos galėjo turėti ir žaliavos savitumai.

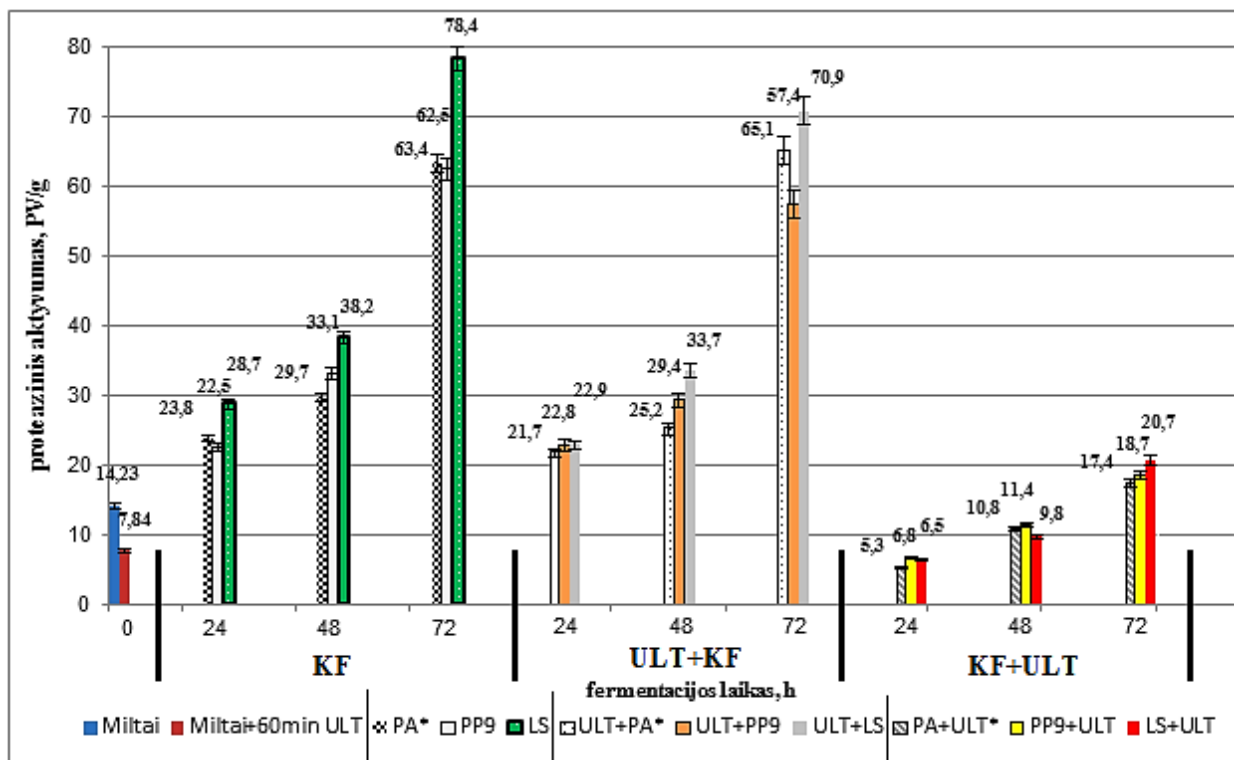
Ultragarso geba didinti baltymų tirpumą aiškinama tuo, kad ultragarso metu susidaro kavitaciniai oro burbuliukai (oro ertmės), kurios ultragarsu paveiktoje sistemoje sukuria slėgį ir šlyties jėgą. Šis faktorius skatina baltymų hidrolizę, o susidariusios hidrofilinės aminorūgštys orientuojasi vandens molekulių link skatindamos baltymų tirpumą [130]. Kiti autoriai padidėjusį baltymų tirpumą, apdorojant juos ultragarsu, aiškina tuo, kad kavitacijos metu baltymų molekulėse padidėja laisvųjų sulfhidrilinių grupių, taip sumažindamos hidrofobines baltymo savybes [131]. Iš gautų tyrimų rezultatų matyti, kad ultragarso poveikis turi įtakos fermentaciniam procesui ir fermentų aktyvumui.

3.3.3 Ultragarsinio poveikio įtaka fermentiniams aktyvumams lubinų produktuose kietafazės fermentacijos sąlygose

Ultragarso poveikis fermentų aktyvumui vertintas pagal proteazių, amilazių ir ksilanazių aktyvumus žaliaviniuose lubinuose (kontrolė) ir lubinų produktuose KF sąlygose. KF atveju lubinių produktai buvo veikiami prieš fermentaciją (ULT+KF) ir mėginiai (KF+ULT) po atskirų fermentacijos stadijų (24 h, 48 h ir 72 h).

3.3.3.1 Proteazių aktyvumai

Ultragarsu paveiktų lubinų sėklų proteazinio aktyvumo KF sąlygose tyrimų rezultatai pateikti 3.15 paveiksle. Žaliavinių lubinų sėklose be ultragarsinio poveikio proteazinis aktyvumas nustatytas 14,23 % PV/g. Paveikus juos 60 min ultragarsu (37 kHz), šio parametro vertė sumažėjo beveik 2 kartus (7,84 PV/g), lyginant su nepaveiktu ultragarsu lubinų mėginiu.



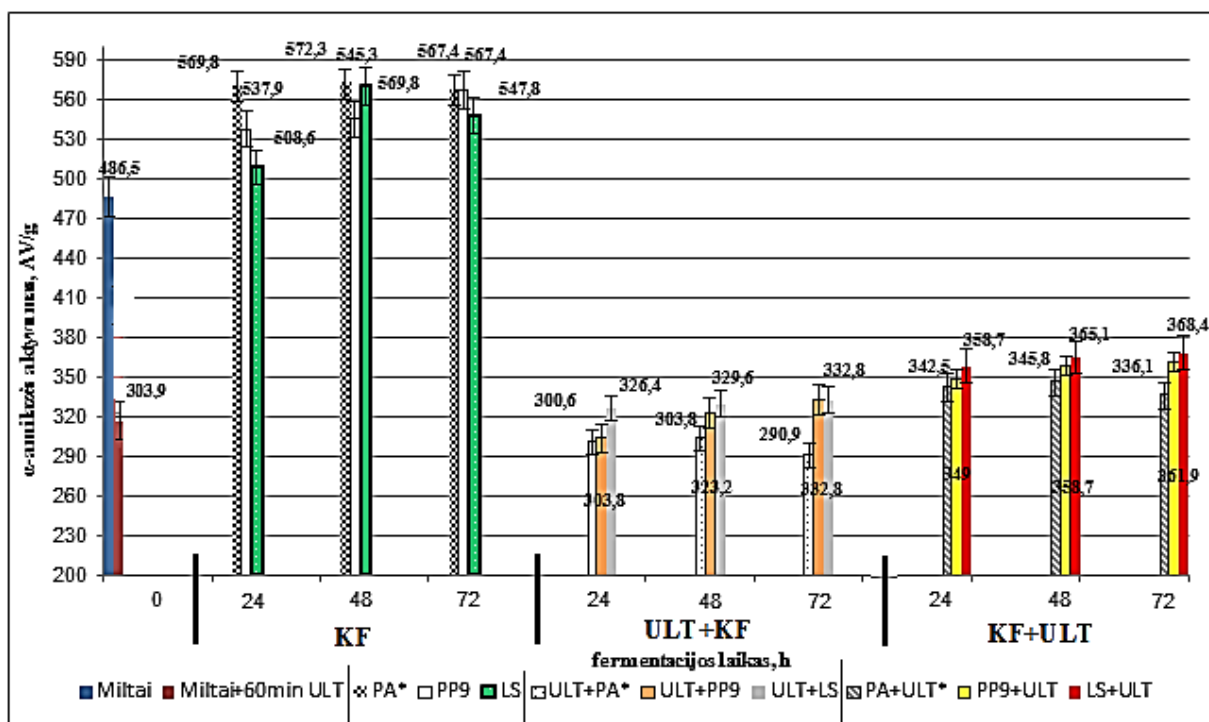
3.15 pav Lubinų sėklų proteazinis aktyvumas paveikus jas ultragarsiniu poveikiu KF sąlygose

Be to, išryškėjo ultragarso inhibicinis poveikis proteazėms ir KF metu, paveikiant juo fermentuotus lubinų mėginius (KF+ULT). Po 24 h trukusios KF+ULT mėginių fermentacijos, proteazinis aktyvumas sumažėjo, lyginant su fermentuotais ir nepaveiktais ultragarso mėginiais (KF), vidutiniškai 4 kartus, po 48 h fermentacijos – 3,3 karto, o po 72 h – 3,7 karto.

Ultragarsu paveiktų lubinų produktuose prieš KF (ULT+KF mėginiai) proteazių aktyvumas buvo vidutiniškai 3 kartus didesnis nei veikiant ultragarsu fermentuotus lubinus (KF+ULT), tačiau fiksuotas mažesnis nei naudojant vien tik KF lubinų produktų ruošimui. Pastaroji tendencija išryškėjo visais fermentacijos proceso tarpsniais: po 24 h fermentacijos proteazių aktyvumo sumažėjimas nustatytas – 10,28 %; po 48 h – 13,94 %; po 72 h – 5,56 %.

3.3.3.2 Amilazių aktyvumai

Amilazių aktyvumai tirti mėginiuose, ruoštuose sąlygose, kurios taikytos vertinant proteazių aktyvumą (3.16 pav.)



3.16 pav. Lubinų sėklų α -amilazinis aktyvumas paveikus jas ultragarsiniu poveikiu KF sąlygose

Ultragarsinis apdorojimas prieš KF (ULT+KF) turėjo didesnę įtaką α -amilazių aktyvumų sumažėjimui nei veikiant ultragarsu fermentuotus lubinų produktus. Paveikus ultragarsu lubinus prieš KF, α -amilazių aktyvumas sumažėjo, lyginant su žaliaviniais lubiniais, vidutiniškai 34,85 %. Tuo tarpu, ultragarsu veikiant lubinų produktus po KF, šis sumažėjimas buvo mažesnis nei ultragarsu apdorojant žaliavinius lubinus prieš fermentaciją ir sudarė 27,71 %. Lyginant fermentuotus mėginius (KF) su ultragarsu paveiktais mėginiais (ULT+KF; KF+ULT), amilazinis aktyvumas sumažėjo vidutiniškai 1,75 ir 1,56 karto.

3.3.3.3 Ksilanazių aktyvumai

Papildomai tirti ksilanazių aktyvumai lubinų produktuose tiek žaliaviniuose, tiek ir mėginiuose, fermentuotose KF sąlygose (3.2 lentelė). Nustatyta, kad žaliaviniuose lubinuose ksilanazių aktyvumas sudarė 7,25 KV/g, o paveikus juos 60 min ultragarsu (37 kHz) ši vertė sumažėjo iki 3,11 KV/g.

3.2 lentelė. Lubinų sėklų ksilanazinis aktyvumas paveikus jas ultragarsiniu poveikiu KF sąlygose

| Fermento ksilanazės aktyvumas, KV/g | Pa* | | | Pp9 | | | Ls | | |
|-------------------------------------|--------------|------|------|------------|------|------|------------|------|------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 24 h | 48 h | 72 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| 1.KF* | 13,169 ± 5 % | - | - | 12,0 ± 5 % | - | - | 8,01 ± 5 % | - | - |
| 2.ULT + KF | 2,91± 3 % | - | - | 2,83± 3 %- | - | - | - | - | - |
| 3.KF + ULT | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

*nuo 24 h iki 72 h *pediococcus acidilactici* 7 (PA), *pediococcus pentosaceus* 9 (PP9) ir *lactobacillus sakei* 6

(LS) bakterijomis fermentuotos lubinų sėklos

1. Kietafazės fermentacijos įtaka lubinų sėklų ksilanazės aktyvumui
2. Ultragarsinio poveikio įtaka ksilanazės aktyvumui prieš lubinų sėklų fermentaciją.
3. Ultragarsinio poveikio įtaka ksilanazės aktyvumui po lubinų sėklų fermentacijos.

Nustatyta, kad ultragarsinis poveikis ksilanazių aktyvumą žaliaviniuose lubinuose sumažino 2,33 karto. Didžiausias inaktyvuojantis poveikis ksilanazių aktyvumams išryškėjo KF procesų metu ir priklausė nuo technologinės stadijos, kurioje buvo veikama ultragarsu. Mėginiuose, veiktuose ultragarsu prieš KF, dar buvo fiksuojami nežymūs ksilanazių aktyvumai po 24 h fermentacijos (~2,87 KV/g). Tuo tarpu mėginiuose, veiktuose ultragarsu po KF, ksilanazių aktyvumų nebuvo aptikta.

Tyrimai rodo, kad ultragarsas turi reikšmingą poveikį fermentiniams aktyvumams lubinų produktuose. Vienais atvejais ultragarsinis poveikis mažino fermentų aktyvumą, o kitais atvejais neturėjo jam įtakos. Fermentų aktyvumo mažėjimas paveikus ultragarsu daugiausiai buvo fiksuojamas žaliaviniuose lubinuose. KF sąlygose apdorojamuose lubinų produktuose, ultragarso poveikis fermentiniams aktyvumams priklausė nuo technologinės stadijos, kurioje ultragarsas buvo taikomas. Didžiausias ultragarso inhibicinis poveikis fermentams (proteazėms ir ksilanazėms) pasireiškė ultragarsu paveikus fermentuotus lubinus (po KF). Tiriant amilazių aktyvumus, ultragarso inhibicinis poveikis nustatytas tiek veikiant žaliavinius lubinus prieš fermentaciją, tiek ir mėginiuose po fermentacijos.

Literatūroje analogiškai ar panašūs tyrimų rezultatai, kad ultragarsas geba inaktyvuoti fermentus ir slopinti jų aktyvumą lubinų fermentacijos metu, nėra publikuoti. Tačiau paskelbta, kad tokie fermentai, kaip vaisių peroksidazės, lipoksigenazės ar pieno laktoperoksidazės inaktyvuojamos paveikus šiuos fermentus ultragarsu [100]. Ultragarso inhibicinis poveikis fermentams siejamas su jo fiziniu (kavitaciniu ir mechaniniu) poveikiu ir vykstančiais cheminiais pokyčiais, kurių metu susidaro laisvieji radikalai, skatinantys fermentų oksidaciją ir inaktyvavimą [100]. Toks ultragarso poveikis patrauklus duonos pramonėje, kepinių ruošimui

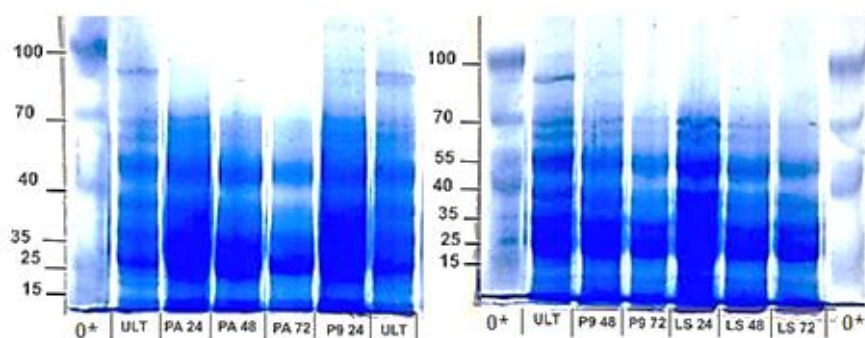
naudojant miltus, turinčius didesnius fermentinius aktyvumus. Tai ypač liečia padidintą amilazinį aktyvumą, kuris turi būti optimalus geros kokybės kepinų ruošimui.

3.3.4 Ultragarso poveikio įtaka baltyminėms medžiagoms kietafazės fermentacijos sąlygose

Ankstesniuose 3.3 skyriuose gauti tyrimų rezultatai įrodo, kad ultragaras turi įtakos augalinės žaliavos mikrobiologinės taršos mažinimui, lubinų cheminei sudėčiai, įskaitant ir fermentinio aktyvumo pokyčius. Kadangi lubinų sėklos priskiriamos baltymingiems augalams, darbe vykdytas papildomas eksperimentas, tiriant ultragarso poveikį (ULT) baltyminėms medžiagoms, galinčioms turėti įtakos tiek augalinės žaliavos maistinei vertei, tiek ir jos technologinėms savybėms. Tam tikslui lubinų viso dalių malimo sėklos prieš KF buvo paveiktos ultragarsu, naudojant sąlygas, aprašytas 2.2 skyriuje, po to atliktas baltymų išskyrimas ir kompleksinė analizė.

3.3.4.1 Baltyminių medžiagų frakcijų sudėtis

Tiriant ULT apdorojimo įtaką KF sąlygose lubinų baltyminių medžiagų frakcijų pokyčiams, vertintos albuminų ir gliutelinų (konglutinų) frakcijos, naudojant SDS – PAGE elektroforezės metodą (3.17 pav.).



3.17 pav. Ultragarso poveikis lubinų miltų baltyminių medžiagų pokyčiams KF sąlygose, vertintiems elektroforezės metodu naudojant 6 % poliakrilamido gelį

*0 – baltymo standartas SIGMA colorburst „Electrophoresis marker“; ULT – ultragarso poveikis lubinų baltyminėms medžiagoms be fermentacijos; *, nuo 24 h iki 72 h *P. acidilactici* 7 (Pa), *P. pentosaceus* 9 (Pp9) ir *L. sakei* 6 (Ls) bakterijomis fermentuotos lubinų sėklos ir iš jų iškirtos baltyminės medžiagos.

Vertinant ultragarso poveikį žaliavinių lubinų baltyminėms medžiagoms (be KF), kokybinių baltymų skirtumų, pateiktų kaip ir 3.1 skyriuje, nepastebėta. Reikšmingi pokyčiai baltyminėse lubinų medžiagose išryškėjo naudojant ultragarsą kombinacijoje su KF, susidarant daugiau skirtingos molekulinės masės baltyminių medžiagų. Paveiktuose ULT lubinų sėklose fiksuotas baltymas, kurio molekulinė masė nustatyta 95 kDa, tuo tarpu fermentuotuose lubinų baltymuose šis baltymas neužfiksuotas. Fermentuotuose baltymuose (3.17 pav.), išryškėjo

baltyminės medžiagos, kurių molekulinės masės buvo mažesnės ir kito ribose nuo 35 kDa iki 55 kDa. Be to, aptikta baltyminių medžiagų su mažiau ryškiomis zonomis, kurių molekulinės masės kito nuo 25-10 kDa iki 60 -70 kDa.

Baltyminių medžiagų pokyčiams įtakos turėjo ir KF trukmė: po 24 h KF fiksuoti didesnės molekulinės masės baltyminės medžiagos (65 – 70 kDa), kai tolesnės fermentacijos eigoje (po 48 h) didėjo mažesnės molekulinės masės medžiagos (25 – 35 kDa).

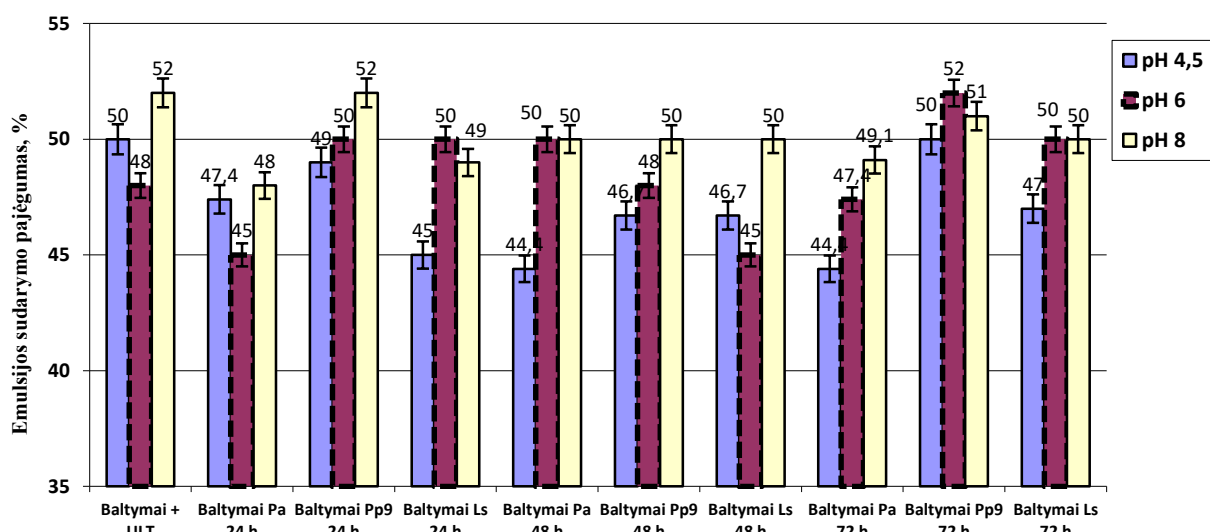
Iš gautų rezultatų matyti, kad ultragarsu apdorojant lubinų sėklas prieš KF, jos geriau fermentuojasi. Tam gali būti kelios priežastys, viena iš kurių gali būti siejama su augalinės žaliavos mikrobinės taršos sumažėjimu ir kita – su PRB kultivavimo sąlygų pagerėjimu, atsiradus fermentacijos terpėje daugiau prieinamų baltyminių medžiagų. Analogiškos tendencijos gautos vertinant KF poveikį lubinų baltyminių medžiagų pokyčiams [118, 119].

Literatūroje tyrimų, kurie vertintų ultragarso poveikį lubinų baltymų frakcijų pokyčiams KF sąlygose, nebuvo aptikta, tačiau yra aprašyti tyrimų rezultatai su sojų baltymų izoliatais paveikiant juos 15 – 30 min 20 kHz dažnio ultragarsu. Šio bandymo metu ultragarsinis poveikis neturėjo įtakos sojų baltymų izoliatų frakcijų (glicinino (11S) ir konglicinino (7S)) molekulinėms masėms, nepakeisdamos baltymo sudėties ir stuktūros [131].

3.3.4.2 Baltyminių medžiagų funkcinės savybės

Šiame skyriuje pateikti tyrimų rezultatai, gauti vertinant ULT įtaką lubinų miltų baltyminių medžiagų, funkcinėms savybėms: emulgavimo (emulsijos pajėgumui ir jų stabilumui) ir putų sudarymo pajėgumui. Kontrole naudoti lubinų baltymai, išskirti iš paveiktų ultragarsu (60 min) miltų (be fermentacijos).

Emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas, priklausomai nuo ULT poveikio esant skirtingiems terpės pH, pateiktas 3.18 ir 3.19 paveiksluose.



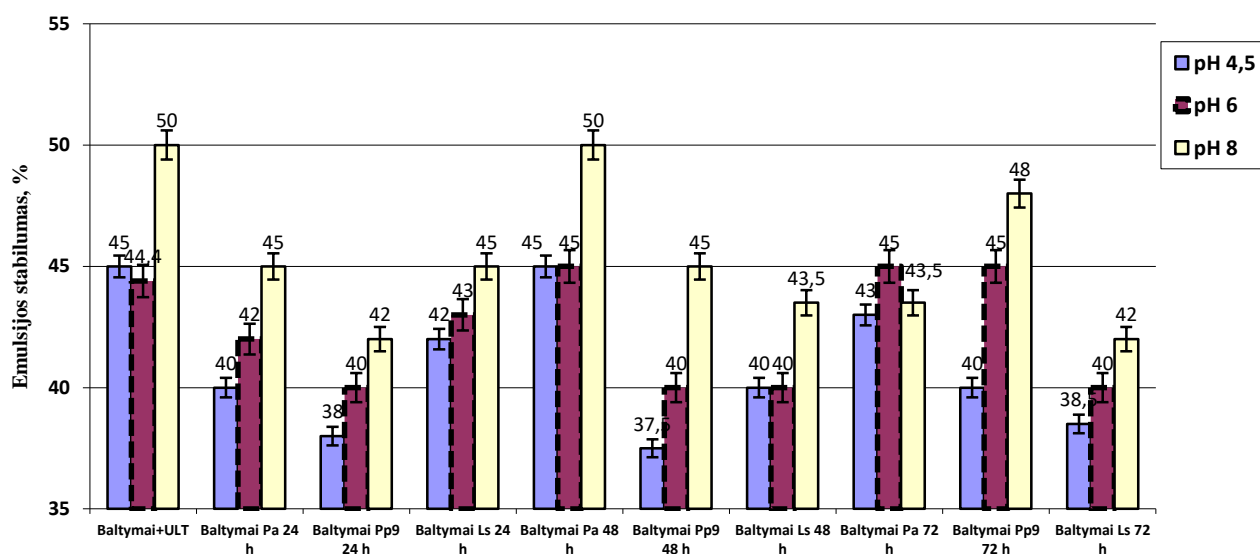
3.18 pav. Lubinų baltyminių medžiagų emulsijos sudarymo pajėgumas, esant skirtingoms pH vertėms

Iš gautų rezultatų matyti, kad ULT turėjo savitą poveikį lubinų baltymų funkcinėms savybėms (tiek emulsijų savybėms, tiek ir putų susidarymo pajėgumui) ir tai išryškėjo prie skirtingų pH verčių.

Vertinant ULT įtaką išskirtų emulsijų susidarymo pajėgumui, nustatyta, kad didžiausios šio parametro vertės aptiktos mėginiuose (be fermentacijos), esant pH vertėms 4,5 (50,0 %) ir pH 8,0 (52,0 %).

Mėginiuose, ruoštuose kombinuojant ULT su KF, pastebėta, kad ultragarsas mažino pH teigiamo poveikio įtaką šių parametro verčių didėjimui: emulsijos susidarymo pajėgumas, esant pH 4,5 nustatytas 47,2 %, o prie pH 8,0 – 50,0 %. Tokiu būdu, nustatytas šio parametro verčių prieaugis sudarė 5,6 %, t.y. ženkliai mažesnis nei sistemose, tirtose be ultragarsinio apdorojimo. Kaip rodo ir 3.1.1 skyriuje pateikti rezultatai (3.4 pav.), gauti vertinant KF įtaką emulsijų susidarymo pajėgumui (be ULT apdorojimo), didėjant pH vertėms link šarminės terpės verčių (pH 8), emulsijų susidarymo pajėgumas didėjo vidutiniškai nuo 39,7 % (pH 4,5) iki 50,3 % (pH 8) ir šio parametro verčių padidėjimas sudarė 21,07 %. Tai leidžia manyti, kad ULT poveikis emulsijų susidarymo pajėgumui yra teigiamas ir mažiau priklauso nuo terpės pH.

Vertinant lubinų baltymų emulsijų stabilumą, buvo stebimas panašus ULT poveikis šio parametro reikšmėms, esant skirtingoms terpės pH vertėms.

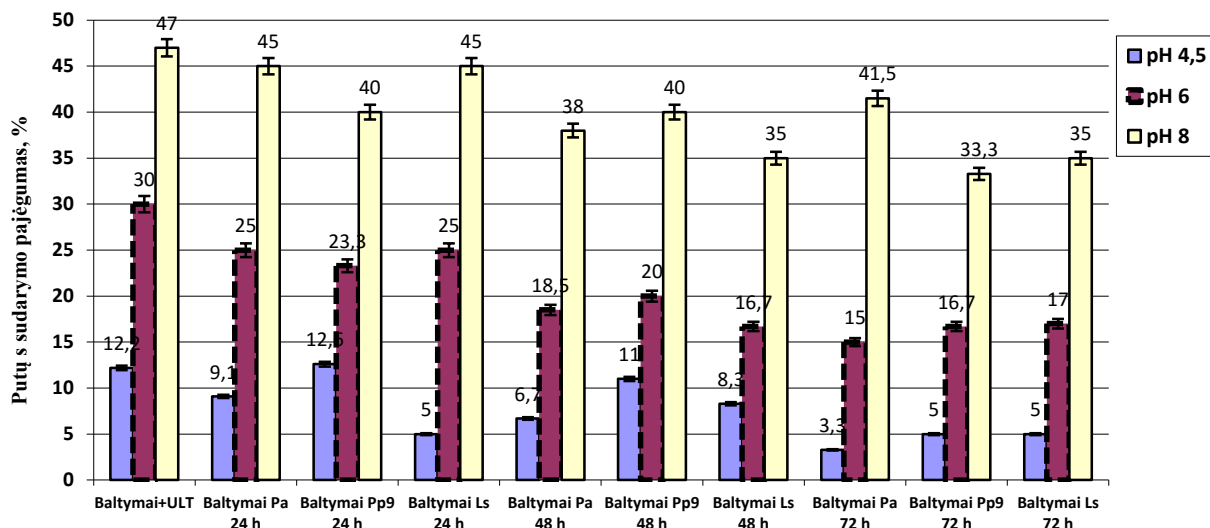


3.19 pav. Lubinų baltyminių medžiagų emulsijos stabilumas, esant skirtingoms pH vertėms

Mėginiuose, paveiktuose tik ULT, fiksuotos didesnės emulsijos stabilumo vertės nei mėginiuose, papildomai apdorotuose KF sąlygose (ULT ir KF) ir ši tendencija buvo stebima prie visų terpės pH verčių.

Naudojant ultragrasinį apdorojimą kombinacijoje su KF, pH 4,5, 6,0, 8,0 įtaka emulsijų stabilumui buvo vidutiniškai 0,5 %; 6,3 % ir 9,4 % mažesnė nei taikant vien tik KF (3.5 pav. 3.1.1 skyriuje).

Putų sudarymo pajėgumas esant skirtingiems terpės pH pateiktas 3.20 paveiksle.



3.20 pav. Lubinų baltyminių medžiagų putų sudarymo pajėgumas, esant skirtingoms pH vertėms

Vertinant putų sudarymo pajėgumą ULT paveiktuose mėginiuose (be KF) pastebėta, kad putų susidarymas prie pH 4,5, 6 ir 8 buvo vidutiniškai 37 %, 38,3 % ir 14,9 % didesnis, nei analizuojant sistemas, kuriose ULT naudotas kartu su KF. Mėginiuose, ruoštuose naudojant ULT kombinacijoje su KF, putų susidarymo pajėgumo sumažėjimui reikšmingą įtaką turėjo ultragarso poveikis (vidutiniškai 30,0 %). Putų susidarymo pajėgumas priklausė nuo terpės pH, kuriam kintant šarminės reakcijos link, tirto parametro vertės didėjo (esant pH 6 – padidėjimas sudaro 10,8 %; pH 8 – 22,5 %). Pastebėta, kad KF trukmė mažina putų stabilumą ir tai ypač išryškėja tęsiant fermentaciją ilgiau nei 48 h.

Literatūroje pateikiama informacija, apie ultragarso įtaką baltymų funkcinėms savybėms – putojimo [129, 89] ir emulgavimo [89], įrodant, kad ultragarso poveikis gerina baltyminių medžiagų funkcinės savybes.

Ultragarso poveikis turėjo teigiamos įtakos išrūgų baltymų putų sudarymo pajėgumui ir priklausė nuo dažninės charakteristikos ir apdorojimo trukmės. Naudojant 20 kHz dažnio, 15 min trukusį ultragarsinį poveikį putų susidarymo pajėgumas sudarė $132 \pm 1,3$ %, tuo tarpu padidinus dažnį iki 40 kHz (apdorojimo trukmė 15- 30 min) šios parametro vertės padidėjo iki $235 \pm 1,4$ %. Tuo tarpu, putų stabilumas didėjo vykdant ultragarsinį apdorojimą nuo 68,3 min iki 98,4 min [129].

Įvertinta ir ultragarso įtaka sojų baltymų funkcinėms savybėms. Paveikus sojų baltymų izoliatą 20 kHz ultragarsu 30 min, putų sudarymo pajėgumas padidėjo nuo 95 ± 1 % iki 104 ± 1 %, kitais atvejais, keičiant dažnį bei trukmę putų sudarymo pajėgumas nedidėjo. Tuo tarpu ultragarsinis apdorojimas ženkliai pagerino emulgavimo savybes, nustatytas kontroliniame mėginyje $121 \pm 1,3$ m²/g ir po ULT apdorojimo – $212 - 277 \pm 1,2$ m²/g [89].

Padidėjusios sojos baltymų emulsijos sudarymo pajėgumo vertės aiškinamos tuo, kad ultragarso metu vykstant kavitacijai sumažėja vandens ir aliejaus lašelių dydžiai, įvyksta sojų 7S ir 11S baltyminių frakcijų dalinė denatūracija ir jų išsiskleidimas, ko pasekoje pagerėja sąveika ir adsorbcija tarp vandens/aliejaus dalelių [132].

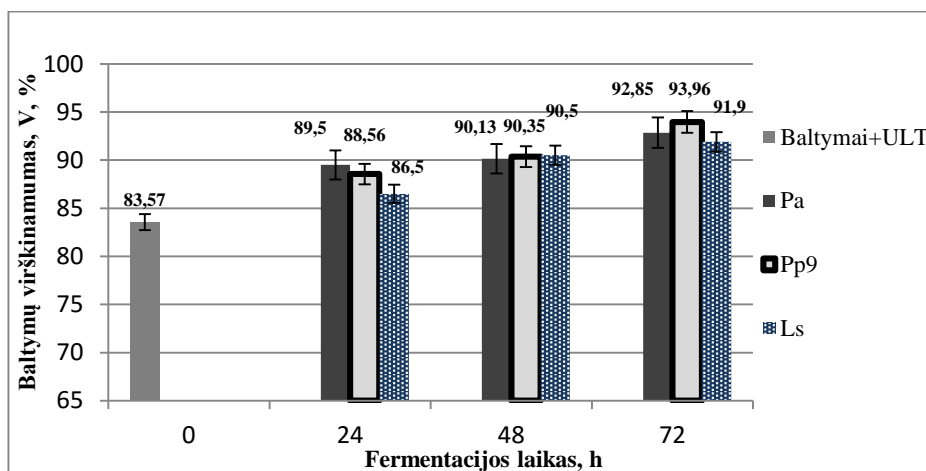
Išaugusios baltyminių medžiagų putų sudarymo pajėgumo vertės, paveikus jas ultragarsu, aiškinamos tuo, kad veikiant ultragarsu skatinamas homogenizacijos procesas, kurio metu baltymų, riebalų dalelės ir hidrofobinės/hidrofilinės baltymų aminorūgštys yra paskirstomos tolygiai visame tiriamajame mėginyje [133].

3.3.4.3 Baltymų virškinamumo ir proteazių inhibitorių aktyvumai

Šio eksperimento tikslas – įvertinti ULT (37 kHz, trukmė – 60 min) ir kombinacijoje su KF įtaką lubinų baltymų virškinamumui ir proteazių inhibitorių aktyvumo pokyčiams (atitinkamai, 3.21 pav. ir 3.22 pav.). Kaip kontrolė laikytos lubinų baltyminės medžiagos (baltymai+ULT) paveiktos 60 min ultragarsu be fermentacijos.

Ultragarso poveikio įtaka baltymų *in vitro* virškinamumui. Iš gautų rezultatų matyti, kad didžiausią įtaką baltymų virškinamumui turi tik KF. Mėginiuose, paveiktuose vien tik ULT, baltymų virškinamumo rodiklis nustatytas 83,57 %. Tai patvirtina, kad ultragarsas neturi įtakos šiam parametru (lyginant su 3.1.2 skyriuje 3.7 pav. gautais rezultatais).

Vertinant ULT įtaką KF sąlygose, taip pat nebuvo pastebėta ULT poveikio įtaka baltymų *in vitro* virškinamumui (3.7 pav., 3.1.2 skyriuje). Šio eksperimento metu išryškėjo KF teigiamas poveikis baltymų *in vitro* virškinamumui. Ilgėjant fermentacijos trukmei nuo 24 h iki 72 h šio parametro vertės padidėjo atitinkamai nuo 88,18 % iki 92,9 %

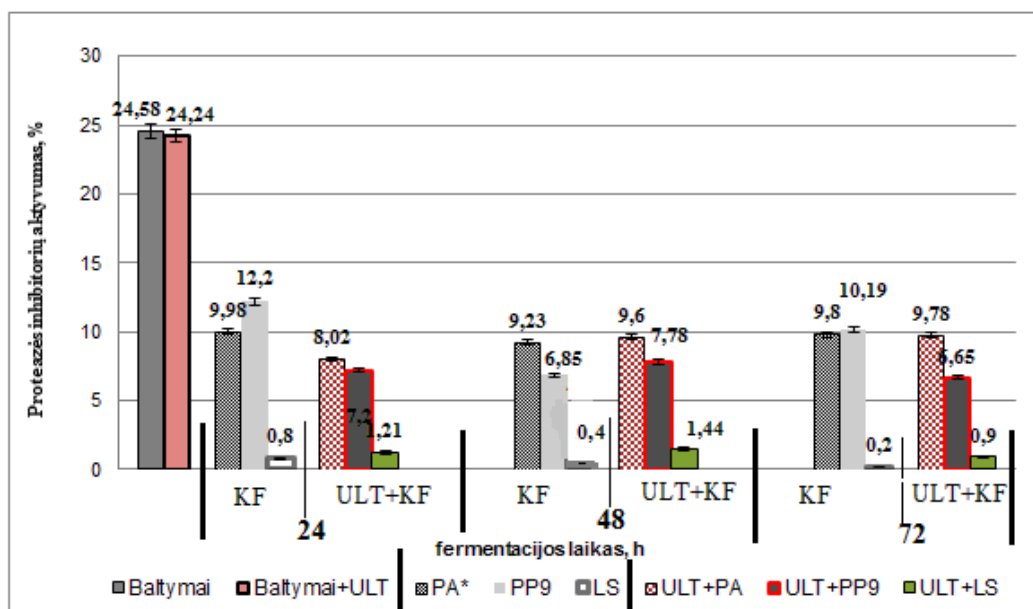


3.21 pav. ULT ir KF įtaka lubinų baltyminių medžiagų *in vitro* virškinamumui

Proteazių inhibitorių baltymuose aktyvumui ULT poveikis neturėjo įtakos. Vertinant vien tik KF įtaką proteazių inhibitorių aktyvumui, nustatyta, kad visais tirtais fermentacijos tarpsniais ši vertė mažėjo (po 24 h – 3,23 kartais; 48 h – 4,0 kartais ir 72 h – 3,7 kartais), kai

ULT+KF mėginiuose šios vertės buvo atitinkamai 4,4; 3,84 ir 4,38 kartais mažesnės, todėl ultragarso poveikis inhibitorių aktyvumui neturėjo įtakos, tiriant tiek vieno ultragarso poveikį, tiek ir kombinacijoje su KF.

Tokiu būdu, norint padidinti baltymų virškinamumą ir sumažinti juose esančių inhibitorių poveikį, tikslinga vystyti PRB fermentuotų lubinų produktus.



3.22 pav. ULT ir KF įtaka lubinų baltyminių medžiagų proteazių inhibitorių aktyvumui

Literatūroje analogiški ar panašūs bandymai, kurie įvertintų ULT įtaką baltymų virškinamumui ir proteazių inhibitorių aktyvumui KF sąlygose, nebuvo atlikti, todėl gautus rezultatus palyginti su kitų autorių publikacijomis nebuvo galimybių.

Išvados

1) Parinkta ultragarsinio poveikio trukmė (60 min, 37 kHz) siauralapių lubinų (*L. angustifolius*) sėklų apdorojimui, leidusi pasiekti didžiausią antimikrobinį poveikį: sumažinti sėklose bendrą mikroorganizmų skaičių 5,5 karto (nuo 460000 KSV/1 g iki 83000 KSV/1 g).

2) Ultragarsinis poveikis atskirai ir kombinacijoje su KF didino maistinių lubinų (*L. angustifolius*) sėklose tirpiųjų baltymų kiekį (atitinkamai, 11,4 ir 13,12 %), o bendras baltymų kiekis sumažėjo (3 % ir 6,9 %).

3) Ultragarsinis apdorojimas lubinų sėklose daugiau nei dvigubai sumažino proteazių aktyvumą ir mažesniu laipsniu amilazių aktyvumą (nuo 35,5 % iki 50 %), tuo tarpu kietafazės fermentacijos metu visais atvejais buvo stebimas proteazių ir amilazių aktyvumo padidėjimas, atitinkamai 4,83 karto ir 15,22 %.

4) Kietafazė fermentacija daugiausiai įtakos turėjo lubinų sėklų baltyminių medžiagų funkcinėms savybėms: gerino emulgavimo savybes ir mažino putų sudarymo pajėgumą. Ultragarsas analogiškai keitė baltymų (po fermentacijos) funkcines savybes, tačiau mažesniu laipsniu nei KF.

5) Kietafazė fermentacija turėjo reikšmingą įtaką lubinų baltymų *in vitro* virškinamumui (padidino vidutiniškai 6,4 %), o proteazių inhibitorių aktyvumą sumažino daugiau nei 2 kartus. Ultragarsinis poveikis šiems kriterijams įtakos neturėjo.

6) Rekomenduojama ultragarsą taikyti fermentacijos terpės mikrobiologinės taršos mažinimui ir baltymų funkcinių savybių gerinimui. Be to, ultragarsas gali būti sėkmingai taikomas fermentų inaktyvavimui, pakeičiant plačiai bioprocusuose taikomus fermentų inhibitorius.

Bibliografinių nuorodų sąrašas

1. C. de Vries, Maaik, et al. *Optimising single cell activity assesment of Lactobacillus plantarum by fluorescent in situ hybridisation as affected by growth*. Journal of Microbiological Methods. 2004, vol. 59, p. 109–115.
2. Doxastakis, G., et al. *Lupin, soya and triticale addition to wheat flour doughs and their effect on rheological properties*. Food Chemistry. 2002, vol. 77, p. 219–227.
3. . Drummond, Christopher S., et al. et al. *Multiple continental radiations and correlates of diversification in Lupinus (Leguminosae): Testing for key innovation with incomplete taxon sampling*. Systematic Biology. 2012, vol. 61(3) p. 443-60.
4. Čaikauskas, Vladas. *Augalinkystė*. Mokslo ir enciklopedijų leidykla. 1995, p. 352.
5. Faluyi, M. A., et al. *Seed quality of sweet white lupin (Lupinus albus) and management practice in eastern Canada*. European Journal of Agronomy. 2000, vol. 13, p. 7–37.
6. White C.L., V.E Staines ir M.v.H Staines. *A review of the nutritional value of lupines for dairy cows*. Aust J. Agric Res. 2007, vol. 58, p.185-202.
7. Martínez-Villaluenga, C., J. Frías ir C. Vidal-Valverde. *Functional lupin seeds (Lupinus albus L. and Lupinus luteus L.) after extraction of α-galactosides*. Original Research. Food Chemistry, vol. 98, Issue 2. 2006, p. 291-299.
8. Lampart–Szczapa, E. *Antioxidant properties of lupin seed products*. Food Chemistry. 2003, vol. 83. p. 279–285.
9. Dervas, G., et al. *Lupin flour addition to wheat flour doughs and effect on rheological properties*. Food Chemistry. 1999, vol. 66, p. 67–73.
10. Huyghe, C. *White lupin (Lupinus albus L.)*. Field Crops. Research. 1997, vol. 53, 147–160.
11. Bartkiene Elena, et al. *Chemical composition and nutritional value of seeds of Lupinus luteus L., L. angustifolius L. and new hybrid lines of L. angustifolius L.* Zemdirbyste-Agriculture. 2016, vol. No. 1, p. 107–114. e-ISSN 2335-8947
12. Ehsan M., et al. *Zinc and cadmium accumulation by Lupinus uncinatus Schldl. grown in nutrient solution*. International Journal of Environment Science and Technology. 2015, vol.12 (1): p. 307–316.
13. Erbas, M., M. Certel ir M.K. Uslu. *Some chemical properties of white lupin seeds (Lupinus albus L.)*. Food Chemistry 89. 2005, p. 341–345.
14. Kurlovich, B. S. *Lupins*. St. Petersburg. 2002. p. 259–377.
15. Maknickiene, Zita ir Almantas Ražukas. *Narrow-leaved forage lupine (Lupinus angustifolius L.) breeding aspects*. Žemes ūkio mokslai. 2007, vol. 14 (3), p. 27–31.
16. Sujak, B., A. Kotlarz ir W. Strobel. *Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds*. Food Chemistry. 2006, vol. 98, p. 711–719.
17. Guillon F. ir M.M. Champ. *Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health*. Br J Nutr. 2002, vol. 88, p. 293-306.
18. Bartkiene, Elena, et al. *Reducing of acrylamide formation in wheat biscuits supplemented with flaxseed and lupine*. Food Science and Technology. 2016, vol. 65, p. 275-282.

19. Cauvain, Stanley P. *Breadmaking. Improving quality*. Antras leidimas., 3 skyrius. The Chemistry and Biochemistry of Wheat. 2012, p.60-62.
20. Polaina, Julio ir Andrew P. MacCabe. *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Section A. Carbohydrate active enzymes. Section B Peptidase. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia, Spain. 2007, p 13-19, 181-197. ISBN 978-1-4020-5376-4.
21. Ball, S., et al. *From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule*. Cell. 1996, vol. 86, p. 349–352.
22. Rao, M.B., et al. *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 1998, vol. 62, p. 597–635.
23. Sosulski, F. W., ir C. G. Youngs, *Yield and functional properties of classified protein and starch fractions from eight flours*. Journal of American Oil Chemists' Society. 1979, vol. 56, p. 292–295.
24. Ruiz Jr., L. P., ir E. L. Hove. *Conditions affecting production of protein isolate from lupin seed kernel*. Journal of Science and Food Agriculture. 1976, vol. 27, p. 667–674.
25. Millan, F., et al. *Study of neutral lipids of Lupinus mutabilis meal and isolates*. Journal of the American Oil Chemists Society. 1995, vol. 72, p. 7471–7475.
26. Enneking D. ir M. Wink. *Towards the elimination of anti-nutritional factors in grain legumes*. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. 2000, vol. 34. p. 671–683. [žiūrėta 2016 m gegužės 12 d.] Prieiga per internetą: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-4385-1_65.
27. Gueguen, J. *Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics*. Plant Foods for Human Nutrition. 1983, vol. vol. 32, n 3–4. p. 267–303. [žiūrėta 2016 m gegužės 12 d.] Prieiga per internetą: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01091191>.
28. Klupšaitė, Dovilė ir Gražina Juodeikienė. *Legume: composition, protein extraction and functional properties. A review*. CHEMINĖ TECHNOLOGIJA. 2015. Nr. 1 (66) ISSN 1392 – 1231. [žiūrėta 2016 m gegužės 12 d.] Prieiga per internetą: <http://dx.doi.org/10.5755/j01.ct.66.1.12355>.
29. Gueguen, J. *Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristic.s* Plant Foods for Human Nutrition. 1983, vol. 32, n 3–4, p. 267–303. [žiūrėta 2016 m gegužės 12 d.] Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01091191>.
30. Jayasena, V., H. J. Chih ir S. M. Nasar-Abbas. *Efficient isolation of lupin protein*. Food Australia. 2011, vol. 63, n 7. p. 306–309.
31. Cerletti, P. ir M. Duranti. *Development of Lupine Proteins*. Department of General Biochemistry, University of Milan, 1-20133 Milano, Italy. J. AM. OIL CHEMISTS' SOC. March. 1979, vol.56, p. 460-463.
32. Duranti, M., et al. *The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients*. Trends in Food Science and Technology. 2008, vol. 19, p. 624–633.
33. Pollard, N.J., et al. *Lupin flours as additives: Dough mixing, breadmaking, emulsifying and foaming*. Cereal Chemistry. 2002, vol. 79: p. 662–669.
34. Raymundo A., J. Empis ir I. Sousa. *White lupin protein isolate as a foaming agent*. Zeitschrift fur Lebensmittel- Untersuchung und –Forschung. 1998, vol. 207: p. 91–96.
35. Junge, I., "Research and Development in Chile, Publication N. 1, School of Engineering, Universidad de Concepcion, Chile, 1973, p. 460-463.

36. UAB „Proteino Produktai“. *Maisto papildai sportui ir dietai*. [žiūrėta 2016 m gegužės 12 d.] Prieiga per internetą: <http://www.proteinas.lt/>.
37. Soderberg, Johansa. *Functional properties of legume proteins compared to egg proteins and their potential as egg replacers in vegan food*. Second cycle, A2E. Uppsala: SLU, Dept. of Food Science. 2013.
38. Belitz, H. ir D., Grosch. *Food Chemistry*. Second Edition. Berlin, 1999. p. 60-62, ISBN 3-540-15043-9.
39. Damodaran, S. Food proteins: An overview. Damodaran, S. Paraf, A. Mercel *Food Proteins and Their Applications* (p. 22). US. 1997. [žiūrėta 2016 m gegužės 11 d.] Prieiga per internetą: http://books.google.com/books?id=PWPkptZ1Z9sC&printsec=frontcover&hl=sv&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
40. Kinsella, J.E. *Relationships between structure and functional properties of food proteins*. Food proteins. Edited by: Fox P.F. ir Condon J.J. Applied science publishers LTD, England. 1982, p. 51-58. [žiūrėta 2016 m gegužės 11 d.] Prieiga per internetą: books.google.com/books?hl=sv&lr=&id=uFaUueWsD98C&oi=fnd&pg=PA51&dq=functional+properties+kinsella+1982&ots=cnhfHq9Trt&sig=Ex1rbMscanP4tt5i1XEiesuJD6Q#v=onepage&q=functional%20properties%20kinsella%201982&f=false
41. Vaclavik, V. ir E. Christian. *Essentials of Food Science*. Second edition. New York: Kluwer Academic/Plenum publishers. 2003, p. 142. [žiūrėta 2016 m gegužės 11 d.] Prieiga per internetą: <http://books.google.com/books?id=DzMhwchiTMMC&printsec=frontcover&hl=sv#v=snippet&q=soy%20food%20gels&f=false>
42. Bolontrade, A.J., A.A., Scilingo, ir M.C Anon. *Amaranth Proteins Foaming Properties: Adsorption Kinetics and Foam formation - Part I*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2013, vol. 105, p. 319–327.
43. Raikos, V., L. Campbell ir S.R. Euston. *Rheology and Texture of Hen's Egg Protein Heat-set Gels as Affected by pH and the Addition of Sugar And/or Salt*. Food Hydrocolloids, vol. 21, 2007, p. 237–244.
44. McClements, D.J. *Protein-stabilized Emulsions*. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2004, vol. 9, p. 305–313.
45. Yang, S.C. ir R.E. Baldwin. *Functional properties of eggs in foods*. Science and technology. Fourth edition. Stadelman, W.J. & Cotterill O.J. (eds.) Binghamton: Food Products Press; Haworth Press. 1995, p. 405 [žiūrėta 2016 m gegužės 11 d.] Prieiga per internetą: <http://books.google.com/books?id=m20SqIXGKYC&printsec=frontcover&hl=sv#v=onepage&q&f=false>
46. Kinsella, J.E. *Functional Properties of Proteins: Possible Relationships Between Structure and Function in Foams*. Food Chemistry. 1981, vol. 7, p. 273–288.
47. Van Kleef, F. S. M. *Thermally Induced Protein Gelation: Gelation and Rheological Characterization of Highly Concentrated Ovalbumin and Soybean Protein Gels*. Biopolymers. 1986, vol. 25, p. 31–59.
48. Ikeda, S., ir K. Nishinari. *On Solid-like Rheological Behaviors of Globular Protein Solutions*. Food Hydrocolloids. 2001, vol. 15, p. 401–406.
49. Doi, E. *Gels and Gelling of Globular Proteins*. Trends in Food Science & Technology. 1993, vol. 4, , p. 1–5.
50. Shimada, K. ir S. Matsushita. *Thermal Coagulation of Egg Albumin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 1980, vol. 28, p. 409–412.
51. Farnword, E. R. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC Press. 2003.
52. Narbutaitė, Vilma. *Ekstruduotos žaliavos fermentacija pieno rūgšties bakterijomis ir jos produktai duonos gamyboje*. Kauno technologijos universitetas. 2010, tezės.

53. Bartkienė, Elena, et al. *Effect of lactic acid fermentation of lupine wholemeal on acrylamide content and quality characteristics of wheat-lupine bread*. Int J Food Sci Nutr. 2013, early Online: p. 1–7. Informa UK Ltd. [žiūrėta 2016 m gegužės 13 d.] ISSN: 0963-7486 Prieiga per internetą: DOI: 10.3109/09637486.2013.805185
54. Axelsson, L. *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. In Salminen, S. von Wright, A. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects (2nd edition). Marcel Dekker Inc., New York, USA. 1998, p. 1–72.
55. Masteikienė, Regina. *Maisto produktų mikrobiologija*. Vadovėlis. Kaunas, Technologija. 1 knyga. 2002, p. 261 – 278.
56. Forsythe, S.J. *The microbiology of safe food*. Chichester, U.K.; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Pub., 2nd ed. 2010, p. 109-115, p. 125-136.
57. Bartkienė Elena, et al. *Netradicinių fermentuotų produktų panaudojimas kvietinės duonos gamyboje*. Pranešimas. 2010, Kaunas.
58. Forsythe, S.J. *The microbiology of safe food*. Chichester, U.K. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Pub., 2nd ed. 2010, p. 176-180.
59. Sadeghi, A.. *The secrets of sourdough: A review of miraculous potentials of sourdough in bread shelf life*. Biotechnology.2008, vol. 7, no. 3, p. 413-417
60. Šalomskienė, Joana ir Antanas Šarkinas. *Biotechnologinių procesų inovacijos maisto gamyboje ir maisto saugos problemos*. Pagal 23-jo ICFMH simpoziumo „FOODMICRO 2012 medžiagą. KTU Maisto institutas. p. 1-3.
61. Lindgren, S.E. ir W.J. Dobrogosz, *Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations*. FEMS Microbiology Reviews. 1990, vol. 7, no. 1-2, p. 149-63.
62. Piard, J.C. ir M. Desmazeaud. *Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria*. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. 1991, vol. 71, no. 5, p. 525-541.
63. Montville, T. J. ir A. L. Kaiser. *Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins*. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic Press, London, 1993, p. 1–22.
64. Cintas, L. M. et. al.. *Review: bacteriocins of lactic acid bacteria*. Food Science and Technology International. 2001, vol. 7, no. 4, p. 281-305.
65. Nes, I. F. ir H. Holo. *Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria*. Biopolymers. 2000, vol. 55, no. 1, p. 50-61.
66. Cotter, P.D., C. Hill, ir R.P. Ross. *Bacteriocins: developing innate immunity for food*. Nature Reviews Microbiology. 2005, vol. 3, no. 10, p. 777-788.
67. Wiedemann, I. et al. *Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity*. The Journal of Biological Chemistry. 2001, vol. 276, no. 3, p. 1772–1779.
68. Francisco, B., et al. *Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin ACM, from Pediococcus acidilactici*. International Journal of Food Microbiology. 1997, vol. 37. p. 1-11.
69. Dortu, C., et al. *Anti-listerial activity of bacteriocin-producing Lactobacillus curvatus CWBI-B28 and Lactobacillus sakei CWBI-B1365 on raw beef and poultry meat*. Journal compilation. The Society for Applied Microbiology. Letters in Applied Microbiology. 2008, vol. 47. p. 581–586.
70. De Vuyst, L. ir E.J. Vandamme. *Antimicrobial potential of lactic acid bacteria*. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. Blackie Academic and Professional. London. 1994, p. 91-142.

71. Barneveld, R.J. *Understanding the nutritional chemistry of lupin (Lupinus spp) grain to improve livestock production efficiency*. Nutr Res Rev. 1999, vol. 12, p. 203–230.
72. Campbell, C.P, et al., *Occupational sensitization to lupin in the workplace: Occupational asthma, rhinitis, and work-aggravated asthma*. J Allergy Clin Immunol. 2007, vol. 119, p.1133–1139
73. Hove, E.L. ir S. King. *Trypsin inhibitor contents of lupin seeds and other grain legumes*. New Zeal J Agr Res. 1979, vol. 22, p. 41–42.
74. Glencross, B, *The influence of soluble and insoluble lupin non-starch polysaccharides on the digestibility of diets fed to rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Aquaculture. 2009, vol. 294, p. 256–261.
75. Doblado, R., et al., *Fermentation of Vigna sinensis var. carilla flours by natural microflora and Lactobacillus*. J Food Protect. 2003, vol. 65, p. 313–320.
76. Reddy N.R., et al. *Legume-based fermented foods: their preparation and nutritional quality*. Crit Rev Food Sci Nutr. 1982, vol. 17, p. 335–370.
77. Stiles, M.E.. *Biopreservation by lactic acid bacteria*. A Van Leeuw. 1996, vol. 70, p. 331–345.
78. Steinkraus, K.H. *Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes*. A Van. Leeuw. 1983. 49: p. 337–348.
79. Fernandez-Orozco, R., et al., *Fermentation as a bio-process to obtain functional soybean flour*. J Agric Food Chem. 2007, vol. 55, p. 972–979.
80. Lee, I.H., Y.H. Hung ir C.C. Chou. *Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean*. Int J Food Microbiol. 2008, vol. 121, p. 150–156.
81. Juodeikiene, Gražina, et al. *The advantages of solid state fermentation to develop plant products with a higher nutritional value and safety*. Foodbalt. 2012. p. 61-62.
82. Awan, M. A., I. Fleet, ir C. L. P. Thomas. *Determination of biogenic diamines with a vaporization derivatisation approach using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry*. Food Chemistry. 2008, vol. 111, p. 462–468.
83. Lapa-Guimarcas, J. ir J. Pickova. *New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid*. Journal of Chromatography A. 2004, vol. 1045, p. 223–232.
84. Domenet, S., C. Corgneau ir V. Ducruet. *Characteristics and applications of poly(lactide), in Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications*, ed. by Kalia S and Averous L. John Wiley Sons, USA. 2011, p. 183–197.
85. Motarjemi Y. ir M.J.R. Nout. *On behalf of the joint FAO/WHO workshop on assessment of fermentation as a household technology for improving food safety 3 foodfermentation: a safety and nutritional assessment*. Bull World Health Organ. 1996, vol. 74, p. 553–559.
86. Bartkienė, Elena, Gražina Juodeikienė, Gintarė Zaborskienė, et.al. *Biogeninių aminų susidarymas pašarams naudojamoje fermentuotose augalinuose produktuose. Veterinarija ir zootechnika*. (Vet Med Zoot). 2013, T. vol. 63 (85).ISSN 1392-2130.

87. Bartkiene, Elena, et al. *Solid state fermentation with lactic acid bacteria to improve the nutritional quality of lupine and soybean*. Article in journal of the science of food and agriculture 2015.
88. Suliburska, J., et al. *Effect of fermentation and extrusion on the release of selected minerals from lupine grain preparations*. Poznań University of Life Sciences Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 8(3). 2009, p. 87-96. ISSN 1889-9594.
89. Jambrak, A. R., et al. *Physical properties of ultrasound treated soy proteins*. Journal of Food Engineering, 2009, vol. 93(4), p. 386-393.
90. Soria, A. C., ir M. Villamiel. *Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review*. Trends in Food Science & Technology. 2010, vol. 21(7), p. 323-331.
91. Gulseren, I., et al. *Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions*. Ultrasonics Sonochemistry, 2007, vol. 14(2), p. 173-183.
92. Knorr, D., M. Zenker, ir V. Heinz. *Applications and potential of ultrasonics in food processing*. Trends Food Sci. Techn. 2004, vol. 15, p. 261-266.
93. McClements, D.J. *Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing*. Trends Food Sci. Techn. 1995, vol. 6, p. 293-299.
94. Zheng, L. ir D.W. Sun. *Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes – a review*. Trends Food Sci. Techn. 2006, vol. 17, p. 16-23.
95. Mason, T.J., L. Paniwnyk ir J.P. Lorimer. *The uses of ultrasound in food technology*. Ultrason.Sonochem. 1996, 3, p. 253-260.
96. Stasiak, D.M.. *The ultrasound assisted sugar extraction from sugar beet cossettes*. Acta Sci. Pol., Techn. Agrar. 4 (2). 2005, p. 31-39 .
97. Stasiak, D.M. ir Z.J. Dolatowski. *Influence of sonication on honey crystallization*. Pol. J. Food Nutr. Sci. 2007, p. 69-72.
98. Ensminger, D. *Acoustic and electroacoustic methods of dewatering and drying*. Drying Techn. 1998. vol. 6, 3, p. 473-499.
99. Drakopoulou, S. et al. *Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater*. Ultrasonics Sonochemistry. 2009, vol. 16, p. 629–634
100. O'Donnell, C.P, et al.. *Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance*. Trends in Food Science & Technology. 2010, vol. 21, p. 358–367.
101. Zbigniew, J. *Application of ultrasound in food technology*. Agricultural University of Lublin. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 6(3) 2007, p. 89-99.
102. Valstybinė augalininkystės tarnyba prie žemės ūkio ministerijos. *SIAURALAPIŲ LUBINŲ VEISLIŲ, ĮRAŠYTŲ Į NACIONALINĮ AUGALŲ VEISLIŲ SĄRAŠĄ, CHARAKTERISTIKOS*, 2005. [žiūrėta 2016 m gegužės 08 d.] Prieiga per internetą:
http://www.vatzum.lt/uploads/documents/augalu_veisles/veisliu_aprasymai/pdf_12_lubinu_irasytu_i_ns_charakteris_tikos.pdf
103. Martins. S., et al. *Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation*. A review. Biotechnology Advances. 2011, vol. 29, p. 365–373.
104. Ralys, Aurimas, Valdemar Prokopovič ir Vytautas Striška. *Švarių paviršių paruošimas*. Vilniaus Gedimino technikos universitetas. Mechanika, medžiagų inžinerija, pramonės inžinerija ir vadyba. 2012, ISSN 2029-2252.

105. Kjeldalio metodas ISO 20483:2006. *Varpinių ir ankštinių javų grūdai. Azoto kiekio nustatymas ir žaliųjų baltymų kiekio apskaičiavimas*. Vilnius. Lietuvos standartizacijos departamentas, 2006.
106. Jayasena, V., H.J. Chih ir S.M. Nasar-Abbas. *Functional Properties of Sweet Lupin Protein Isolated and Tested at Various pH Levels*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2010, vol. 6(2), p. 130-137.
107. Coligan, J.E., et al. *Electrophoresis, In Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons, Inc. New York. 2002, p. 10.0.1-10.4.36.
108. Naczki, M., L.J. Rubin ir F. Shahidi, *Functional properties and phytate content of pea protein preparations*. Journal of Food Science, 1986, vol. 51, p. 1245-1247.
109. Sathe, S.K., S.S. Desphande ir D.K. Salunkhe, *Functional properties of lupin seed (Lupinus mutabilis) proteins and protein concentrates*. Journal of Food Science. 1982, vol. 47, p. 491-497.
110. Lqari, H., et al. *Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization*. Food Chemistry. 2002, vol 76, p. 349–356.
111. Anwar, A. ir M. Saleemuddin. *Regulation of digestive proteolytic activity in the larvae of Spilosoma obliqua (Lep., Arctiidae)*. Journal of Applied Entomology. 2001, vol. 125, p. 577-582.
112. Nguyen, Q. D., et al. *Purification and characterisation of amyolytic enzymes from thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus strain ATCC 34626*. Enzyme and Microbial Technology. 2002, vol. 31, (3), p. 345-352.
113. Bailey, M. J., P. Biely ir K. Poutanen. *Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity*. Journal of Biotechnology. 1992, vol. 23, p. 257-270.
114. Miller, G. L. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry, 1959, vol. 31, (3) p. 426-428.
115. ISO 4833:2003. *Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis metodas. Kolonijų skaičiavimo 30 °C temperatūroje metodas*. Vilnius. Lietuvos standartizacijos departamentas, 2003.
116. Afoakwa, E. O., et al. *Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (Theobroma cacao) beans*. International Food Research Journal. 2013, vol. 20(4), p. 1843-1853.
117. Di Cagno, R., et al. *Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance*. Appl Environ Microbiol. 2002 Feb.
118. Garzón-de la Mora, P., et al. *Isolation and purity assessment of lupin albus conglutins*. 8. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. 2008, ISBN 0-86476-153-8.
119. Kee-Jong, Hong, Lee Chan-Ho ir Sung Woo Kim. *Aspergillus oryzae GB-107 Fermentation Improves Nutritional Quality of Food Soybeans and Feed Soybean Meals*. Journal of Medicinal Food. December. 2004, vol. 7(4), p. 430-435.
120. Snyder, H.E. ir T.W. Kwon. *Soybean Utilization*. Van Nostrand Reinhold Company: New York. 1987.
121. Oomah, B.D. ir W. Bushuk. *Characterization of lupine proteins*. Journal of Food Science, 1983, vol. 48, p. 38-41.
122. Shekib, L.A. *Nutritional improvement of lentils, chickpea, rice and wheat by natural fermentation*. Plant Food Hum Nutr. 1994, vol. 46, p. 201–205.
123. Magdi A., Osman. *Effect of traditional fermentation process on the nutrient and antinutrient contents of pearl millet during preparation of Lohoh*. Food Science and Nutrition Dept. June 2010, p. 1-6.

124. Wehrle, K., et al. *Screening methods for the proteolytic breakdown of gluten by lactic acid bacteria and enzymes preparations*. European Food Research and Technology. 1999, vol. 209, p. 428–433.
125. Stanley, P. Cauvain. *Breadmaking. Improving quality*. Antras leidimas. 6 skyrius. Wheat Proteins and Bread Quality. 2012, p. 121-139.
126. Doosti, M.R, R. Kargar ir M.H. Sayadi, *Water treatment using ultrasonic assistance: A review*, Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences, 2, Wanchai, Hong Kong, PR China, 2012, p. 96–110.
127. Schlafer, O., et al. *Ultrasound stimulation of micro-organisms for enhanced biodegradation*. Ultrasonics. 2002, vol. 40, p. 25–29.
128. Mosen, Tor, Elisabeth Lovgren, Micael Widerstrom ir Lars Wallinder . *In Vitro Effect of Ultrasound on Bacteria and Suggested Protocol for Sonication and Diagnosis of Prosthetic Infections*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 2009, p. 2496–2501.
129. Rezek Jambrak, Anet, et al. *Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions*. Journal of Food Engineering. 2008, vol. 86, p. 281–287.
130. Morel, M.H et al. *Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography*. Cereal Chemistry. 2000, vol. 77, p. 685–691.
131. Hao, Hu, et al.. *Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions*. Food Hydrocolloids. 2013, vol. 30, p. 647-655.
132. Caessens, P.W., et al. *The adsorption-induced secondary structure of beta-casein and of distinct parts of its sequence in relation to foam and emulsion properties*. Biochimica et Biophysica Acta. 1999, vol. 1430, p. 73–83.
133. Turgeon, S.L., S.F. Gauthier ir P. Paquin. *Emulsifying properties of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength*. J. Food Sci. 1992, vol. 57, p. 601–604, 634.

Priedai

I priedas

1 lentelė. Reagentų sąrašas

| Reagento pavadinimas | Gamintojas |
|--|-------------------------------------|
| SDS (natrio dodecilsulfatas) | Merck, Vokietija |
| Tris (hidroksimetil-aminometanas) | Merck, Vokietija |
| Akrilamidas | Sigma-Aldrich, Bio – Rad, Vokietija |
| Bis - akrilamidas | Roth, Vokietija |
| Glicerolis | Reaxim, Rusija |
| TEMED | Roth, Vokietija |
| APS | Roth, Vokietija |
| EDTA | Serva, Vokietija |
| Page Ruler Plus | Bio – Rad, Vokietija |
| Etanolis | Stumbras, Lietuva |
| Na ₂ S ₂ O ₃ (natrio tiosulfatas) | Riedel-de Haen, Vokietija |
| Natrio karbonatas | Roth, Vokietija |
| Formaldehidas | Roth, Vokietija |
| Sidabro nitratas | Roth, Vokietija |
| Acto rūgštis | Roth, Vokietija |
| Natrio acetatas | Roth, Vokietija |
| Glutaraldehidas | Roth, Vokietija |
| Natrio chloridas | Roth, Vokietija |
| CBB (Coomasie Brilliant Blue) G250 | Sigma-Aldrich, Vokietija |
| Fosforo rūgštis | Merck, Vokietija |
| Glicinas | Merck, Vokietija |
| Triptonas | Roth, Vokietija |
| Mielių ekstraktas | Fluka, Šveicarija |
| Gliukozė | Sigma-Aldrich, Vokietija |
| Mangano sulfatas | AppliChem, Vokietija |
| Tween 80 | Sigma-Aldrich, Vokietija |

SDS – PAGE analizei naudoti tirpalai ir jų paruošimas:

1. 30 % akrilamido/0,8 % *N,N'*-metilenbisakrilamido tirpalas. Ištirpinama 30 g akrilamido ir 0,8 g *N,N'*-metilenbisakrilamido ir pripilama H₂O iki 100 ml. Šis tirpalas sunaudojamas per 30 dienų, nes akrilamidas pamažu hidrolizuojasi iki akrilo rūgšties ir amoniako.

2. 4×TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 8,8. 36,4 g TRIS ištirpinama 110 ml vandens. Į gautą tirpalą įpilama 8 ml 10 % NDS tirpalo. Sureguliuojamas tirpalo pH iki 8,8 su 1N HCl.

3. 4×TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 6,8. 12,12 g TRIS ištirpinama 110 ml vandens. Į gautą tirpalą įpilama 8 ml 10 % NDS tirpalo. Sureguliuojamas tirpalo pH iki 6,8 su 1 N HCl.

4. Elektrofrezės TRIS-glicino buferinis tirpalas. 3,02 g TRIS, 14,4 g glicino, 1g NDS ir pripilama iki 1000 ml vandens.

5. 10 % amonio persulfato [(NH₄)₂S₂O₈] tirpalas. 0,1 g amonio persulfato ištirpinama 1 ml vandens. Tirpalas ruošiamas prieš pat naudojimą.

6. Tetrametiledilendiaminas (TEMED).

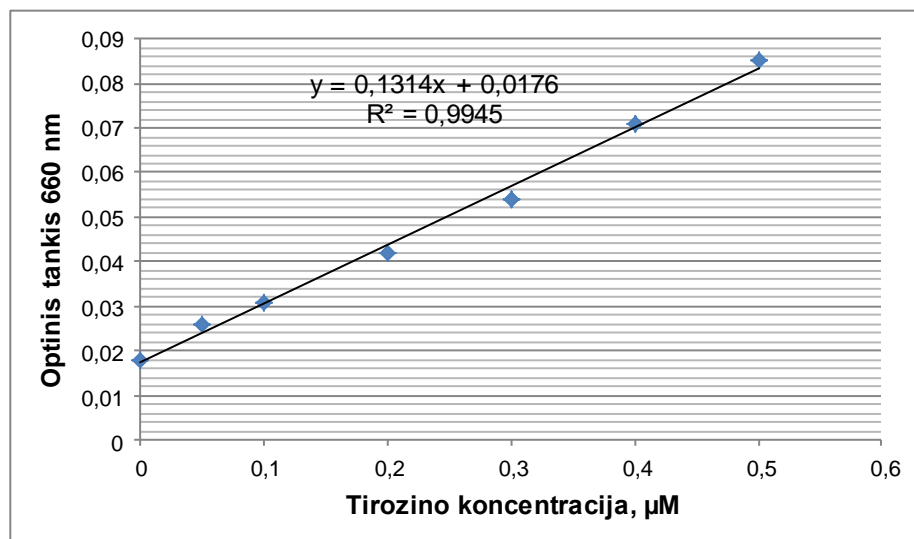
7. 2×baltymo denatūravimo buferinis tirpalas: 5 ml 4×TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 6,8, 4 ml glicerolio, 1,2 g NDS, 2 ml 2-merkaptioetanolio, 1 mg mėlynojo bromfenolio ir pripilama iki 100 ml vandens.

8. Standartinis baltymų mišinys: SIGMA colorburst „Electrophoresis marker“.

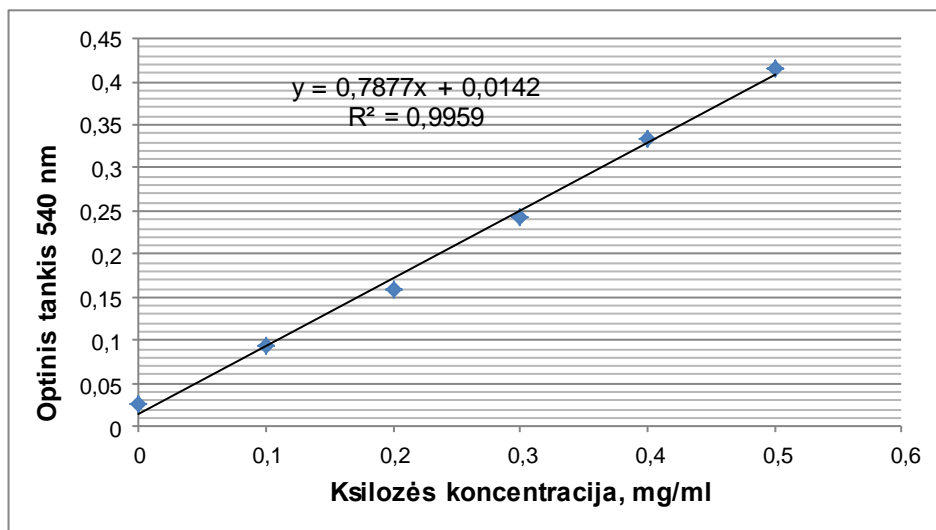
9. Tiriamojo baltymo pavyzdžiai. 10 mg tiriamojo lubinų baltymo ištirpinama 100 μl 1N NaOH ir praskiedžiama iki 1 ml vandens.

10. Dažo Coomassie mėlio tirpalas: 10 % acto rūgšties, 0,006 % coomassie mėlio G-250, 90 % vandens.

II Priedas



1 pav. Standartinė kreivė. Absorbcijos verčių priklausomybė nuo L-tirozino koncentracijos tirpale.



2 pav. Standartinė kreivė. Absorbcijos verčių priklausomybė nuo ksilozės koncentracijos tirpale